



Universidade Federal de Minas Gerais

Instituto de Ciências Biológicas

Departamento de Bioquímica e Imunologia

Luciana Souza de Oliveira

*Mecanismos moleculares determinantes da sensibilidade
diferencial de macrófagos de camundongos C57BL/6 e
BALB/c a LPS para produção de NO*

Maria de Fátima Martins Horta

Orientadora

Belo Horizonte

Abril, 2013

Luciana Souza de Oliveira

*Mecanismos moleculares determinantes da sensibilidade
diferencial de macrófagos de camundongos C57BL/6 e
BALB/c a LPS para produção de NO*

*Tese de doutorado apresentada ao
curso 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

Universidade Federal de Minas Gerais

Instituto de Ciências Biológicas

Departamento de Bioquímica e Imunologia

Belo Horizonte

Abril, 2013

*A minha família: pai, mãe, irmãos, marido e filho,
pois sem vocês eu nada seria.*

Agradecimentos

Esses quatro anos de doutorado foram não só de crescimento profissional, mas de grandes mudanças na minha vida pessoal o que torna impossível fazer um agradecimento apenas àqueles que tiveram um envolvimento direto com este trabalho.

Assim, deixo o meu agradecimento:

À Universidade Federal de Minas Gerais e ao Departamento de Bioquímica e Imunologia pela infraestrutura e pela acolhida.

Ao CNPq e à FAPEMIG pelo financiamento do projeto e pela bolsa concedida.

À Patiu, que mesmo antes de me conhecer, instantaneamente me acolheu no laboratório e depositou grande confiança em meu trabalho. Pela orientação não só profissional, mas pela grande preocupação com o nosso bem-estar e nossa qualidade de vida. Pela amizade, pelas sessões de terapia no “divã”, e pelo carinho e apoio em todos os momentos.

Ao professor Sérgio Costa, à professora Leda Viera e seu estudante Matheus, à professora Ana Maria Caetano e sua estudante Thaís pela colaboração no desenvolvimento deste trabalho.

À professora Santuza Teixeira, pelas excelentes discussões sobre o projeto principalmente durante as reuniões de laboratório.

Aos amigos do laboratório (atuais e ex-alunos do L1 e L2): Bárbara, Jarina, Natália, Nina, Gabriela, Viviane, Mariana, Rita, Júlia, Bruna, Juliano, Thiago Th1, Thiago Th2, Aninha e Patrícia pela agradável convivência diária e amizade. A Laura, minha ex-IC, pela dedicação e comprometimento com este trabalho, pela amizade e orações dedicadas a mim.

Ao Elimar Faria, técnico do nosso laboratório, pelo trabalho tão importante de facilitar os nossos experimentos deixando os materiais limpos e preparados e sempre preocupado em não nos deixar faltar nada. Pela amizade, conselhos, companhia e conversas que faziam com que o dia a dia fosse mais agradável.

Aos atuais e ex-LIDIanos (Laboratório de Imunologia de Doenças Infecciosas, coordenado pelo Prof. Sérgio Costa), por sempre me receberem como “de casa”, pela companhia nos almoços e nas viagens de congresso. Um agradecimento especial à Fernanda Souza, minha irmã e colaboradora em alguns experimentos, ao Marco Túlio por me socorrer nas dúvidas dos Western Blots, à Priscila Campos pela amizade e à Sandra Fernandes pela disposição em me ajudar sempre que possível, pelo carinho e força nos momentos difíceis.

À Jane Lima, que iniciou este projeto, por continuar acompanhando o andamento deste trabalho dando boas sugestões e conselhos.

Aos amigos do ICB, principalmente aos amigos adquiridos no curso de bases, sempre dispostos a “quebrar o nosso galho” nos momentos de aperto nos experimentos.

Às amigas “de Viçosa”, Thaís, Fernanda Lopes, Juliana, Karla, Luíza, e Hebréia, pela amizade e carinho e que mesmo distantes estão sempre presentes e torcendo pelo meu sucesso.

Aos meus familiares incluindo todos os tios, tias e primos, minha sogra Aparecida, sogro Valdemar e cunhados Mariá, Gal e Alex pelo carinho e apoio.

Ao meu irmão Paulo César pelo carinho, amizade e por ser meu exemplo de fé em Deus e fé na vida. E por junto com Gal, trazer a Duda de presente para a nossa família.

À minha irmã Fernanda, por ser tão companheira e minha maior incentivadora. Por trilharmos caminhos semelhantes está ao meu lado em todos os momentos. Pela amizade fundamental em minha vida.

Aos meus pais Mário e Maria pelo amor incondicional. A minha mãe pela dedicação com nossos estudos, pela paciência infinita, pelo carinho e cuidado. Ao meu eterno amor, meu pai, que tanto sonhou com este momento e me incentivou nos momentos de desânimo. Sei o quanto se orgulharia desta conquista. Você sempre será meu exemplo de amor, honestidade e dedicação.

Ao meu amor, Kaabah, por todo amor, carinho, amizade e respeito. Por ter compreendido a distância no início do doutorado e pela dedicação em mudar para BH para ficarmos juntos. E por dividir comigo o que temos de mais importante na nossa vida, o

nosso anjo mais novo, Miguel. A você meu filho amado, obrigada por completar a minha vida enchendo-a de alegria com seus sorrisos diários.

A todos que eu não citei nomes, mas que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho.

A Deus por ser minha fonte inesgotável de força e sabedoria e por permitir que tudo na minha vida acontecesse da melhor forma.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Sinalização via os receptores semelhante ao Toll.

Figura 2: Esquema da reação de síntese de NO a partir da L-arginina.

Figura 3: Estrutura das Óxido Nítrico Sintases (NOS) de mamíferos.

Figura 4: Produção de NO pelos macrófagos de C57BL/6 e BALB/c estimulados com LPS.

Figura 5: Viabilidade celular dos macrófagos de C57BL/6 e BALB/c.

Figura 6: Expressão e atividade da arginase nos macrófagos de C57BL/6 e BALB/c.

Figura 7: Expressão da proteína iNOS nos macrófagos de C57BL/6 e BALB/c.

Figura 8: Degradação da proteína iNOS em macrófagos de C57BL/6 e BALB/c.

Figura 9: Expressão do mRNA da iNOS nos macrófagos de C57BL/6 e BALB/c.

Figura 10: Expressão do TLR4 na membrana celular dos macrófagos de C57BL/6 e BALB/c.

Figura 11: Ativação do NF- κ B nos macrófagos de C57BL/6 e BALB/c.

Figura 12: Expressão e ativação de STAT-1 nos macrófagos de C57BL/6 e BALB/c.

Figura 13: Expressão do mRNA de IFN- β nos macrófagos de C57BL/6 e BALB/c.

Figura 14: Produção de NO pelos macrófagos de C57BL/6 e BALB/c estimulados com poli(I:C).

Figura 15: Efeito da neutralização de IFN- β na produção de NO pelos macrófagos de C57BL/6 e BALB/c.

Figura 16: Efeito da neutralização de IFN- β na ativação de STAT-1 nos macrófagos de C57BL/6.

Figura 17: Produção de TNF- α e IL-10 pelos macrófagos de C57BL/6 e BALB/c.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Sequências nucleotídicas dos *primers* utilizados no *Real Time* PCR.

LISTA DE ABREVIATURAS

µg: micrograma

µL: microlitro

APC: célula apresentadora de antígeno

APRIL: ligante indutor de proliferação

BH4: tetrahidrobiopterina

BMMD: macrófago derivado de medula óssea

BSA: soroalbumina bovina

C/EBP: proteína intensificadora de ligação a CCAAT

CaM: calmodulina

CD: do inglês *Cluster of Differentiation*

cdNA: ácido desoxirribonucleico complementar

CHX: cicloheximida

CREB: proteína de ligante ao elemento responsivo do cAMP

Ct: do inglês *threshold cycle*

DAMP: padrão molecular associado ao perigo

DNA: ácido desoxirribonucléico

ELISA: ensaio de absorção imunoenzimático

eNOS: óxido nítrico sintase endotelial (eNOS)

ERK: cinase regulada por sinal extracelular

FAD: dinucleotídeo de flavina-adenina

FMN: mononucleotídeo de flavina

G-CSF: fator estimulante de granulócito

GM-CSF: fator estimulante de macrófago e granulócitos

GPI: glicosil fosfatidil inositol

HBSS: *Hank's Balanced Salt Solution*

IFN (-α, -β, -γ): interferon (alfa, beta, 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
JNK: c-Jun N-terminal cinase
kDa: quilodaltons
LBP: proteína de ligação ao LPS
LPS: lipopolissacarídeo
LRR: rico em repetições de leucina
MAL: adaptador semelhante a MyD88
MAPK: proteína cinase ativada por mitógeno
MBL: lectina ligadora de manose
M-CSF (LCCM): fator estimulador de colônias de monócitos
mg: miligrama
MHC: complexo principal de histocompatibilidade
MIF: fator inibidor da migração de macrófagos
MKK6: MAP cinase cinase 6
mL: mililitro
mM: milimolar
MTT: brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio
MyD88: fator de diferenciação miéloide 88
NADPH: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NF-IL-6: fator nuclear IL-6
NF-κB: fator nuclear kappa B
NK: *natural killer*
NLR: receptores semelhantes a NOD
nNOS: óxido nítrico sintase neuronal
NO: óxido nítrico
NOD: domínio de oligomerização de nucleotídeos
NOS: óxido nítrico sintase
Oct (-1, -2): fator octâmero (-1, -2)
PAMP: padrão molecular associado à patógeno
pb: pares de bases
PBS: tampão salina fosfato
PCR: reação em cadeia pela polimerase
PPAR: receptor ativado por proliferador do peroxissomo
PRR: receptor de reconhecimento de padrão

RLH: helicase semelhante a RIG
RNA: ácido ribonucléico
RNS: espécies reativas de nitrogênio
ROS: espécies reativas de oxigênio
rpm: rotações por minuto
SARM: do inglês, *sterile- and armadillo-motif-containing protein*
SDS: dodecilsulfato de sódio
SFB: soro fetal bovino
STAT: transdutor de sinal e ativador da transcrição
TAK1: TGF- β cinase ativada
TBS: tampão Tris-HCl salina
TGF- β : fator de transformação do crescimento beta
Th: *T helper*
TICAM: molécula adaptadora contendo o domínio TIR
TIR: região homóloga de receptores Toll/IL-1-receptor
TIRAP: proteína adaptadora contendo o domínio TIR
TLR: receptores semelhantes ao Toll
TNF- α : fator de necrose tumoral alfa
TRAF6: fator 6 associado ao receptor de TNF
TRAIL: ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF
TRAM: molécula adaptadora relacionada à TRIF
TRIF: adaptador indutor de interferon- β que contém o domínio TIR
UTR: região não traduzida

Sumário

Resumo	XV
Abstract	XVI
1. Introdução	1
1.1. A resposta imune inata contra patógenos	2
1.2. Sinalização celular induzida por LPS.....	7
1.3. Os macrófagos.....	9
1.4. O NO na resposta imune	12
1.5. A Óxido nítrico sintase (NOS).....	16
1.6. Regulação da expressão e atividade da iNOS	19
1.7. Resistência versus susceptibilidade de hospedeiros à infecção por microrganismos intracelulares	24
2. Objetivos	27
3. Material e Métodos	29
3.1. Animais.....	30
3.2. Obtenção de macrófagos peritoneais de camundongos	30
3.3. Obtenção de macrófagos derivados da medula óssea (BMDM).....	30
3.4. Ensaio de Viabilidade Celular	31
3.5. Quantificação da produção de NO por macrófagos.....	32
3.6. Extrato protéico total	32
3.7. SDS-PAGE e Western Blot	32
3.8. Extração de RNA e Real Time PCR.....	33

3.9. Análise da taxa de degradação da proteína iNOS.....	34
3.10. Determinação da atividade de arginase	34
3.11. Análise da expressão de TLR4 por citometria de fluxo.....	35
3.12. Ensaio de neutralização de IFN- β	35
3.13. Dosagem de citocinas	36
3.14. Análise estatística	36
4. Resultados	37
4.1. Curva dose-resposta e cinética de produção de NO por macrófagos estimulados com LPS	38
4.2. Análise da viabilidade celular.....	40
4.3. Balanço entre iNOS x Arginase.....	41
4.3.1. Expressão do mRNA das isoformas arginase I e arginase II.....	41
4.3.2. Atividade de arginase	41
4.4. Expressão da proteína iNOS	43
4.5. Análise da degradação da proteína iNOS	45
4.6. Expressão de mRNA de iNOS.....	47
4.7. Análise da expressão do TLR4 na membrana celular dos macrófagos.....	49
4.8. Ativação do fator de transcrição NF- κ B.....	52
4.9. Ativação do fator de transcrição STAT-1	54
4.10. Análise da produção de IFN- β , um indutor da ativação do STAT-1 estimulado por LPS	56
4.11. Análise do Papel do IFN- β	58
4.12. Análise da produção de citocinas.....	63
5. Discussão	65

6. Conclusão	75
7. Referências Bibliográficas	77

Resumo

Os macrófagos de camundongos C57BL/6 produzem níveis maiores de NO que os macrófagos de camundongos BALB/c quando estimulados com LPS. Este trabalho teve como objetivo investigar os mecanismos moleculares que determinam esta produção diferencial intrínseca de NO pelos macrófagos de C57BL/6 e BALB/c. Analisando inicialmente a influencia da arginase, observamos que, embora as isoformas desta enzima sejam diferencialmente expressas nos macrófagos de C57BL/6 e BALB/c, a atividade total da arginase não difere nestas células e, portanto, não deve ser responsável pela diferença na produção de NO nas duas linhagens de camundongos. A menor produção de NO pelos macrófagos de BALB/c foi correlacionada com a menor expressão da proteína e do mRNA da iNOS. Nosso grupo já havia mostrado que a menor expressão do mRNA da iNOS não é devida a uma maior degradação desta molécula e, neste trabalho mostramos que a menor expressão da proteína iNOS também é independente de sua taxa de degradação. Esses dados sugeriram que a transcrição do gene da iNOS deve ser menos eficiente nos macrófagos de BALB/c do que de C57BL/6. A análise de dois fatores de transcrição importantes para a transcrição do gene da iNOS mostrou que, enquanto a ativação do NF- κ B não se correlaciona com a expressão da iNOS nos macrófagos desses camundongos, a ativação do STAT-1 é maior em macrófagos de camundongos C57BL/6 do que em camundongos BALB/c. Foi mostrado ainda que os macrófagos de C57BL/6 expressam mais TLR4, IFN- β e IL-10 e menos TNF- α do que células de BALB/c. No entanto, não há uma correlação entre a expressão de IL-10 e TNF- α , uma vez que estas citocinas são conhecidas por respectivamente, inibir e estimular a produção de NO em macrófagos. A produção diferencial de IL-10 e TNF- α também pode ser devido à produção diferencial de IFN- β , já que esta citocina é capaz de induzir a produção de IL-10 que por sua vez inibe a produção de TNF- α . A neutralização do IFN- β aboliu a ativação de STAT-1 e diminuiu a produção de NO em camundongos C57BL/6 para níveis semelhantes aos produzidos por camundongos BALB/c, mostrando que o IFN- β é determinante para o acréscimo na produção de NO por macrófagos de C57BL/6 em relação aos de BALB/c. Assim, é possível concluir que macrófagos de BALB/c produzem menos NO que os macrófagos de C57BL/6 devido a uma deficiência na sinalização mediada por TLR4 que leva à produção de IFN- β e conseqüentemente à ativação de STAT-1.

Abstract

Macrophages from C57BL/6 mice innately produce higher levels of NO than macrophages from BALB/c mice when stimulated with LPS. The aim of this work was to investigate the molecular events that account for the intrinsic differential production of NO in C57BL/6 and BALB/c macrophages. By initially analyzing the influence of arginase, we observed that although the enzyme isoforms are differentially expressed in C57BL/6 and BALB/c macrophages, the total activity of arginase is equivalent in these cells, and therefore may not be responsible for the difference in the production of NO by these two strains of mice. The lower production of NO in BALB/c macrophages correlates with a lower iNOS mRNA and protein accumulation. Our group has previously shown that the lower expression of iNOS mRNA is not due to a higher degradation of this molecule and in the present work, we show that the lower expression of iNOS protein is also independent of its degradation rate. These data suggested that *iNOS* transcription is less efficient in BALB/c than in C57BL/6. Analysis of two transcription factors involved in *iNOS* transcription showed that activation of NF- κ B does not correlate with iNOS expression. Conversely, activation of STAT-1 was more prominent in C57BL/6 than BALB/c macrophages. Furthermore, we showed that C57BL/6 macrophages express more TLR4, IFN- β , and IL-10 and less TNF- α than BALB/c cells. However, there is no correlation between the expression of IL-10 and TNF- α , since these cytokines respectively inhibit and stimulate the production of NO. The differential production of IL-10 and TNF- α can also be due to the differential production of IFN- β , since this cytokine induces the production of IL-10, which, in turn, inhibits production of TNF- α . Anti-IFN- β neutralizing antibodies abolished STAT-1 activation and reduced NO production in C57BL/6 macrophages to surplus of NO production in C57BL/6 macrophages in relation to BALB/c cells. Therefore, our results suggest that macrophages from BALB/c mice are innately lower NO producers than macrophages from C57BL/6 mice because they are defective in the TLR4-mediated signaling that induces the production of IFN- β and consequently the activation of STAT-1.

*Mecanismos moleculares determinantes da sensibilidade diferencial de macrófagos
de camundongos C57BL/6 e BALB/c a LPS para produção de NO*

1. Introdução

1.1. A resposta imune inata contra patógenos

O sistema imune dos mamíferos é composto por dois componentes, imunidade inata e imunidade adaptativa, que interagem entre si contribuindo para a eliminação mais eficiente de patógenos. A imunidade inata é um sistema evolucionariamente conservado e fornece a primeira linha de defesa do organismo contra microrganismos, mas é frequentemente insuficiente para superar os mecanismos de virulência dos patógenos. Em contraste, a imunidade adaptativa é altamente específica e está envolvida na eliminação dos patógenos na fase tardia da infecção bem como geração da memória imunológica (Abbas *et al.*, 2008; Kawai & Akira, 2009).

Como a presença de microrganismos comensais na pele e epitélios de superfícies internas, tais como trato digestivo, não é perigosa, mas sim benéfica, a primeira tarefa do sistema imune é distinguir microrganismos patogênicos dos não patogênicos. O sistema imune inato reconhece os microrganismos por meio de um número limitado de Receptores de Reconhecimento de Padrão (PRRs – *Pattern Recognition Receptors*), que levam à ativação de diferentes componentes do sistema imune inato tanto humorais como celulares. Os PRRs possuem algumas características em comum: 1) reconhecem componentes microbianos compartilhados por vários microrganismos conhecidos como Padrões Moleculares Associados aos Patógenos (PAMPs – *Pathogen-Associated Molecular Patterns*) que, sendo essenciais para a sobrevivência dos mesmos, dificilmente são alterados; 2) são expressos constitutivamente no hospedeiro e detectam o patógeno independente do seu estágio de ciclo de vida; 3) são codificados na linhagem germinativa e expressos em todas as células de um determinado tipo e independente da memória imunológica (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*). As células que estão diretamente infectadas ou estão na vizinhança de outras células infectadas podem aumentar a expressão de DAMPs. Desta maneira, a imunidade inata pode contribuir para eliminação de células que contêm patógenos, mesmo se os produtos microbianos não forem expostos (Abbas *et al.*, 2008; Villaseñor-Cardoso & Ortega, 2011).

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*), Helicases semelhantes a RIG (RLHs – *RIG-like helicases*) e Lectina ligadora de manose (MBL – *Mannose-binding lectin*) (Kawai & Akira, 2009; Villaseñor-Cardoso & Ortega, 2011).

Os PRRs mais estudados são os TLRs. Os TLRs são glicoproteínas integrais de membrana tipo I caracterizados por um domínio de ligação extracelular contendo motivos ricos em repetições de leucina (LRR – *leucin-rich repeat*) e um domínio de sinalização citoplasmático homólogo ao receptor de interleucina-1 denominado de domínio TIR (*Toll-Interleukin-1 Receptor*) (Fig. 1A) (Bowie & O'Neill, 2000). Estes receptores foram inicialmente clonados em *Drosophila*, mas, em 1997, Medzhitov e colaboradores descreveram a presença de uma proteína semelhante ao Toll de *Drosophila* em várias células ou linhagens celulares de camundongos ou humanos que era capaz de induzir sinais para a ativação da resposta imune inata e adaptativa (Medzhitov *et al.*, 1997).

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 TLR10 em humanos e os TLR12 e TLR13 em camundongos ainda não foram bem caracterizados e suas funções permanecem desconhecidas. Os membros da família dos TLR são expressos em uma variedade de células e tecidos incluindo células imunes efectoras, células dendríticas, linfócitos T e B e também em outras células que não pertencem ao sistema imune (Egan *et al.*, 2009; Kumar *et al.*, 2011; Villaseñor-Cardoso & Ortega, 2011).

Os TLRs reconhecem uma grande faixa de moléculas microbianas incluindo lipopolissacarídeo (LPS) bacteriano (TLR4), carboidratos e lipídeos expressos por bactérias gram-positivas (TLR1, TLR2, TLR6), flagelina (TLR5) e ácidos nucléicos virais, bacterianos ou de alguns protozoários (TLR3, TLR7, TLR8 e TLR9). Os

membros da família dos TLRs podem ser divididos em duas subpopulações de acordo com a sua localização celular. Os TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 e TLR11 são descritos como expressos exclusivamente na superfície celular. Por outro lado, TLR3, TLR7, TLR8 e TLR9 são encontrados 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 (Teixeira *et al*, 2002; Egan *et al.*, 2009; Kawai & Akira, 2009).

A ativação dos TLRs nas células é acompanhada pela maior capacidade de expressão de moléculas coestimulatórias, apresentação de antígenos, secreção de citocinas pró-inflamatórias e promoção da morte microbiana. Após o reconhecimento do ligante, os TLRs se dimerizam e sofrem 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 (*Myeloid Differentiation factor 88*), 2) TIRAP (*TIR domain-containing adaptor protein*) ou MAL (*MyD88-adaptor-like*), 3) TRIF (*TIR domain-containing adaptor protein inducing IFN*) ou TICAM1 (*TIR-containing adaptor molecule 1*), 4) TRAM (*TRIF-related adaptor molecule*) ou TICAM2 (*TIR-containing adaptor molecule 2*). Uma quinta molécula chamada de SARM (*sterile- and armadillo-motif-containing protein*), ortóloga de proteínas de *Drosophila* e *Caenorhabditis elegans*, também contem o domínio TIR na sua porção C-terminal, mas, este adaptador não é capaz de ativar a via do NF (*nuclear factor*)- κ B ou do IRF (*interferon regulatory factor*)-3 e, portanto, o seu papel na sinalização por TLRs é desconhecido. Após o recrutamento de proteínas adaptadoras, proteínas cinases são requeridas para a fosforilação de fatores de transcrição que se translocam ao núcleo e promovem a síntese de interferon do tipo I, moléculas pró-inflamatórias e outras citocinas (Fitzgerald *et al*, 2004; Villaseñor-Cardoso & Ortega, 2011).

A molécula adaptadora MyD88 desempenha um papel central na sinalização desencadeada pela ativação dos TLRs, com exceção de TLR3, bem como na sinalização mediada pelos receptores de IL-1 e IL-18. A proteína MyD88 recruta as proteínas IRAK (*IL-1R-associated kinase*) 1 e 4. Estas formam um complexo com TRAF6 (*TNF receptor-associated factor 6*) que juntamente com Ubc13 e Uva1 agem como uma

ubiquitina ligase (E3) promovendo a poliubiquitinação de TRAF6. O complexo formado por TAK1 (*TGF- β -activated kinase 1*) e pelas proteínas de ligação a TAK1, TAB1, TAB2 e TAB3, é também recrutado por TRAF6. A cinase TAK-1 fosforila IKK- β (IKK – *I κ B kinase*) e MKK6 (*MAP kinase kinase 6*) que modulam a ativação de NF- κ B e MAP cinases (MAPKs – *Mitogen-activated protein kinases*), resultando na indução de vários genes envolvidos na resposta inflamatória (Fig. 1B) (Akira *et al.*, 2006; Abbas *et al.*, 2008; Egan, *et al.* 2009).

Os TLR1, TLR2, TLR4 e TLR6 recrutam a proteína adaptadora MAL para iniciar a cascata de sinalização dependente de MyD88. O TLR4, assim como o TLR3, pode recrutar também TRIF, por meio da molécula adaptadora TRAM e iniciar outro tipo de sinalização independente de MyD88. Assim, TLR4 é capaz de ativar ambas as vias de sinalização: a dependente de MyD88 e a dependente de TRIF, por intermédio do recrutamento de quatro moléculas adaptadoras. O TLR4 primeiro recruta MAL ou TIRAP que facilita o recrutamento de MyD88 para iniciar a primeira fase de ativação do NF- κ B e MAP cinases. Para a sinalização dependente de TRIF, TLR4 é endocitado de forma dependente de dinamina e, no endossomo, forma um complexo com TRAF e TRIF. Esse complexo inicia a sinalização dependente de TRIF necessária para a ativação de IRF3 e consequente indução de interferon do tipo I. Esta via de sinalização ativa a segunda fase de ativação do NF- κ B e MAP cinases que culminará na indução de citocinas inflamatórias (Kumar *et al.*, 2011).

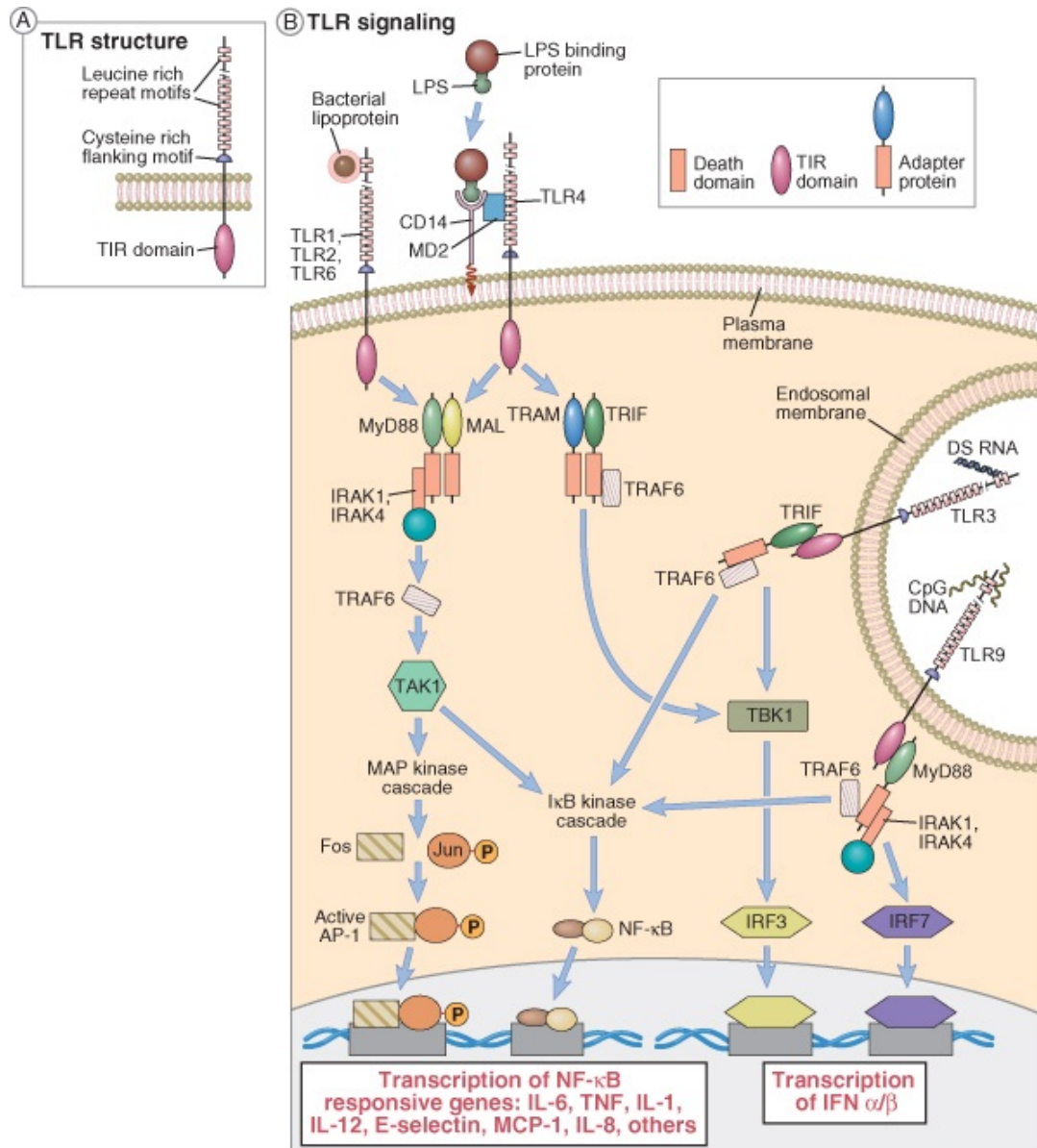


Figura 1. Sinalização via os receptores semelhante ao Toll. A) Estrutura dos TLRs mostrando o domínio contendo repetições ricas em leucinas (LRR) e o domínio de homologia a TIR citoplasmático. B) Sinalização celular pela via de alguns TLRs em resposta aos padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs) específicos (Abbas *et al.*, 2008).

As principais células que expressam os TLRs são as células apresentadoras de antígenos (APCs – *Antigen-Presenting Cells*) tais como células dendríticas e macrófagos. As APCs também ativam a imunidade adaptativa por migrarem do sítio de infecção aos linfonodos onde apresentam os antígenos derivados dos microrganismos a células T CD4⁺ *naive*. Além disso, as APCs apresentam moléculas coestimuladoras essenciais para a ativação de células T que podem instruir a diferenciação das células T CD4⁺ *naive* em células T *helper* 1 (Th1) ou T *helper* 2 (Th2). As células Th1 produzem preferencialmente IFN- γ e medeiam a eliminação das bactérias ou vírus, enquanto as células Th2, produzem IL-4 e IL-13, entre outras citocinas, e estão envolvidas na resposta contra a infecção por helmintos (Akira *et al.*, 2006; Abbas *et al.*, 2008).

1.2. Sinalização celular induzida por LPS

O LPS é o componente principal da membrana externa das bactérias gram-negativas e consiste do lipídeo A, do centro polissacarídeo e do antígeno O. O lipídeo A, ou endotoxina, é o padrão molecular conservado do LPS e, por isto é a única região do LPS que é reconhecida pelo sistema imune inato. O LPS é reconhecido principalmente pelo receptor de LPS de mamíferos, o 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, o qual é uma proteína de membrana de alta-afinidade ancorada por GPI (*glycosyl phosphatidylinositol*), 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. A proteína MD2 associa com o domínio extracelular de TLR4 e funciona como o componente de ligação ao LPS no complexo TLR4-MD2 (Kawai & Akira, 2009). O complexo do TLR4 é mais “promíscuo” em camundongos que em humanos. Por exemplo, o lipídeo IV A, que é um intermediário da via biossintética do lipídeo A de *Yersinia pestis*, estimula o TLR4 de camundongos, mas só é reconhecido por TLR4 humano em altas concentrações (Miller *et al.*, 2005).

É importante notar que a maioria dos estudos de ativação imune inata mediada por LPS utiliza o LPS de bactérias da família *Enterobacteriaceae*. As moléculas de lipídeo A de diferentes espécies bacterianas apresentam algum grau de variação e isso pode causar impacto nas vias de reconhecimento celular da imunidade inata. Por

exemplo, LPS de *Porphyromonas gingivalis* e *Helicobacter pylori* são reconhecidos principalmente por TLR2. Como as vias de sinalização de TLR2 e TLR4 se sobrepõem, mas não são idênticas, o LPS de diferentes fontes bacterianas nem sempre desencadeará respostas biológicas idênticas. Provavelmente, múltiplas MAP3 cinases (MAP3K) estão envolvidas na ativação mediada por LPS de NF- κ B, p38 MAP cinase, JNK (*c-Jun N-terminal kinase*) e ERKs (*Extracellular signal-regulated kinase*) por intermédio da via MyD88-TRAF6 (Rossol *et al.*, 2011).

A regulação gênica é o mecanismo central pelo qual a maioria das respostas biológicas ativadas por LPS são controladas. O LPS modula a expressão de milhares de genes através de vários mecanismos, incluindo regulação transcricional direta ou indireta via expressão de genes induzíveis e regulação pós-transcricional via estabilidade do mRNA, por exemplo. Além das modificações pós-transcricionais de fatores de transcrição pré-existentes, o LPS também age por meio de mecanismos tardios para a modulação da transcrição de genes. Por exemplo, fatores secretados induzíveis tais como IFN- β e IL-10 agem de forma autócrina ativando vias de sinalização secundárias que modulam a expressão de genes alvos e/ou regulam genes alvos alternativos. O IFN do tipo I induzido por LPS, age de forma autócrina para direcionar uma “segunda onda” de expressão de genes inflamatórios em uma maneira dependente do transdutor de sinal e ativador da transcrição 1 (STAT-1 – *signal transducer and activator of transcription 1*) (Rossol *et al.*, 2011).

A sinalização induzida por LPS resulta na expressão de genes envolvidos na inflamação, resposta antimicrobiana direta, apresentação de antígenos, sobrevivência, proliferação ou morte celular. As citocinas induzidas por LPS são moléculas chaves na regulação dos processos inflamatórios. Os monócitos e macrófagos produzem uma grande variedade de citocinas tais como: TNF- α , IL-1 α ou β , IL-6, IL-10, IL-12, IL-15, IL-23, IFN- β , TGF- β (*Transforming growth factor β*), M-CSF (*Macrophage colony-stimulating factor*), G-CSF (*Granulocyte colony-stimulating factor*), GM-CSF (*Granulocyte macrophage colony-stimulating factor*), MIF (*Macrophage Migration Inhibitory Factor*), APRIL (*a proliferation-inducing ligand*) e TRAIL (*TNF-related apoptosis-inducing ligand*). Essas citocinas secretadas desempenham papéis diferentes durante a inflamação. Algumas neutralizam a inflamação (anti-inflamatórias) enquanto outras promovem a inflamação (pró-inflamatórias). O padrão de expressão de citocinas

mediado por LPS apresenta diferenças entre os vários tipos celulares bem como entre camundongos e humanos. Porém, algumas citocinas tais como TNF- α , IL1- β , IL-6, IL-10 e IL-12 são expressas em macrófagos tanto humanos quanto de camundongos após estimulação por LPS (Rossol *et al.*, 2011).

1.3. Os macrófagos

O termo macrófago foi criado por Elie Metchnikoff após observar um tipo celular ameboide ao redor de um espinho de rosa espetado em uma larva de estrela-do-mar (Zanoni & Granucci, 2010). Os monócitos foram considerados por muito tempo como os únicos precursores dos macrófagos. Entretanto, populações de macrófagos em tecidos (tais como fígado e baço) são estabelecidas durante o desenvolvimento embrionário a partir de progenitores derivados do saco vitelino ou fígado fetal e são mantidas independentemente dos monócitos derivados da medula óssea em condições estáveis (Hettinger *et al.*, 2013). Os monócitos entram na circulação sanguínea e são transportados até os tecidos periféricos onde encontram um grande número de diferentes agentes incluindo, citocinas, quimiocinas, hormônios e outras moléculas. Estes agentes irão determinar as características fenotípicas e funcionais dos macrófagos residentes nos tecidos que são as células completamente diferenciadas. Diferentemente das células dendríticas, os macrófagos que contribuem para o início dos processos inflamatórios nos tecidos não morrem após serem ativados e são cruciais para a resolução da inflamação (Zanoni & Granucci, 2010).

Os macrófagos tissulares são distinguidos das células dendríticas pela expressão de F4/80, CD11b e receptores Fc. Em termos funcionais, enquanto as células dendríticas servem como os principais indutores da resposta adaptativa de células T, os macrófagos possuem atividade catabólica e proteolítica e são mais qualificados a ingerir os patógenos por fagocitose, remover células mortas e *debris* celulares e remodelar tecidos após alguma injúria (Mosser & Edwards, 2008; Galli *et al.*, 2011). São macrófagos tissulares: os osteoclastos (ossos), microglia (cérebro), macrófagos alveolares (pulmão), histiócitos (tecido conectivo intersticial) e células de Kupffer (fígado). Há também subpopulações de fagócitos mononucleares na circulação e no baço que podem se diferenciar em macrófagos (Galli *et al.*, 2011).

A interação inicial entre os motivos conservados de patógenos e os macrófagos induz um estado *primado* nestas células. Os receptores para essa ativação inicial incluem principalmente os PRRs tais como TLR, NALPs e outros receptores de superfície e citosólicos. Os PRRs mais bem conhecidos, como os TLRs, são frequentemente responsáveis pela ativação inata pró-Th1 dos macrófagos baseado na expressão seletiva de IL-12, diminuição dos níveis de IL-10 e expressão de quimiocinas e outros fatores que medeiam o recrutamento e ativação de células acessórias seletivas tais como células NK (*natural killer*), eosinófilos, basófilos entre outras. Pouco é conhecido sobre os PRRs que iniciam a resposta Th2 embora alguns resultados demonstrem a presença de PAMPs pró-Th2 e TLRs em parasitas e macrófagos respectivamente (Martinez *et al.*, 2009).

Em nosso laboratório, Santos (1997), estudando, *in vitro*, a infecção de macrófagos de camundongos C57BL/6 e BALB/c (linhagens de camundongos que produzem, preferencialmente, uma resposta Th1 ou Th2, respectivamente) com *Leishmania amazonensis*, mostrou que macrófagos de camundongos C57BL/6 são capazes de produzir mais óxido nítrico (NO - *nitric oxide*) que células de camundongos BALB/c. Prosseguindo esses estudos, nosso grupo mostrou também que macrófagos de camundongos C57BL/6 não infectados produzem muito mais NO que células de animais BALB/c quando estimulados com doses idênticas de IFN- γ e LPS. Essa resposta é, portanto, intrínseca do macrófago e independente do camundongo ter iniciado uma resposta Th1 ou Th2 (Santos, 2002).

Em 2000, Mills e colaboradores publicaram evidências de que macrófagos não somente diferem na habilidade de serem ativados no sentido clássico (com produção de mais ou menos NO), como também fazem respostas qualitativamente diferentes ao mesmo estímulo, *in vitro*. Assim, eles mostraram que macrófagos de linhagens Th1 produzem mais óxido nítrico e citrulina que macrófagos de linhagens Th2, os quais produzem mais uréia e ornitina quando estimulados com LPS e/ou IFN- γ . Também importante foi a descoberta de que esses macrófagos estimulavam a resposta Th1 ou Th2, sendo então designados de M-1 e M-2, respectivamente.

Porém, muitos trabalhos utilizam a nomenclatura M1 e M2 para definir dois fenótipos de ativação dos macrófagos: os classicamente ativados, chamados de M1 e os alternativamente ativados, denominados de M2 (Mosser & Edwards, 2008; Biswas &

Mantovani, 2010). No entanto, há que se entender que são situações diferentes. Enquanto a nomenclatura original dada por Mills e colaboradores (2000) descreve macrófagos de linhagens de camundongos diferentes, estimulados com o mesmo estímulo (LPS e/ou IFN- γ), a nomenclatura mais atual descreve os fenótipos observados em um mesmo macrófago ativado com estímulos diferentes.

Assim, os macrófagos chamados de classicamente ativados são aqueles ativados com uma citocina derivada de resposta Th1, o IFN- γ e endotoxinas bacterianas, como o LPS. Os macrófagos classicamente ativados apresentam uma super-regulação de várias citocinas pró-inflamatórias e quimionas (TNF- α , IL-12, IL-6, IL-1 β , CXCL9 e CXCL10), aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS – *reactive oxygen species*) e intermediários de nitrogênio, uma maior expressão do complexo de histocompatibilidade classe II (MHC II – *major histocompatibility complex class II*) e moléculas coestimuladoras, além de maior eficiência na apresentação de antígenos e atividade microbicida e tumoricida. Os macrófagos classicamente ativados, por meio da expressão de citocinas e quimiocinas como IL-12, CXCL9 e CXCL10, direcionam a polarização e o recrutamento de células Th1, amplificando a resposta Th1, e por isso foram denominados de M1 (Mosser & Edwards, 2008; Biswas & Mantovani, 2010; Lopez-Castejón *et al.*, 2011).

Em contraste, os macrófagos alternativamente ativados são aqueles ativados, principalmente, por IL-4 ou IL-13, citocinas derivadas de células Th2 durante uma infecção helmíntica ou um processo alérgico. Estes macrófagos alternativamente ativados apresentam uma super-regulação de receptores *scavenger*, receptores de manose e de galactose, arginase-1, Fizz1 e Ym1 e maior produção de ornitina e poliaminas através da via da arginase. Os macrófagos ativados por IL-4 expressam um conjunto distinto de quimiocinas, incluindo CCL17, CCL22 e CCL24 cujos receptores correspondentes estão presentes em células T reguladoras (*Treg*), células Th2, eosinófilos e basófilos. Assim, a liberação dessas quimiocinas resulta no recrutamento dessas células e amplificação da resposta Th2, e por isso esses macrófagos foram denominados de M2. Em geral, os macrófagos alternativamente ativados tem uma maior atividade fagocítica, ajudando na limpeza dos parasitas e diminuição da inflamação, promovendo o remodelamento de tecidos e a progressão de tumores e possuem funções imunoreguladoras (Mosser & Edwards, 2008; Biswas & Mantovani, 2010; Lopez-

Castejón *et al.*, 2011). De acordo com seus ativadores *in vitro*, os macrófagos alternativamente ativados são divididos em três grupos: M2a, ou ativados por IL-4 e/ou IL-13, M2b, ativados por imunocomplexos associado a ligantes de TLRs, e M2c, ativados por glicocorticoides, IL-10 ou TGF- β . Os macrófagos M2a são os mais bem caracterizados e por isso o termo alternativamente ativado é frequentemente utilizado para denominar apenas esta população celular (Martinez *et al.*, 2008; Mosser & Edwards, 2008).

Embora esta classificação dos macrófagos seja útil, ela não representa completamente a complexidade dos estados transicionais de ativação destas células que frequentemente são ajustados em resposta a diferentes microambientes. Há um grande número de fatores que contribuem para a diversidade de funções dos macrófagos, incluindo os efeitos sinérgicos e antagônicos de diferentes citocinas e sinais relacionados a sua expressão diferencial, quimiocinas, hormônios, ligantes de TLRs e outros ligantes endógenos como, por exemplo, histamina, ligantes de integrinas, ligantes do receptor ativado por proliferador do peroxissomo (PPAR – *Peroxisome proliferator-activated receptor*) e células apoptóticas. Essa abundância de sinais realça o fato que macrófagos podem apresentar um grande número de padrões funcionais distintos que não estão ainda completamente definidos. Além disso, macrófagos idênticos localizados em microambientes diferentes podem apresentar funções diferentes em resposta a um estímulo comum. A estimulação dos macrófagos com citocinas de funções opostas, como IFN- γ e IL-4, inicia uma cascata de sinalização que resulta na modulação diferencial de diferentes genes a nível transcricional e pós-transcricional. A menos que a cascata de sinalização inicie uma cascata apoptótica, os macrófagos irão eventualmente retornar ao seu estado funcional original após o fim da sinalização da citocina. Portanto, a maioria das citocinas Th1 e Th2 parece não induzir um estado de diferenciação estável dos macrófagos em subconjuntos distintos, mas promovem um padrão de resposta funcional transiente que posteriormente retorna ao nível basal (Cassata *et al.*, 2011).

1.4. O NO na resposta imune

O NO é uma molécula gasosa reativa que influencia a fisiologia e a fisiopatologia de vários organismos. Em baixas concentrações, o NO regula os processos fisiológicos enquanto, em altas concentrações, pode supostamente causar danos. Esta molécula foi primeiramente identificada como mediador primário da

vasodilatação dependente de endotélio em 1987 (Palmer *et al.*) e é principalmente gerada por óxido nítrico sintases (NOS – *Nitric oxide synthase*) a partir de L-arginina. Ele também pode ser gerado a partir de nitrito por certos sistemas redutores como cadeia respiratória e xantina oxidase em condições de hipóxia ou anóxicas (Gao, 2010).

A conexão entre NO e imunidade foi primeiramente feita por Hibbs e colaboradores (Hibbs *et al.*, 1987, Hibbs *et al.*, 1988) quando foi mostrado que uma substância liberada por macrófagos, que requeria arginina para sua produção, possuía atividade antipatogênica e antitumoricida. Posteriormente, foi mostrado que a ativação imune mediada por IL-2 aumentava os níveis de NO em pacientes e promovia a erradicação de tumor em camundongos (Hibbs *et al.*, 1992; Yim *et al.*, 1995). Estas evidências juntamente com vários outros trabalhos posteriores forneceram fortes indícios de que o NO desempenha um papel crítico na resposta imune e abriram uma porta para o entendimento da participação de moléculas redox e suas reações na imunidade e uma maior apreciação de sua importância (Wink *et al.*, 2011).

A geração de NO é uma característica genuína de células do sistema imune (células dendríticas, células NK, mastócitos e fagócitos incluindo monócitos, macrófagos, microglia, células de Kupffer, eosinófilos e neutrófilos) bem como outras células envolvidas nas reações imunes (células endoteliais, epiteliais, fibroblastos, queratinócitos, condrócitos, hepatócitos, mesangliais e células de Schwann). Dentre as várias ações biológicas do NO pode-se citar: vasodilatação, agregação plaquetária, comunicação interneuronal, motilidade gastrointestinal, resposta imune contra microrganismos e regulação gênica como, por exemplo, regulando a sua própria produção ao inibir a expressão da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS – *inducible nitric oxide synthase*) em células mesengliais e reprimindo a enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS – *endothelial nitric oxide synthase*) em células endoteliais de camundongos (Bogdan, 2001; Gutierrez *et al.*, 2009).

Em condições homeostáticas, NO é produzido em baixas concentrações e age como mensageiro intracelular e fator antioxidante. Em condições patológicas, espécies reativas de nitrogênio (RNS – *reactive nitrogen species*), derivadas do NO como o peroxinitrito (ONOO⁻), têm seus níveis elevados provocando danos à cadeia respiratória, inibição da síntese de ATP, liberação de citocromo c e indução de apoptose dependente de caspases (Gao, 2010).

O NO gerado em grandes quantidades nos macrófagos e outras células do sistema imune está criticamente envolvido na defesa do hospedeiro contra organismos infecciosos incluindo vírus, bactérias, fungos e protozoários. Mais especificamente, NO protege contra a infecção por *Leishmania major* (Assreuy *et al.*, 1994), *Leishmania amazonensis* (Santos, 1997; Mukbel *et al.*, 2007), *Leishmania donovani* (Murray & Nathan, 1999), *Toxoplasma gondii* (Adams *et al.*, 1990), *Trypanosoma cruzi* (Gutierrez *et al.*, 2009), *Plasmodium* sp. (Taylor-Robinson & Smith, 1999) e *Schistosoma mansoni* (Wynn *et al.*, 1994). A efetividade do NO como agente antimicrobiano irá depender da sua concentração local e do ambiente redox, bem como da sensibilidade do parasita a qual varia entre as diferentes cepas do patógeno (Gao, 2010).

O NO/RNS e as espécies reativas de oxigênio (ROS – *reactive oxygen species*) podem ser usadas separadamente ou em combinação nas respostas imunes. O óxido nítrico é relativamente não-reativo e reage diretamente somente com metais de transição no heme ou cobalamina, com ferro não-heme ou com radicais reativos tais como radicais formados durante a peroxidação de lipídeos. Esta última reação exemplifica a potente capacidade antioxidante do NO. O NO não reage diretamente com tióis ou outros nucleófilos, mas requer a ativação com superóxidos ou O₂ gerando RNS tais como peroxinitrito, NO₂ e N₂O₃. O peroxinitrito e o NO₂ podem oxidar substratos e o N₂O₃ é uma fonte primária de nitrosilação de substratos. A variedade de espécies químicas geradas a partir de NO/RNS e ROS fornece um arsenal que pode ser usado pelo sistema imune no combate aos patógenos (Wink *et al.*, 2011).

O NO exerce sua ampla atividade biológica ativando uma sequência de sinalização via ativação de guanilatos ciclases solúveis ou via sua reatividade química com a maioria das biomoléculas (Santolini, 2011). 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 reativos em resíduos de cisteína formando S-nitrosotiol. As proteínas que sofrem S-nitrosilação possuem um motivo consenso no qual, geralmente, a cisteína alvo está entre um aminoácido ácido e um básico na estrutura primária, terciária ou quaternária da proteína. A atividade antimicrobiana do NO pode ser resultante de mutação de DNA, inibição do reparo e síntese de DNA, inibição da síntese de proteínas, modificações em proteínas por S-nitrosilação, ADP-ribosilação ou nitração de tirosinas, inativação de enzimas por

rompimento de *clusters* Fe-S, dedos de zinco ou grupos heme ou por peroxidação de membranas lipídicas. O NO pode também inibir a respiração bacteriana, o que poderia explicar a indução de um estado persistente ou dormente em certos microrganismos incluindo *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; Illi *et al.*, 2009).

Na infecção por *T. cruzi*, por exemplo, o NO pode modificar quimicamente proteínas contendo cisteínas e/ou ligar a metaloproteínas que medeiam processos metabólicos cruciais. Um mecanismo adicional pelo qual o NO pode afetar o metabolismo de *T. cruzi* é a redução de fatores de crescimento disponíveis. Por exemplo, o ferro é um importante fator de crescimento para *T. cruzi* e o NO induz a nitrosilação do grupo heme da hemoglobina, a principal fonte de ferro para este parasita (Bogdan, 2001; Gutierrez *et al.*, 2009).

A maioria dos dados que mostram a relação entre NO e sinalização imune é derivada de linhagens de células tumorais ou de macrófagos de roedores que são fontes prontamente disponíveis de NO. No final dos anos 80 e início dos anos 90, os pesquisadores tentaram estender os resultados obtidos em roedores a fagócitos mononucleares humanos, mas tiveram dificuldades em demonstrar altos níveis de produção de NO e expressão de iNOS nestas células. Algumas explicações para estes resultados controversos de produção de NO em humanos são a dificuldade em detectar NO em macrófagos humanos *in vitro*, devido a perda da tetrahydrobiopterina (BH₄), um cofator necessário para a atividade catalítica da iNOS que não é constitutivamente expresso por monócitos e macrófagos humanos e também a baixa sensibilidade dos testes colorimétricos padrões de detecção de NO. Entretanto, *in vivo*, macrófagos humanos podem obter a tetrahydrobiopterina a partir de células vizinhas capazes de sintetizar esta molécula e métodos mais sensíveis podem ser usados para a detecção de NO (Chan *et al.*, 2001). Atualmente, é amplamente aceito que humanos fazem 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 quando comparados ao observado em roedores. Em humanos, a indução da proteína iNOS é dependente da combinação sinérgica de vários sinais imunes (Wink *et al.*, 2011). Weinberg (1998)

fez uma extensa revisão sobre a produção de NO e expressão da iNOS em fagócitos mononucleares humanos, listando uma série de trabalhos publicados entre 1989 a 1998 que mostram a produção de NO por células humanas.

1.5. A Óxido nítrico sintase (NOS)

Em mamíferos, o NO é sintetizado por uma família de enzimas chamadas de NO sintases (EC 1.14.13.39) que existem em três principais isoformas e algumas variantes por *splicing* alternativos. As três principais 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 (nNOS – *neuronal nitric oxide synthase* ou NOS1) e outra em células endoteliais (eNOS ou NOS3). 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. Todas as isoformas foram isoladas e clonadas no início dos anos 90 sendo que em humanos as três isoformas apresentam 51-57% de homologia entre si. Entre as diferentes espécies, a homologia varia de 80% para a iNOS, a 95% para as isoformas constitutivas (Bredt, 1999; Alderton *et al.*, 2001; Daff, 2010; Santolini, 2011).

As NOS catalisam dois passos sucessivos de oxidação de um único substrato, a L-arginina (L-arg). A reação química consiste da oxidação de cinco elétrons da L-arg consumindo três elétrons exógenos e duas moléculas de oxigênio. O primeiro passo consiste da hidroxilação do nitrogênio (N ω) do grupo guanidina da L-arg resultando na formação de um intermediário estável, a NOHA (N- ω -hidroxi-L-arginina). O segundo passo corresponde à oxidação do grupo hidroxiguanidina a uréia correspondente, L-citrulina. A reação completa leva à liberação de duas moléculas de água e uma molécula de NO (Fig. 2) (Santolini, 2011).

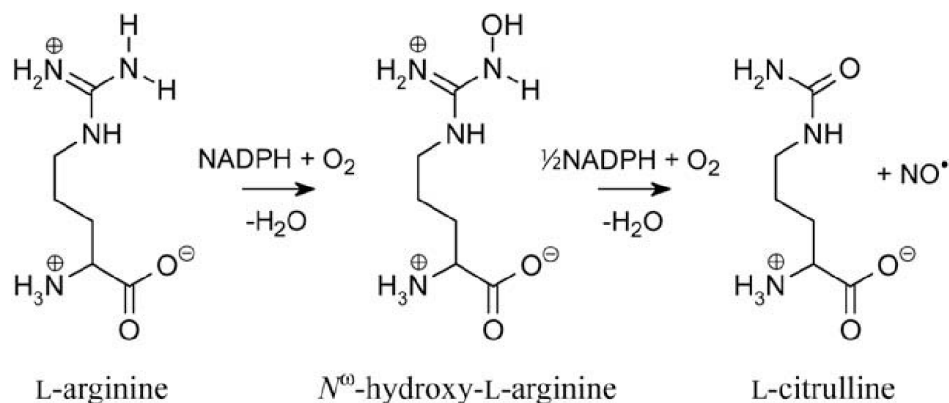


Figura 2. Esquema da reação de síntese de NO a partir da L-arginina (Daff, 2010). A síntese do NO a partir da L-arginina consiste em uma reação de duas etapas formando o intermediário N^ω-hidroxi-L-arginina.

A estrutura quaternária das NOS é homodimérica. Cada monômero compreende dois domínios funcionais em um único polipeptídeo: um domínio oxigenase N-terminal e um domínio redutase C-terminal, com sítios de ligação distintos para três cosubstratos (NADPH - *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*, oxigênio e L-arginina) e vários cofatores (Fig. 3). Os cofatores dessas enzimas são: (6R)-5,6,7,8-tetrahidrobiopterina (BH₄), duas diferentes flavinas (FMN – *flavin mononucleotide* e FAD – *flavin adenin dinucleotide*), protoporfirina IX ferro (heme) e a calmodulina (CaM) que é uma proteína reguladora. Alguns autores descrevem a estrutura das NOS como tetrâmeros, e não como dímeros, pois consideram as calmodulinas como parte da sua estrutura quaternária, assim seriam dois monômeros de NOS associados a duas CaMs. Várias proteínas bloqueiam a dimerização e a atividade das NOS, incluindo o inibidor da nNOS (PIN, *protein inhibitor of NOS*), o produto de macrófagos NAP110 (com 70% de homologia a proteína de células tumorais que inibe iNOS) e a proteína *kalirin* do sistema nervoso central que também inibe a iNOS e pode proteger o sistema nervoso durante processos inflamatórios (Alderton *et al.*, 2001; Bogdan, 2001; Santolini, 2011).

O domínio oxigenase N-terminal das NOS contém os sítios de ligação para L-arginina, heme e BH₄, e compreende o centro catalítico da enzima. O domínio redutase C-terminal é relacionado pela sequência, estrutura e função com a enzima Citocromo P450 redutase microssômica dependente de NADPH. Este domínio se liga ao FAD,

FMN e NADPH funcionando como fornecedor de equivalentes redutores para a ativação do oxigênio (Alderton *et al.*, 2001; Crane, 2008; Daff, 2010).

A calmodulina é o domínio de ligação que conecta os domínios oxigenase e redutase (Fig. 3) necessário para a eficiente transferência de elétrons de domínio redutase para o domínio oxigenase durante a produção de NO. A grande mudança conformacional que a ligação de CaM induz no domínio redutase permite que o FMN interaja com o FAD para aceitar elétrons e passar os elétrons ao heme durante a catálise. A calmodulina liga e ativa as NOS constitutivas (eNOS e nNOS) em concentrações celulares elevadas de Ca^{+2} . Em contraste, a iNOS liga a CaM de maneira independente do Ca^{+2} (Piazza *et al.*, 2012).

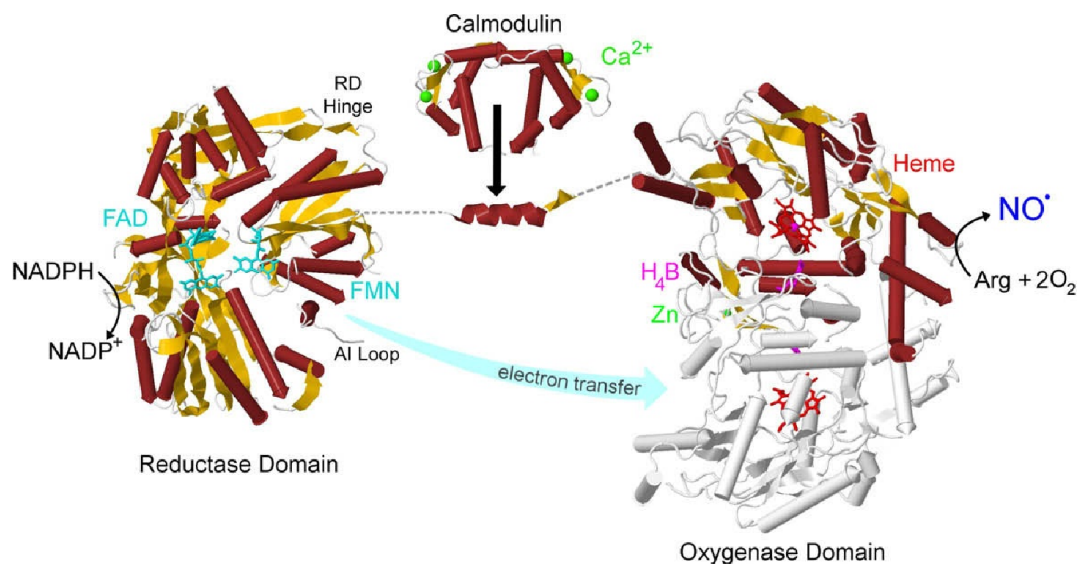


Figura 3. Estrutura das Óxido Nítrico Sintases (NOS) de mamíferos. Estrutura de diferentes fragmentos das NO sintases alinhados em ordem da sequência de aminoácidos (Daff, 2010).

Como o NO participa de diferentes processos fisiológicos, as NOS podem ter diversas funções. A eNOS é essencial para a vasodilatação e manutenção de um sistema cardiovascular saudável. A inibição química ou o *knockdown* da eNOS causa vasoconstrição, hipertensão e em alguns casos, aneurismas graves. Esta isoforma também participa da angiogênese regulando o fator de crescimento endotelial vascular. Como citado anteriormente, a nNOS pode ser encontrada em células nervosas bem como em células musculares. Fora do cérebro, a nNOS modula diversos processos como relaxamento da bexiga e respiração. Embora a nNOS esteja envolvida no processo

de potenciação de longa duração, camundongos *knockout* para nNOS são ainda capazes de realizar tarefas de memória e aprendizagem. A iNOS tem uma capacidade imunoprotetora, combatendo vários tipos de infecções. Esta isoforma não é expressa em células saudáveis, mas é rapidamente transcrita em resposta à doença. Diferentemente das outras isoformas, a iNOS pode produzir grande quantidade de NO em um curto período de tempo (Tennyson & Lippard, 2011).

Alguns variantes de *splicing* alternativo das NOS foram descritas. Lorenz e colaboradores (2007) descreveram três variantes de *splicing* alternativo da eNOS (eNOSA, eNOSB e eNOSC) que são expressas em células endoteliais e outros tecidos humanos. Essas isoformas apresentam expressão diferencial e também diferem na capacidade de formar heterodímeros, o que pode sugerir um novo mecanismo para a regulação da eNOS com possíveis implicações em doenças cardiovasculares. São conhecidos quatro variantes de *splicing* da nNOS (nNOSb, nNOSc, nNOSI e nNOS-2) além da isoforma de tamanho completo chamada de nNOSa. A regulação deste *splicing* alternativo e a significância biológica dessas isoformas ainda são pouco conhecidas. Transcritos de mRNA da iNOS que sofreram *splicing* alternativo também foram detectados em células epiteliais e em macrófagos alveolares humanos, que se traduzidos produziriam três proteínas com deleção no domínio heme (Alderton *et al.*, 2001).

1.6. Regulação da expressão e atividade da iNOS

A indução da isoforma iNOS é principalmente regulada ao nível de sua expressão. Os mecanismos que regulam a expressão da iNOS envolvem a modulação da atividade do promotor, estabilidade do mRNA e da proteína. O estímulo e as condições que determinam a expressão da iNOS são espécies específicos. Indutores da expressão da iNOS em um tipo celular pode não ter influencia, ou pode até mesmo inibir esta expressão em um outro tipo celular do mesmo organismo (Pautz *et al.*, 2010).

A expressão de iNOS é induzida principalmente por citocinas ou produtos microbianos, tais como IFN- γ , IFN- β , TNF- α , IL-2, IL-1 β e 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- γ , IL-1 β e TNF- α (Kleinert *et al.*, 2003). Os diferentes indutores da expressão de iNOS ativam diferentes vias de sinalização. Entretanto, de forma geral, a ativação ou inibição de JAKs e STATs e/ou

NF- κ B parecem ser o mecanismo central da indução por esses diferentes fatores (Kleinert *et al.*, 2004).

As sequências publicadas de promotores da iNOS clonados de diferentes espécies exibem homologias a sítios de ligação para numerosos fatores de transcrição incluindo: NF- κ B, AP-1 (*activating protein-1*), STAT-1, IRF1 (*Interferon regulatory factor 1*), NF-IL-6 (*nuclear factor IL-6*), C/EBP (*CCAAT-enhancer box binding protein*), CREB (*cAMP responsive element binding protein*), Oct-1 (*octamer factor-1*) e proteínas do grupo-I (Y) de alta mobilidade. Além disso, a sequência promotora contém duas regiões de repetições de GT- ou AC- consideradas susceptíveis para a formação de Z-DNA que podem conferir atividade *enhancer* (Xie *et al.*, 1993; Bogdan, 2001; Kleinert *et al.*, 2004).

O promotor da iNOS de todas espécies investigadas contém um TATA *box* cerca de 30 pares de bases (pb) a partir do sítio de início da transcrição. Próximo à região do TATA *box* todos os promotores de mamíferos contém sítios de ligação para o NF- κ B, NF-IL-6, fatores octâmeros e fatores de transcrição induzidos por TNF- α . O fator de transcrição NF- κ B parece ser o alvo central dos ativadores ou inibidores da expressão da iNOS. O LPS, IL-1 β , TNF- α e até mesmo o estresse oxidativo induzem a expressão da iNOS em diferentes células por ativar o NF- κ B. A inibição da expressão da iNOS por muitos agentes, tais como, glicocorticoides, TGF- β ou antioxidantes também parece ser resultado da inibição da ativação NF- κ B (Kleinert *et al.*, 2004, Pautz *et al.*, 2010).

O promotor murino da iNOS contém dois sítios putativos de ligação a NF- κ B, um *upstream* (GGGATTTTCC, denominado NF- κ Bu) e um *downstream* (GGGACTCTCC, denominada de NF- κ Bd). A região NF- κ Bu é idêntica ao sítio de NF- κ B no promotor de IL-6. Em contraste, a região NF- κ Bd parece ser exclusiva da iNOS. A indução de iNOS por LPS em células RAW 264.7 envolve a ligação de heterodímeros de NF- κ B (p50/c-Rel e p50/RelA) ao sítio de NF- κ Bd no promotor de iNOS. Além disso, uma região na sequência promotora da iNOS *upstream* a -722 pb é necessária para que o IFN- γ aumente sinergicamente a indução de iNOS por LPS. Essa região contém quatro cópias de elemento responsivo a IFN- γ (γ -IRE, *interferon-responsive element*), duas cópias do sítio γ -ativado (GAS, *gamma-activated site*), e duas cópias do elemento de resposta estimulado por IFN (ISRE, *interferon-stimulated responsive element*) (Martin *et al.*, 1994; Xie *et al.*, 1994). Resultados conflitantes sobre os sítios

de ligação do NF- κ B no promotor da iNOS em humanos tem sido publicados (Kleinert *et al.*, 2004; Pautz *et al.*, 2010).

O NF- κ B representa uma família de fatores de transcrição diméricos que, em mamíferos, compreendem RelA (p65), RelB, c-Rel, NF- κ B1 (p105/p50) e NF- κ B2 (p100/p52). O NF- κ B1 e o NF- κ B2 são sintetizados como um grande polipeptídeo e após uma clivagem pós-traducional dão origem as subunidades p50 e p52, respectivamente. As proteínas da família do NF- κ 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- κ 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. Os principais reguladores do NF- κ B de mamíferos são as proteínas I κ B (α , β ou γ). Na forma não estimulada, o NF- κ B está presente no citosol ligado a sua proteína inibitória I κ B. Na ativação clássica ou canônica do NF- κ B, a indução das células por uma variedade de agentes como mitógenos, citocinas, LPS e cAMP, promove a fosforilação do I κ B mediada por I κ B cinases (IKK – *I κ B kinase*), o que induz a sua poliubiquitinação e conseqüente degradação pelo proteassomo 26S. A degradação do I κ B expõe no NF- κ B a seqüência de localização nuclear no NF- κ B, resultando na sua translocação ao núcleo. O I κ B também é importante na terminação da ativação do NF- κ B. O I κ B- α recém-sintetizado entra no núcleo e se liga ao NF- κ B. Como a afinidade do NF- κ B pelo I κ B parece ser maior que a afinidade pelo seu sítio de ligação no DNA, ele se dissocia do DNA e é re-exportado ao citoplasma. A ativação alternativa ou não-canônica do NF- κ B é induzida por certas citocinas membros da família do TNF, mas não pelo TNF- α . Nesta via, a IKK1 fosforila o NF- κ B2 marcando-o para a poliubiquitinação e subsequente degradação por proteólise parcial pelo proteassomo produzindo p52. O p52 transloca então ao núcleo predominantemente em associação com RelB. Diferentemente desta via alternativa, o processamento constitutivo pelo proteassomo de p105 para produzir p50 não é regulado por estimulação com agonistas. Entretanto, p105 é fosforilado por IKK após ativação da via clássica marcando a sua degradação completa pelo proteassomo e liberação das subunidades do NF- κ B. Alguns resultados sugerem que a via de ativação clássica do NF- κ B está principalmente envolvida na imunidade inata enquanto a via alternativa está

relacionada com a imunidade adaptativa (Rothwarf & Karin, 1999; Liang *et al*, 2004; Sun & Ley, 2008).

Todos os promotores da iNOS em mamíferos contem sítios de ligação para STAT-1. A exposição das células a IFN- γ promove a dimerização do seu receptor e ativação de JAKs citoplasmáticas que se auto-fosforilam, fosforilam o receptor de IFN- γ e fatores de transcrição da família STAT. Após a fosforilação, as proteínas STAT se dimerizam e translocam ao núcleo onde ativam a expressão de genes dependentes de STAT (Kleinert *et al*, 2004). O STAT-1 é essencial para a indução da expressão da iNOS ativada por LPS. O LPS ativa a síntese autócrina/parácrina de IFNs do tipo I (IFN- α e IFN- β), que assim como o IFN- γ , induzem a fosforilação de STAT-1. Quando o LPS e IFN- γ são usados como co-indutores da expressão da iNOS, essa combinação de estímulos induz a ativação do NF- κ B, a ativação do gene de IRF1 e a fosforilação do STAT-1. Os homodímeros de STAT-1 também participam da *trans*-ativação do gene de IRF1 aumentando a sua expressão. O acúmulo desses três fatores de transcrição (NF- κ B, STAT-1 e IRF1) no núcleo leva à ligação desses fatores, juntamente com um dos fatores de transcrição octâmeros constitutivamente presentes (Oct-1 ou Oct-2), à sequência promotora da iNOS. Quando apenas o LPS é usado como o estímulo para a produção de NO, uma cascata alternativa é iniciada que culmina na ativação do NF- κ B e na indução da síntese de IFN- α/β , com predominância de IFN- β . Ao interagir com o seu receptor, o IFN- β induz a ativação de STAT-1, que da mesma forma que descrito para a estimulação simultânea com LPS e IFN- γ , ativa a expressão de IRF1 (Gao *et al.*, 1998). Assim, STAT-1 está essencialmente envolvido na estimulação da indução da iNOS seja diretamente pela ligação direta ao promotor da iNOS ou indiretamente pela indução de IRF1 (Kleinert *et al*, 2004).

Uma das possíveis explicações para a menor produção de NO por células humanas quando comparadas com células de camundongos seria a diferença na sequência promotora da iNOS entre essas espécies. A comparação do *locus* gênico da iNOS em humanos, camundongos, ratos, macacos *Rhesus* e chimpanzés mostra alta homologia entre as sequências dos primatas, mas relativamente baixa homologia entre os humanos, ratos e camundongos. Além disso, parece que a indução por citocinas do promotor da iNOS em humanos depende do *background* genético e do estado de diferenciação do tipo celular analisado (Pautz *et al.*, 2010; Wink *et al*, 2011).

A regulação da estabilidade do mRNA é um outro mecanismo importante na regulação da expressão da iNOS, especialmente em humanos. Cardiomiócitos primários humanos, *in vitro*, expressam mRNA de iNOS mas não expressam a proteína iNOS. Esta incapacidade de tradução do mRNA da iNOS foi relacionada com a presença de regiões 3'- e 5'- não traduzidas (3'-UTR e 5'UTR). O mRNA de iNOS humano possui quatro sequências com o motivo AUUA na região 3'-UTR que, em geral, conferem instabilidade a mRNAs de oncogenes e citocinas. A mesma sequência é encontrada duas vezes na 3'-UTR do mRNA de iNOS murino e quatro vezes no mRNA de ratos. A inibição da expressão da iNOS por diferentes agentes tais como TGF- β 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).

A expressão de iNOS pode também ser regulada, em parte, pelo NO endógeno. Baixas quantidades de NO, como encontrado em concentração fisiológica, mantêm suprimida a expressão de iNOS por impedir a ativação do NF- κ 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- κ B e consequentemente 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, da 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. Tanto a via de síntese de NO quanto a via da arginase dependem do fornecimento extracelular de L-arginina sendo que 90% da L-arginina é

consumida por arginase enquanto 10% é consumido para a síntese de NO (Hrabák *et al.*, 1994; Chang *et al.*, 1998).

A arginase é a enzima que catalisa a degradação da arginina em uréia e ornitina. A ornitina é então metabolizada pela ornitina descarboxilase produzindo as poliaminas putrescina, espermidina e espermina. Existem pelo menos dois genes para arginase não homólogos e distintos denominados de arginase I e arginase II. A arginase I é ubíqua, mas é encontrada principalmente no fígado enquanto a arginase II é abundante no pâncreas e possui uma sequência de localização mitocondrial (Wang *et al.*, 1995; Lewis *et al.*, 2010).

A atividade de iNOS é um fator importante no mecanismo citotóxico de macrófagos para controlar o crescimento de patógenos. Por outro lado, a atividade de arginase impede a ativação excessiva do sistema imune e promove a resolução da inflamação. As citocinas pró-inflamatórias clássicas como IL-1, TNF- α , IFN- γ e IL-2 induzem a expressão de iNOS, enquanto citocinas anti-inflamatórias humorais como IL-4, IL-10, IL-13 e TGF- β , 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 hidroxil-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).

1.7. Resistência *versus* susceptibilidade de hospedeiros à infecção por microrganismos intracelulares

Inicialmente, resistência e susceptibilidade foram relacionadas ao desenvolvimento de uma resposta Th1 ou Th2, respectivamente. Este conceito de polarização Th1/Th2 surgiu a partir do trabalho de Mosmann e colaboradores (1986), com a descrição de dois subconjuntos de células T CD4⁺ que secretavam distintas citocinas *in vitro*. A primeira evidência funcional *in vivo* desses subconjuntos de células T auxiliares CD4⁺ foi obtida com o modelo experimental de leishmaniose, onde promastigotas de *L. major* foram inoculadas em camundongos (Scott *et al.*, 1988; Heinzel *et al.*, 1989). Entretanto, alguns trabalhos vêm mostrando que o controle da infecção envolve vários outros fatores que nem sempre estão ligados ao

desenvolvimento de células T CD4⁺ Th1 (Sakaguchi *et al.*, 1985; Langrish *et al.*, 2005; Alexander & Brombacher, 2012, Tacchini-Cottier *et al.*, 2012).

O modelo de infecção murina por *L. major* permanece como uma ferramenta popular para os imunologistas investigarem a contribuição de vários fatores, como por exemplo, citocinas, receptores ou moléculas sinalizadoras, no desenvolvimento de uma resposta Th1 ou Th2 *in vivo*. Em linhagens de camundongos C57BL/6, CBA e C3H/He, por exemplo, a infecção induz o início de uma resposta Th1 específica ao parasita, dependente de IL-12, caracterizada pelo aumento da expressão de IFN- γ . Esta citocina induz a síntese de iNOS em macrófagos e o NO produzido mata este parasita, resultando na cura da infecção. Em contraste, camundongos BALB/c desenvolvem uma resposta Th2 específica ao parasita caracterizada pelo aumento da expressão de IL-4, o que permite a multiplicação descontrolada do parasita, o desenvolvimento progressivo da lesão que, eventualmente leva à morte do hospedeiro. As diferentes linhagens de camundongos não se comportam uniformemente em relação às várias espécies de *Leishmania*. Por exemplo, camundongos da linhagem C57BL/10, enquanto capazes de curar uma infecção por *L. major*, não conseguem resolver a lesão se infectados por *L. amazonensis*. Quando infectados por *L. major* estes camundongos produzem altos níveis de IFN- γ e nenhuma IL-4, mas se a infecção for por *L. amazonensis* há produção de IL-4 e pouca ou nenhuma de IFN- γ (Afonso & Scott, 1993). Da mesma forma, linhagens de camundongos susceptíveis a *L. major*, podem ser resistentes a *Leishmania braziliensis*, e linhagens de camundongos resistentes a *L. major*, podem ser susceptíveis a *L. amazonensis* (Jones *et al.*, 1998). Assim, no modelo murino, resistência e susceptibilidade à leishmaniose, bem como o padrão Th1/Th2 de resposta, só podem ser considerados fenótipos se definida a espécie da *Leishmania*. Isto também se aplica a outros pares hospedeiro/patógeno e, mais uma vez, mostra que os fatores são complexos e provenientes tanto do hospedeiro como do microrganismo infectante.

Um aspecto interessante, mas pouco explorado do modelo murino de resistência/susceptibilidade é que, independente da ativação de linfócitos Th1 e Th2, macrófagos de linhagens de camundongos resistentes não infectados são mais sensíveis aos estímulos de IFN- γ e/ou TNF- α ou LPS para a produção de NO que as linhagens de camundongos susceptíveis não infectados (Liew *et al.*, 1991; Oswald *et al.*, 1992; Jardim *et al.*, 1997). Isto indica que, independente do patógeno, macrófagos de BALB/c

e C57BL/6 apresentam mecanismos reguladores distintos que controlam a produção de NO. De forma semelhante, foi mostrado que, na presença de IFN- γ , macrófagos peritoneais ou derivados da medula óssea de camundongos C57BL/6 produzem mais NO que macrófagos de camundongos BALB/c em resposta a *Trypanosoma congolense* fagocitado ou seu extrato celular total (Kaushik *et al.*, 1999).

Mills e colaboradores (2000) confirmaram os resultados acima mostrando, de maneira mais sistemática, que macrófagos residentes de camundongos que tipicamente desencadeiam uma resposta Th1 diferem quantitativamente de macrófagos de linhagens que tipicamente desencadeiam resposta Th2 em sua capacidade de ativação. Esses macrófagos denominados de M-1 e M-2, produzem diferencialmente NO (e citrulina) e ornitina (e uréia). Sob os mesmos estímulos de IFN- γ e/ou LPS, macrófagos M-1 produzem mais NO que macrófagos M-2, os quais produzem mais ornitina que células M-1 sugerindo assim diferenças na regulação das vias de expressão de iNOS e arginase entre esses macrófagos. Além disso, os macrófagos M-1 e M-2, assim estimulados, podem direcionar o sistema imune do hospedeiro para respostas Th1 ou Th2, respectivamente.

Dentro desta perspectiva, este trabalho propõe esclarecer quais são os determinantes moleculares envolvidos na produção diferencial de NO por macrófagos de camundongos BALB/c e C57BL/6 uma vez que os fatos citados anteriormente sugerem que a resistência e a susceptibilidade de camundongos podem depender também da capacidade intrínseca do macrófago de produzir NO e inibir o crescimento dos patógenos, como também contribuir para o direcionamento da resposta imune (Th1 ou Th2) por mecanismos diferentes dos já estabelecidos. Assim, é possível que a maior sensibilidade dos macrófagos aos estímulos das citocinas para a produção de NO possa também contribuir para a expressão do fenótipo de resistência juntamente com outros componentes do *background* genético desses camundongos.

*Mecanismos moleculares determinantes da sensibilidade diferencial de macrófagos
de camundongos C57BL/6 e BALB/c a LPS para produção de NO*

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

Investigar os determinantes da sensibilidade diferencial de macrófagos de camundongos C57BL/6 e BALB/c a LPS para a produção de NO.

2.2. Objetivos específicos

- a) Caracterizar a produção diferencial de NO em macrófagos, *in vitro*:
- ✓ estabelecer as concentrações de LPS que promovem a maior diferença na produção de NO entre os macrófagos de C57BL/6 e BALB/c.
 - ✓ determinar a cinética de produção de NO após estimulação com a dose escolhida de LPS.
 - ✓ verificar se a sensibilidade diferencial para a produção de NO é um reflexo da ativação/maturação diferencial provocada pelo tioglicolato injetado.
- b) Investigar qual(is) etapa(s) da sinalização induzida por LPS é(são) responsável(is) pela produção diferencial de NO pelos macrófagos, analisando:
- ✓ a expressão e/ou atividade da arginase.
 - ✓ a expressão da proteína iNOS.
 - ✓ o perfil de degradação da proteína iNOS.
 - ✓ a expressão de mRNA para iNOS.
 - ✓ a expressão do TLR4, receptor envolvido na via de sinalização de LPS.
 - ✓ a ativação de alguns fatores de transcrição envolvidos na via de sinalização de LPS.
 - ✓ a expressão de citocinas ou outras proteínas induzidas por LPS direta ou indiretamente, como, por exemplo, TNF- α , IFN- β e IL-10 que podem regular a síntese de iNOS.

*Mecanismos moleculares determinantes da sensibilidade diferencial de macrófagos
de camundongos C57BL/6 e BALB/c a LPS para produção de NO*

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 da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) com o número de permissão CETEA 108/2004. Foram utilizados camundongos fêmeas das linhagens BALB/c e C57BL/6 com idade entre 7-10 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. Antes de serem utilizados nos experimentos os animais foram vermifugados com solução de ivermectina 1%, via oral, por uma semana.

3.2. 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 sacrificados por deslocamento cervical e 10 mL de meio RPMI (Sigma) com antibiótico (50 mg/L de sulfato de gentamicina, Shering-Plough) gelado foram injetados na cavidade peritoneal e recolhidos com seringa. O lavado peritoneal foi centrifugado a $1200 \times g$ por 10 minutos a 4°C e o *pellet* celular ressuspensão em meio RPMI com antibiótico. As células foram contadas em câmara hemocitométrica de Neubauer e crescidas em placas de 96 poços (1×10^5 células/poço), placas de 24 poços (3×10^5 a 1×10^6 células/poço), placas de seis poços ou Placas de Petri de 40x11 mm (1×10^6 células a 5×10^6 /poço ou placa) e em garrafas de 25 cm² (5×10^6 a 1×10^7 células/garrafa) em meio RPMI completo (suplementado com antibiótico e 10% de soro fetal bovino (SFB), Cripion) de acordo com a finalidade do experimento. As células foram incubadas por duas horas a 37°C em estufa de 5% de CO₂ para adesão dos macrófagos. Em seguida as células foram lavadas com RPMI para remoção das células não aderentes e deixadas em repouso em RPMI completo por 18 horas quando foram então estimuladas com LPS purificado de *Escherichia coli* 0127 (Sigma) ou com Poli (I:C) (InvivoGen) por tempos determinados.

3.3. Obtenção de macrófagos derivados da medula óssea (BMDM)

Para obtenção dos macrófagos derivados da medula óssea, os camundongos foram sacrificados por deslocamento cervical e os fêmures e tíbias foram extraídos. As

extremidades proximal e distal de cada osso foram removidas e a medula óssea extraída pela lavagem do interior do osso com 5 mL de HBSS (*Hank's Balanced Salt Solution*, GIBCO). A suspensão das células foi então centrifugada a 600 *xg* por 10 minutos a 4°C. O *pellet* celular foi ressuspensão em 10 mL/animal de RPMI completo. A suspensão celular foi filtrada em separadores de nylon com a malha de 70 μm (BD Falcon) para remoção dos detritos e ruptura das ligações célula-célula. As células foram plaqueadas em placas de Petri para cultivo celular e incubadas em estufa a 37°C com 5% de CO₂ por duas horas. As células não aderentes foram coletadas e centrifugadas a 600 *xg* por 10 minutos a 4°C e o *pellet* celular ressuspensão em 2 mL de meio RPMI completo. As células foram contadas em câmara de Neubauer e plaqueadas em placa de 96 poços (2x10⁵ células/poço) ou de 24 poços (5x10⁵ células/poço) em meio RPMI completo e 10% de LCCM (*L929 cell condition medium*) como fonte do fator estimulador de colônia de monócitos (M-CSF). As placas foram incubadas em estufa a 37°C e sob atmosfera de 5% de CO₂. Após quatro dias de plaqueamento, 10% de LCCM foram adicionados por poço e no sétimo dia, o meio de cultura foi substituído por um novo contendo 10% de LCCM. Os estímulos para os macrófagos derivados de medula foram adicionados a partir do décimo dia de cultura já que a partir deste momento as células estão completamente diferenciadas em macrófagos.

3.4. Ensaio de Viabilidade Celular

A viabilidade celular foi determinada nos tempos de 15, 24, 48 e 72 horas após estimulação, através do ensaio de redução do MTT [brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio, Sigma] (Mosmann, 1983). Após a retirada do sobrenadante dos macrófagos aderidos em placas de 96 poços, 200 μl de solução de MTT (500 $\mu\text{g/mL}$) foram adicionados em cada poço. Os macrófagos foram novamente incubados a 37°C em estufa com 5% de CO₂ por quatro horas. O sobrenadante foi então coletado e os cristais de sal formados foram solubilizados com 200 μl de solução de dimetilformamida (1:1) em água e 10% SDS. Após homogeneização, 100 μl do sobrenadante foram transferidos para outra placa de 96 poços e a absorbância determinada a 550 nm. Neste caso, a absorbância é diretamente proporcional à viabilidade celular já que apenas as células viáveis conseguem reduzir o MTT pela ação das desidrogenases mitocondriais.

3.5. Quantificação da produção de NO por macrófagos

O NO foi determinado indiretamente pela quantificação do nitrito (NO_2^-) resultante da sua oxidação no sobrenadante da cultura de macrófagos pela reação colorimétrica de *Griess* (Hibbs *et al.*, 1988). Para isso, 50 μL do sobrenadante da cultura de macrófagos foram misturados a 50 μL do Reagente de *Griess* (solução 1:1 de 1% de sulfanilamida em 2,5% de H_3PO_4 e 0,1% de cloreto de N-(1-naftil)-etileno-diamina (NED) em 2,5% de H_3PO_4 preparado no momento do uso) e após 10 minutos a absorvância foi medida em 540 nm. A curva padrão foi feita com nitrito de sódio (NaNO_2) diluído em meio RPMI em concentrações variando de 1,56 a 200 μM .

3.6. Extrato protéico total

Após a retirada do sobrenadante, as células aderidas foram lisadas diretamente na placa com 50 μL de Tampão de Lise (50 mM Tris-HCl pH 7,4, 150 mM NaCl, 50 mM NaF, 10 mM β -glicerofosfato, 0,1 mM EDTA, 10% glicerol, 1% Triton X-100, 1 mM ortovanadato de sódio e suplementado com mix de inibidores de proteases da GE Healthcare). O lisado celular foi transferido para um tubo de 1,5 mL e incubado no gelo por 30 minutos. Após este tempo os tubos foram centrifugados a 8000 rpm por 1 minuto e o sobrenadante (extrato protéico) estocado a -20°C até o momento do uso. O extrato protéico foi quantificado utilizando o reagente para dosagem de proteína da Bio-Rad (método de Bradford modificado para microplacas) de acordo com as recomendações do fabricante.

3.7. SDS-PAGE e Western Blot

O extrato protéico total (30 a 50 μg) foi aplicado com tampão de amostra (1% SDS, 5% de β -mercaptoetanol, 20% glicerol, 1 mM EDTA e 0,05% de azul de bromofenol) em gel de SDS-PAGE e submetidos a eletroforese a 100 V.

As proteínas fracionadas pelo SDS-PAGE foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (GE Healthcare) em uma voltagem de 30 V por 18 horas ou 80 V por 1 hora, a 4°C em tampão de transferência (25 mM Tris, 192 mM glicina e 20% v/v metanol). Após a transferência, as membranas foram incubadas em tampão de bloqueio (TBS contendo 5% de leite em pó desnatado) por 1 hora a temperatura ambiente sob agitação. A seguir, elas foram incubadas por 18 horas a 4°C sob agitação,

com os anticorpos primários diluídos em tampão de anticorpo (TBS contendo 0,1% de Tween 20 e 5% de albumina bovina). Foram utilizados os seguintes anticorpos primários: anticorpo policlonal de coelho anti-iNOS de macrófago murino (Sigma) na diluição de 1:5000, anti-I κ B α , anti-fosfo-p65 NF- κ B (Ser536), anti- STAT-1 total, anti-phospho-STAT-1 (Y701) e anti- β -actina na diluição 1:1000 (Cell Signaling). As membranas foram então lavadas com TBS-Tween 20 0,1% e incubadas com o anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase (KPL) diluído no tampão de anticorpo por 1 hora a temperatura ambiente, sob agitação. Para a revelação foi utilizado o *Immobilon Western Chemiluminescent HPR Substrate* (Millipore) conforme as recomendações do fabricante e a luminescência foi captada no equipamento STORM. A densitometria das bandas visualizadas foi realizada utilizando o programa ImageJ (disponível em <http://rsbweb.nih.gov/ij/>).

3.8. Extração de RNA e *Real Time* PCR

O RNA total dos macrófagos, crescidos em garrafas de 25 cm² ou em placas de seis poços, foi extraído com o *RNeasy Mini Kit* (QIAGEN) de acordo com as recomendações do fabricante e quantificado no espectrofotômetro Nanodrop (Thermo Scientific). O cDNA foi produzido a partir de 500 ng de RNA total com *illustra Ready-To-Go RT-PCR Beads* (GE Healthcare) seguindo as recomendações do fabricante. O cDNA obtido foi diluído 1:20 em água ultrapura, livre de nucleases e utilizado como molde para o *Real Time* PCR.

As sequências dos *primers* utilizados no *Real Time* PCR estão listadas na Tabela 1. Os *primers* para análise da expressão das isoformas arginase I, arginase II e IFN- β foram desenhados com o auxílio da ferramenta Primer-Blast disponível no site da NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>). Para a determinação do nível de expressão do mRNA foi utilizado o método do Δ Ct relativo utilizando a β -actina como normalizador endógeno e como referência a amostra obtida dos macrófagos de C57BL/6 sem estímulo. As reações de *Real Time* PCR foram realizadas utilizando o ABI Prism 7900 e o SYBR Green como fluorescência (Applied Biosystems).

Para que os experimentos de *Real Time* PCR utilizando o método do Δ Ct sejam válidos, é necessário que a eficiência de amplificação dos *primers* para amplificação dos mRNAs alvos seja semelhante a eficiência de amplificação dos *primers* para

amplificação do gene utilizado como normalizador endógeno (β -actina). Para isso, para cada par de *primer* foi feito uma curva de amplificação utilizando cDNA em diferentes concentrações (1:10, 1:20, 1:50 e 1:100) e o cálculo de eficiência de amplificação foi feito segundo “*Guide to Performing Relative Quantitation of Gene Expression Using Real-Time Quantitative PCR*” disponível no site: http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_support/documents/generaldocuments/cms_042380.pdf. Todos os *primers* apresentaram pelo menos 99% de eficiência de amplificação.

Tabela 1. Sequências nucleotídicas dos *primers* utilizados no *Real Time* PCR.

<i>Primer</i>	Sequência <i>forward</i> (5'-3')	Sequência <i>reverse</i> (5'-3')	Referência
iNOS	CAGCTGGGCTGTACAAACCTT	CATTGGAAGTGAAGCGTTTCG	Overbergh <i>et al.</i> , 1999
Arginase I	AAAGCTGGTCTGCTGGAAAA	ACAGACCGTGGGTTCTTCAC	Este trabalho
Arginase II	TGGACAGCCACTTTCCTTTC	GAGGCTCCACATCTCTCAGG	Este trabalho
IFN- β	ACGTGGGAGATGTCTCAACTGC	TCGGACCACCATCCAGGCGT	Este trabalho
IL-10	TGGACAACATACTGCTAACC	GGATCATTTCGATAAAGGCT	Cardoso <i>et al.</i> , 2008
TNF- α	TGTGCTCAGAGCTTTCAACAA	CTTGATGGTGGTGCATGAGA	Cardoso <i>et al.</i> , 2008
β -actina	AGAGGGAAATCGTGCGTGAC	CAATAGTGATGACCTGGCCGT	Overbergh <i>et al.</i> , 1999

3.9. Análise da taxa de degradação da proteína iNOS

A taxa de degradação da proteína iNOS foi analisada por Western blot após o bloqueio da síntese de proteínas utilizando a cicloheximida (CHX). Os macrófagos peritoneais de C57BL/6 e BALB/c foram estimulados com LPS (1 μ g/mL) por 15 horas. Após este tempo, os macrófagos foram tratados com CHX (Sigma) na concentração final de 50 μ g/mL por 1 a 7 horas. O extrato protéico foi preparado e o Western blot realizado como descrito no item 3.6 e 3.7. Como controle da inibição da tradução, os macrófagos foram tratados por 2 horas com CHX antes da adição do LPS.

3.10. Determinação da atividade de arginase

A atividade de arginase foi determinada pela dosagem de uréia de acordo com Corraliza e colaboradores, 1994. Para isso, os macrófagos peritoneais de C57BL/6 e BALB/c foram crescidos em placas de 24 poços e estimulados com LPS por 24, 48 ou 72 horas. Após este tempo, o sobrenadante foi coletado e utilizado para dosagem de NO e as células aderidas na placa foram lisadas com 100 μ L de Triton X-100 (Sigma) 0,1%

por 30 minutos sob agitação. A seguir foi adicionado 100 μL de MnCl_2 (Sigma) 10 mM e 100 μL de Tris-HCl 50 mM pH = 7,5. Para a ativação da arginase, a placa foi incubada por 10 minutos a 55°C. Para a hidrólise da arginina foi adicionado 50 μL de arginina 0,5 M a 50 μL do lisado celular e a placa incubada a 37°C por 60 minutos. A reação de hidrólise foi parada pela adição de 400 μL da solução de H_2SO_4 : H_3PO_4 : H_2O na razão 1:3:7. Para a formação da cor foi adicionado 25 μL de α -isonitrosopropiofenona (Sigma) 9% em etanol, seguido por aquecimento a 95°C por aproximadamente 40 minutos. A curva padrão foi feita com quantidades de uréia variando de 3,12 a 100 μg . Cada unidade de atividade enzimática foi definido como a quantidade de enzima que catalisa a formação de 1 μmol uréia por minuto.

3.11. Análise da expressão de TLR4 por citometria de fluxo

Os macrófagos peritoneais aderidos foram lavados com PBS gelado, removidos da placa com *Cell scraper* (Nunc) e centrifugados a 2000 rpm por 10 minutos. O *pellet* celular foi ressuspensão em PBS contendo 2% de BSA e 0,1% de NaN_3 (PBS-BSA- NaN_3 pH = 7,4). As células (1×10^6) foram marcadas com anticorpos monoclonais anti-CD11c conjugado com FITC, anti-TLR4 conjugado com PE ou anti-CD11b conjugado com Cy5 por 30 min a 4°C em placas de 96 poços. As placas foram lavadas com PBS-BSA- NaN_3 e centrifugadas a 1200 rpm por 2 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 200 μL do mesmo tampão. As células foram então analisadas pelo FACSCan (Becton & Dickinson) e os dados foram analisados com o auxílio do programa FlowJo (Treestar). No mínimo 30000 eventos foram contados para cada amostra.

3.12. Ensaio de neutralização de IFN- β

Para a neutralização do IFN- β foi utilizado o anticorpo policlonal anti-IFN- β murino (IgG de coelho purificada) (PBL Interferon Source) em concentração e tempo determinados para cada experimento. O sobrenadante das células tratadas com o anticorpo de neutralização foi utilizado para a dosagem de NO descrito no item 3.5 e o extrato protéico total utilizado em experimentos de Western Blot (itens 3.6 e 3.7).

3.13. Dosagem de citocinas

As concentrações de IL-10 e TNF- α nos sobrenadantes da cultura dos macrófagos peritoneais de C57BL/6 e BALB/c estimulados com LPS por 6, 15 e 24 horas foram determinadas pelo método de ELISA sanduíche, utilizando os kits fornecidos pela R&D System de acordo com o protocolo dos fabricantes. A absorbância foi mensurada no espectrofotômetro, a uma leitura de 450 nm.

3.14. Análise estatística

Os resultados obtidos neste trabalho foram analisados por meio do teste *t* de Student, utilizando o programa GraphPad Prism 4 (GraphPad Software, Inc). O nível de significância adotado nas análises foi $p < 0,05$.

*Mecanismos moleculares determinantes da sensibilidade diferencial de macrófagos
de camundongos C57BL/6 e BALB/c a LPS para produção de NO*

4. Resultados

4.1. Curva dose-resposta e cinética de produção de NO por macrófagos estimulados com LPS

Para a padronização da cultura de macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 e BALB/c quanto à produção de NO, bem como a escolha da dose de LPS a ser utilizada como estímulo, macrófagos peritoneais obtidos desses animais foram cultivados com LPS nas doses de 0,05; 0,2; 0,5 e 1,0 $\mu\text{g/mL}$ por 72 horas, e com 1,0 $\mu\text{g/mL}$ durante 12, 24, 48, 72 e 96 horas. Como observado na figura 4A, em todas as doses de LPS utilizadas, os macrófagos de C57BL/6 produziram mais NO (de 8 a 27 vezes) que os macrófagos de BALB/c. A maior diferença observada foi na dose de 1 $\mu\text{g/mL}$ de LPS, que foi a dose utilizada nos demais experimentos. A figura 4B mostra a cinética de produção de NO para a dose escolhida de LPS. Foi verificado que a produção máxima de NO é observada em 72 e 96 horas e a diferença máxima em 72 horas.

Para verificar se a produção diferencial de NO pelos macrófagos peritoneais de C57BL/6 e BALB/c quando estimulados com LPS sofre influência da ativação inicial provocada pelo meio tioglicolato, macrófagos derivados de medula óssea também foram estimulados com 1 $\mu\text{g/mL}$ de LPS por 15, 24, 48 e 72 horas. Como visto na figura 4C, macrófagos derivados da medula óssea de C57BL/6 também produzem mais NO que as mesmas células obtidas de BALB/c, quando estimulados com LPS. Vale ressaltar que embora a produção de NO por esses macrófagos seja menor quando comparados com os macrófagos peritoneais, o perfil de produção diferencial de NO pelas duas linhagens de camundongos estudadas é mantido.

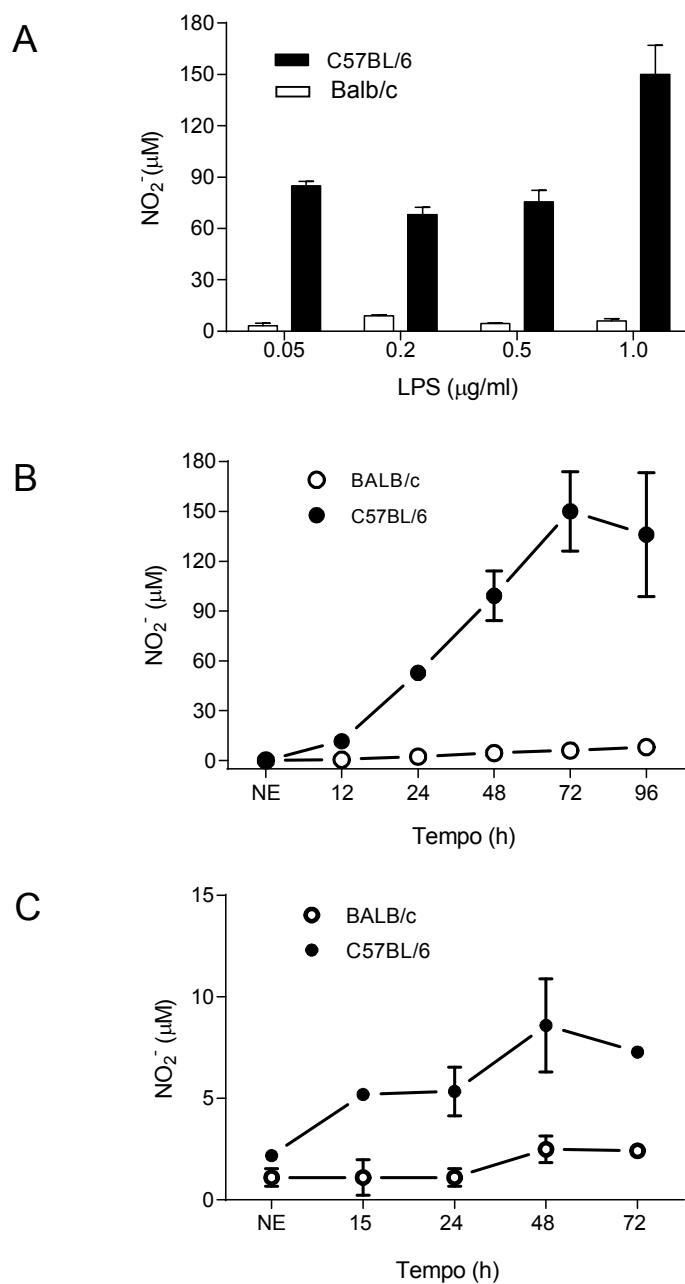


Figura 4. Produção de NO pelos macrófagos de C57BL/6 e BALB/c estimulados com LPS. A) Produção de NO por macrófagos peritoneais (1×10^5 células) de C57BL/6 e BALB/c estimulados com diferentes doses de LPS por 72 horas determinada pelo método de *Griess*. B) Cinética de produção de NO pelos macrófagos peritoneais (1×10^5 células) de C57BL/6 e BALB/c estimulados com LPS ($1 \mu\text{g/ml}$) por 12, 24, 48, 72 ou 96 horas. C) Cinética de produção de NO pelos macrófagos derivados de medula óssea (5×10^5 células) de C57BL/6 e BALB/c estimulados com LPS ($1 \mu\text{g/ml}$) por 15, 24, 48 ou 72 horas.

4.2. Análise da viabilidade celular

Para verificar se a diferença na produção de NO entre macrófagos peritoneais de C57BL/6 e BALB/c era devido a uma diferença na viabilidade celular *in vitro*, foi realizado um ensaio de MTT nessas células estimuladas ou não com LPS, por 15, 24, 48 e 72 horas. O resultado obtido mostra que as células sobrevivem muito bem até 48 horas, mas em 72 horas, a maioria das células morre (Fig. 5). Os macrófagos não estimulados mantidos em cultura pelo mesmo período apresentaram padrão idêntico ao das células estimuladas (resultados não mostrados).

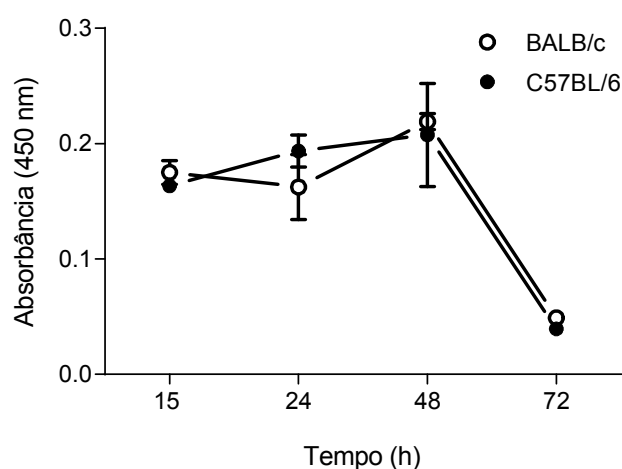


Figura 5. Viabilidade celular dos macrófagos de C57BL/6 e BALB/c. Macrófagos peritoneais (1×10^5 células) de C57BL/6 e BALB/c estimulados com LPS ($1 \mu\text{g/mL}$) por 15, 24, 48 e 72 horas, tiveram a viabilidade celular determinada pelo ensaio de MTT.

4.3. Balanço entre iNOS x Arginase

Mills e colaboradores (2002) mostraram que os macrófagos residentes de C57BL/6 e BALB/c apresentam diferenças na regulação da expressão de arginase além de diferenças na regulação da expressão de iNOS. Para analisar a importância do balanço entre iNOS e arginase na produção de NO nos macrófagos peritoneais foram realizados experimentos de *Real Time* PCR para determinação da expressão relativa dos mRNAs das isoformas de arginase I e arginase II e um teste para determinação da atividade total de arginase.

4.3.1. Expressão do mRNA das isoformas arginase I e arginase II

Como observado na figura 6A, o mRNA da arginase I é mais expresso em macrófagos de C57BL/6 que em macrófagos de BALB/c em todo o período analisado. A estimulação com LPS induz uma redução, observada em 5 horas, na expressão da arginase I em macrófagos de ambas as linhagens, seguida de um aumento em sua expressão observada em 15 horas nos macrófagos de C57BL/6 e em 24 horas nas células de BALB/c. O oposto é observado para o mRNA da isoforma arginase II que é mais expresso em macrófagos de BALB/c que nos macrófagos de C57BL/6 (Fig. 6B). Há um aumento progressivo da expressão do mRNA da arginase II em macrófagos de ambas as linhagens, mas muito mais proeminente em macrófagos de BALB/c, após estimulação com LPS.

4.3.2. Atividade de arginase

Para avaliar se a diferença de expressão do mRNA das isoformas da arginase observada nos macrófagos de C57BL/6 e BALB/c resultaria em uma diferença na atividade desta enzima, foi utilizado um protocolo que determina a atividade da arginase por meio da dosagem de uréia, um produto final da reação. Embora haja diferenças marcantes na expressão de arginase I e II em macrófagos das duas linhagens de camundongos, não foi observada diferença na atividade total de arginase entre os macrófagos de C57BL/6 e BALB/c nos tempos ensaiados (Fig. 6C). Em ambas as linhagens de camundongos, o LPS induz um aumento na atividade de arginase que culmina em 48 horas, decaindo em 72 horas.

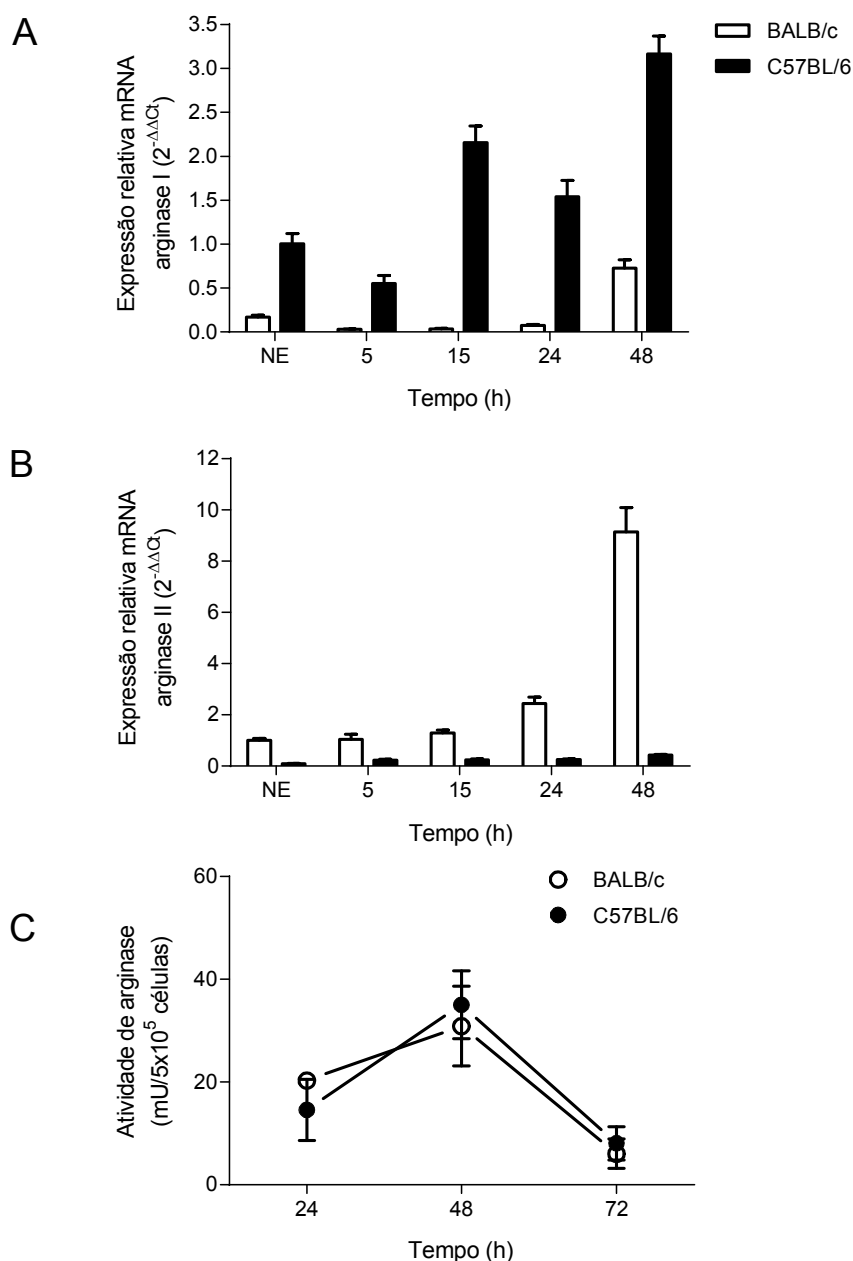


Figura 6. Expressão e atividade da arginase nos macrófagos de C57BL/6 e BALB/c. Quantificação relativa de mRNA de arginase I (A) e arginase II (B) por Real Time PCR utilizando o RNA total extraído de macrófagos peritoneais (5×10^6 células) estimulados com LPS ($1 \mu\text{g/mL}$) 5, 15, 24 ou 48 horas, o SYBR Green como fluorescência e o método de ΔCt relativo. O mRNA de β -actina foi utilizado como normalizador e a amostra de mRNA do C57BL/6 não estimulado como amostra referência. Há diferença estatisticamente significativa quando comparados C57BL/6 e BALB/c em cada tempo, assim como quando comparados cada tempo do C57BL/6 ou BALB/c com seu respectivo controle (não estimulado), $p < 0,05$. C) Atividade total da enzima arginase medida pela dosagem colorimétrica de uréia em extrato protéico total de macrófagos peritoneais (5×10^5 células) estimulados com LPS ($1 \mu\text{g/mL}$) por 24, 48 ou 72 horas. O resultado apresentado corresponde ao valor obtido para os macrófagos estimulados com LPS menos o valor obtido para os macrófagos não estimulados. Não há diferença estatisticamente significativa quando comparados C57BL/6 e BALB/c em cada tempo, $p < 0,05$. NE = não estimulado.

4.4. Expressão da proteína iNOS

Para verificar se a maior produção de NO pelos macrófagos de camundongos C57BL/6 é devido a uma maior expressão da enzima iNOS nestas células, semelhante ao observado quando os macrófagos são tratados simultaneamente com IFN- γ e LPS (Santos *et al*, 2006), foi realizado um experimento de Western Blot para a detecção da proteína iNOS. Utilizando anticorpo anti-iNOS e extratos protéicos de macrófagos peritoneais estimulados com LPS por 6, 15, 24, 48 e 72 horas, foi observado que o LPS induz uma forte expressão da proteína iNOS nos macrófagos de C57BL/6 e uma fraca expressão nos macrófagos de BALB/c (banda correspondente a 130 kDa, Fig. 7A). Após 6 horas de estimulação com LPS, já é possível observar a expressão da iNOS nos macrófagos de C57BL/6 sendo que esta expressão aumenta até atingir o seu pico em 48 horas de estimulação. Após 72 horas de estimulação com o LPS, o nível de expressão da proteína iNOS praticamente retorna ao seu nível basal (Fig. 7A e B), possivelmente pela baixa sobrevivência das células neste tempo. A expressão diferencial da proteína iNOS em macrófagos de ambas as linhagens de camundongos tratados com LPS correlaciona diretamente com a produção de NO (Fig. 4B).

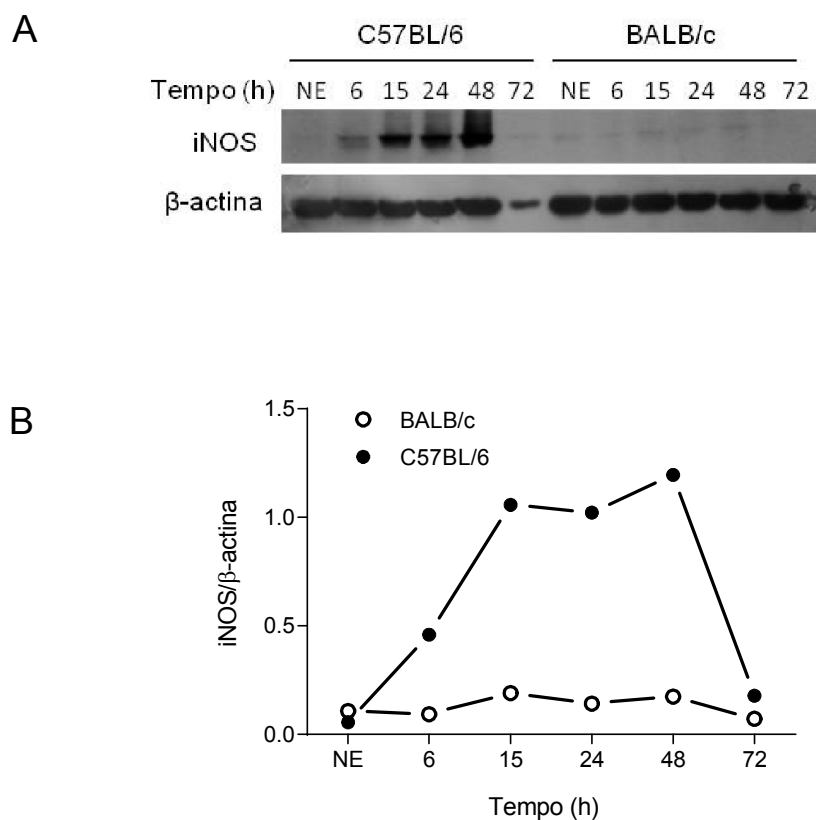


Figura 7. Expressão da proteína iNOS nos macrófagos de C57BL/6 e BALB/c. A) Níveis de expressão da proteína iNOS em extratos protéicos de macrófagos peritoneais (1×10^6 células) de C57BL/6 e BALB/c estimulados com LPS ($1 \mu\text{g/mL}$), por 6, 15, 24, 48 ou 72 horas, determinado por Western Blot utilizando anticorpos específicos anti-iNOS e anti- β -actina. **B)** Densitometria das bandas visualizadas no Western Blot com o programa ImageJ. O histograma representa a razão entre os valores quantificados das bandas de iNOS em relação aos valores quantificados das bandas de β -actina correspondentes. NE = não estimulado.

4.5. Análise da degradação da proteína iNOS

A maior concentração da proteína iNOS nos macrófagos de C57BL/6 pode ser devido a uma maior concentração de seu mRNA e/ou a uma menor taxa de degradação da proteína. Assim, foi avaliado se, eventualmente, a degradação da proteína iNOS estaria contribuindo para a diferença na concentração desta enzima observada nos extratos protéicos de macrófagos de C57BL/6 e BALB/c. Para isso, foi realizado um experimento de Western Blot com extratos protéicos dos macrófagos estimulados por 15 horas com LPS e tratados, a seguir, por tempos determinados com CHX (inibidor da tradução de proteínas). Como controle do bloqueio da tradução por CHX, os macrófagos foram primeiramente tratados por 2 horas com a solução de CHX e depois estimulados por 15 horas com LPS. Como observado na figura 8A e B, mesmo após 7 horas de tratamento com CHX, não é observada degradação da proteína iNOS nos extratos protéicos dos macrófagos de C57BL/6 e de BALB/c. Com este experimento não foi possível determinar o tempo de meia-vida da proteína iNOS, uma vez que, após 7 horas de tratamento com a CHX, as células já morriam pela ação da droga. Visto que, aparentemente, a degradação da proteína iNOS não ocorre de modo diferencial nos macrófagos de C57BL/6 e BALB/c é provável que a maior quantidade de proteína iNOS nos macrófagos de C57BL/6 seja devido a um maior acúmulo do seu mRNA.

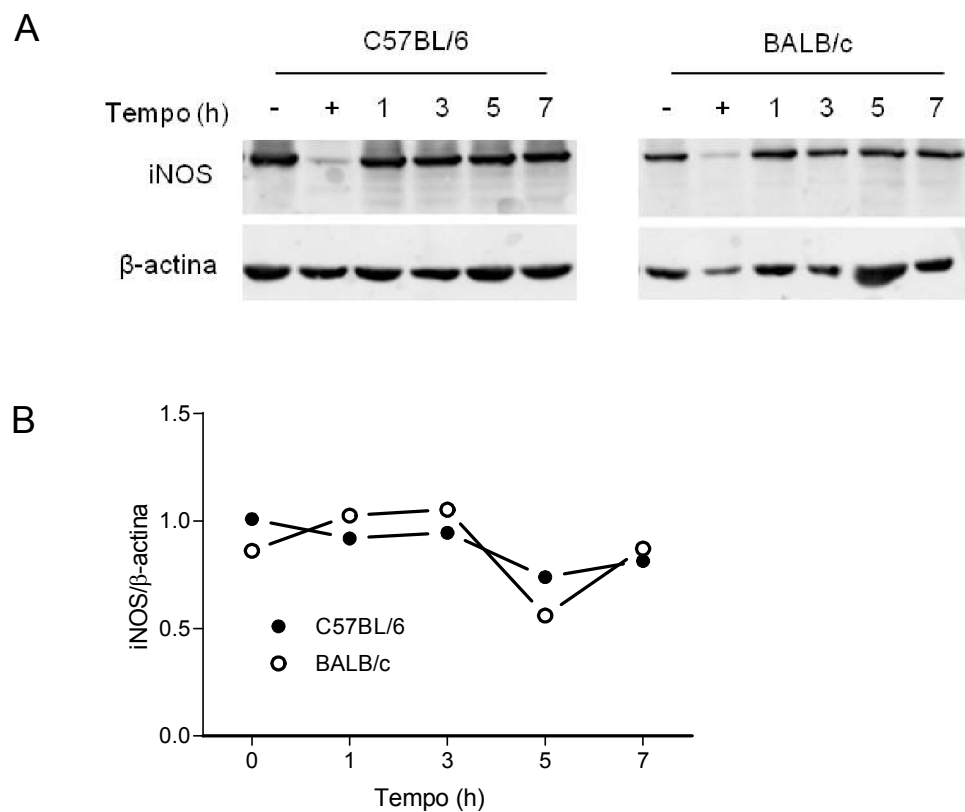


Figura 8. Degradação da proteína iNOS em macrófagos de C57BL/6 e BALB/c. **A)** Western Blot para análise da degradação da proteína iNOS em extratos protéicos de macrófagos peritoneais (1×10^6 células) de C57BL/6 e BALB/c estimulados com LPS ($1 \mu\text{g/mL}$) e tratados com CHX ($50 \mu\text{g/mL}$). (-): células apenas estimuladas com LPS, (+): células tratadas com CHX por 2 horas e estimuladas com LPS por 15 horas. (1, 3, 5, 7): tempo de tratamento (horas) com CHX após estimulação com LPS por 15 horas. **B)** Densitometria das bandas visualizadas no Western Blot com o programa ImageJ. O histograma representa a razão entre os valores quantificados das bandas de iNOS/β-actina para os tempos de tratamentos com CHX em relação aos valores obtidos para a razão da iNOS/β-actina do respectivo controle negativo do experimento.

4.6. Expressão de mRNA de iNOS

Para verificar se a expressão diferencial da enzima iNOS nos macrófagos de C57BL/6 e BALB/c é resultado do acúmulo diferencial do mRNA de iNOS, foram avaliados os níveis de mRNA por *Real Time* PCR em macrófagos estimulados com LPS por 3, 6, 15 e 24 horas. Após 3 horas de estimulação com LPS é observado um pequeno aumento na expressão do mRNA da iNOS em ambos os macrófagos estudados. Entretanto, após 15 horas de estimulação, a expressão do mRNA da iNOS começa a se diferenciar entre os macrófagos de C57BL/6 e BALB/c de forma que os macrófagos de C57BL/6 acumulam níveis cada vez maiores do mRNA da iNOS até o maior tempo analisado (24 horas) enquanto os macrófagos de BALB/c expressam níveis bem menores do mRNA da iNOS (Fig. 9). Resultado semelhante a este foi demonstrado por nosso grupo em macrófagos destes mesmos modelos experimentais estimulados simultaneamente com LPS e IFN- γ . Além disso, foi verificado anteriormente que o tempo de meia-vida, ou seja, a estabilidade dos mRNAs de iNOS em macrófagos de ambas as linhagens estimulados com LPS e IFN- γ são semelhantes, sugerindo que, pelo menos nesses macrófagos, a regulação da expressão da iNOS deve ocorrer principalmente ao nível transcricional (Santos *et al.*, 2006).

Juntos, esses resultados indicam que a sensibilidade diferencial de macrófagos de camundongos C57BL/6 e BALB/c a LPS para produção de NO é, pelo menos em parte, o reflexo de uma maior concentração de iNOS que, por sua vez, é o reflexo de uma maior concentração de seu mRNA, sendo esta, mais provavelmente devida a uma maior taxa de transcrição de seu gene.

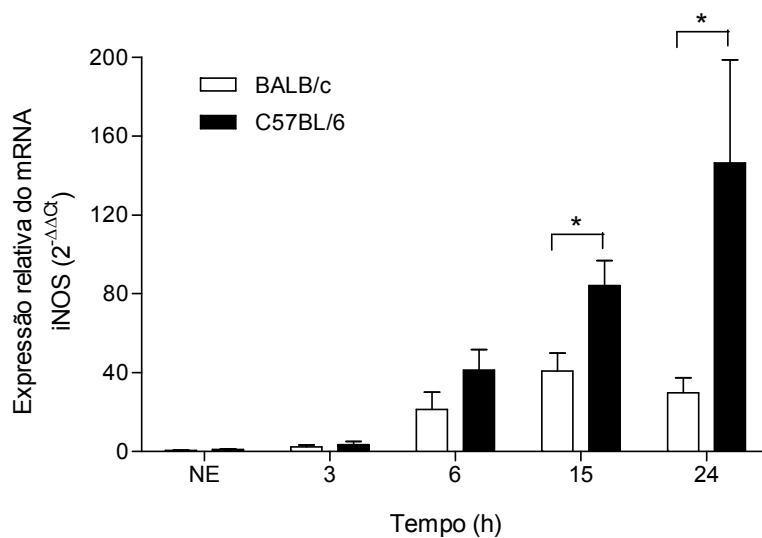
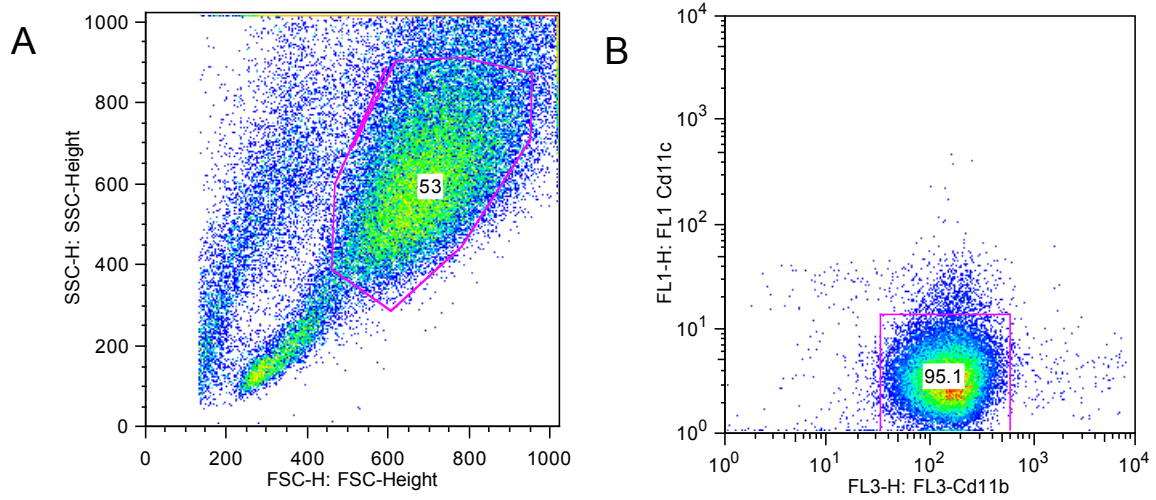


Figura 9. Expressão do mRNA da iNOS em macrófagos de C57BL/6 e BALB/c. Quantificação relativa de mRNA de iNOS por *Real Time* PCR utilizando o RNA total extraído de macrófagos peritoneais (5×10^6 células) de C57BL/6 e BALB/c estimulados com LPS ($1 \mu\text{g/mL}$) por 3, 6, 15 ou 24 horas, o SYBR Green como fluorescência e o método de ΔC_t relativo. O mRNA de β -actina foi utilizado como normalizador e a amostra C57BL/6 não estimulado como referência. (*) diferença estatisticamente significativa quando comparados C57BL/6 e BALB/c em cada tempo, $p < 0,05$. NE = não estimulado.

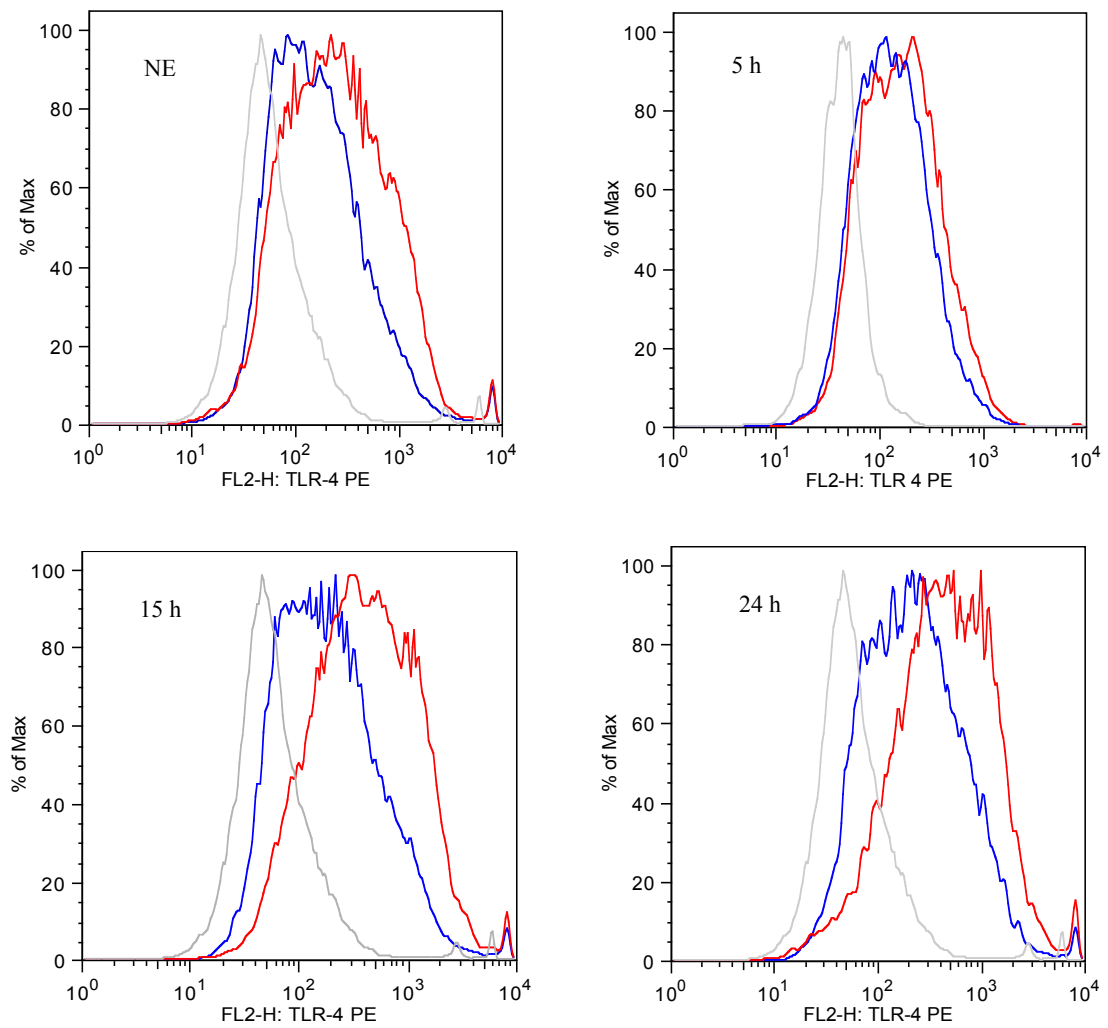
4.7. Análise da expressão do TLR4 na membrana celular dos macrófagos

O TLR4 é a molécula receptora que transduz os sinais da ativação dos macrófagos por LPS. Por isso, foi analisado o nível de expressão desse receptor em macrófagos de C57BL/6 e BALB/c, através da citometria de fluxo utilizando anticorpos anti-TLR4, anti-CD11b e anti-CD11c. Para a análise do nível de expressão do TLR4 foi selecionada a população de células CD11b positiva e CD11c negativa (Fig. 10A e B). Como observado na figura 10C e D, os macrófagos peritoneais não estimulados de C57BL/6 possuem uma maior densidade de TLR4 que macrófagos de BALB/c. A estimulação com LPS induz um aumento na expressão do TLR4 na membrana dos macrófagos tanto de C57BL/6 quanto de BALB/c, que se faz notar após 15 horas. Entretanto, os macrófagos de C57BL/6 continuam apresentando uma maior densidade deste receptor na membrana em relação aos macrófagos de BALB/c. Assim, é possível que o nível de TLR4 na superfície dos macrófagos de C57BL/6 e BALB/c esteja relacionado com a sensibilidade diferencial dessas células ao LPS para a produção de NO.



C

— Células não marcadas
 — BALB/c
 — C57BL/6



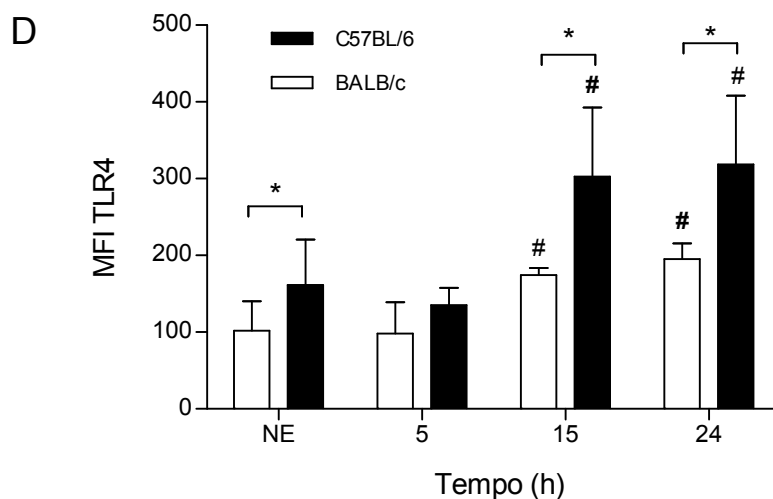


Figura 10. Expressão do TLR4 na membrana celular dos macrófagos de C57BL/6 e BALB/c. Análise da expressão de TLR4 na membrana dos macrófagos peritoneais, estimulados por 5, 15 ou 24 horas com LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$), de C57BL/6 e BALB/c por citometria de fluxo, utilizando anticorpos monoclonais anti-CD11b, anti-CD11c e anti-TLR4. A figura **A** representa um gráfico de tamanho (FSC) x granulosidade (SSC), e em destaque a população de granulócitos. A figura **B** representa a detecção de fluorescência de FL-1 (CD11c-FITC) versus FL-3 (CD11b-cy) dentro da população de granulócitos. A figura **C** representa a detecção da fluorescência de FL-2 (TLR4 PE) dentro da população representada em B. A figura **D** mostra um gráfico de intensidade média de fluorescência do TLR4. Os dados apresentados correspondem à média de três experimentos independentes. Os macrófagos não marcados foram usados como controle negativo. Diferença estatisticamente significante quando comparado C57BL/6 e BALB/c em cada tempo (*) ou quando comparado com seu respectivo controle (não estimulado) (#), $p < 0,05$. MIF = *mean fluorescence intensity*; NE = não estimulado.

4.8. Ativação do fator de transcrição NF- κ B

Os resultados obtidos até agora sugerem que a expressão diferencial da iNOS pelos macrófagos de C57BL/6 e BALB/c parece ser principalmente regulada a nível transcricional. Por isso, inicialmente foi analisada a ativação de dois fatores de transcrição envolvidos na indução da transcrição da iNOS. Um fator de transcrição essencial para a transcrição do gene da iNOS induzido por LPS é o NF- κ B. Por Western Blot, foi verificada a expressão da subunidade p65 fosforilada do NF- κ B e do I κ B- α , que é uma proteína inibidora da translocação do NF- κ B para o núcleo (Fig. 11). Pode-se observar que o pico de ativação do NF- κ B (p65) ocorre 15 minutos após estimulação com LPS tanto nos macrófagos de C57BL/6 quanto nos de BALB/c, sendo que nestes, a fosforilação do p65 é um pouco maior que nos macrófagos de C57BL/6. Após 60 minutos de estimulação com LPS, os níveis de p65 fosforilada tendem a voltar ao estado basal nos macrófagos de ambas as linhagens de camundongos. Concordando com este resultado, os níveis de I κ B- α nos extratos protéicos dos macrófagos foi inversamente proporcional aos níveis de p65 fosforilada. Porém, pela análise do I κ B- α , é mais visível que o NF- κ B (p65) fica ativo por mais tempo nos macrófagos de camundongos BALB/c.

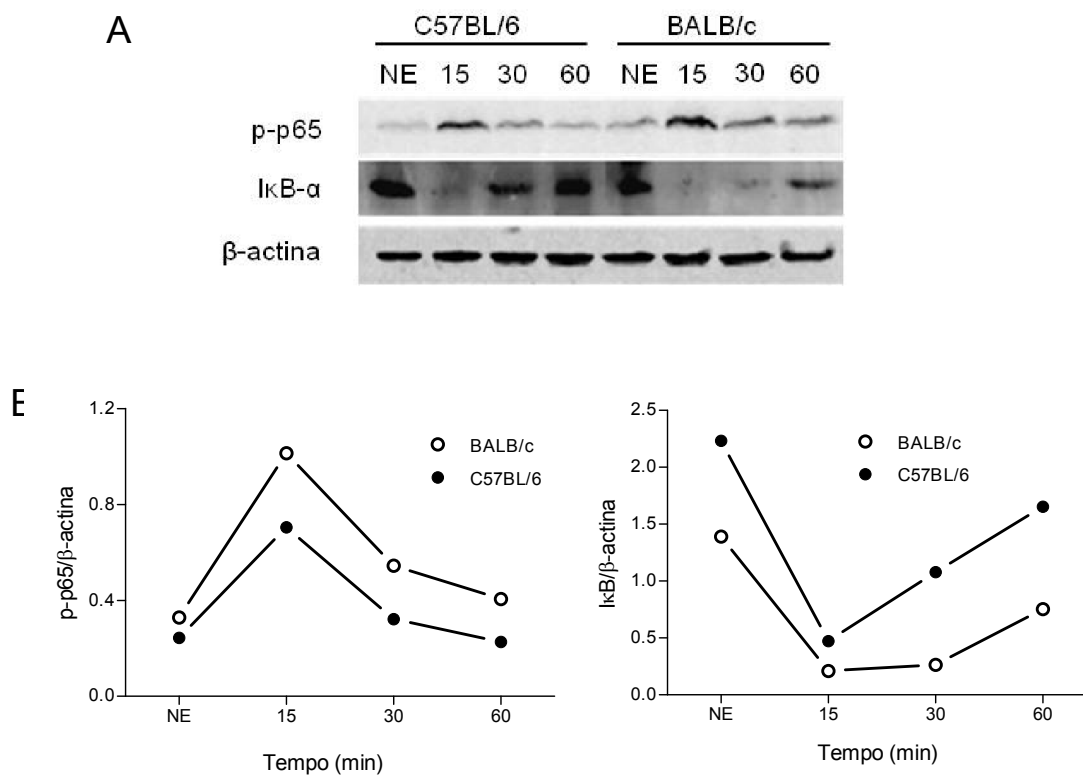


Figura 11. Ativação do NF-κB nos macrófagos de C57BL/6 e BALB/c. **A)** Western Blot de extrato protéico total de macrófagos peritoneais (1×10^6 células) de C57BL/6 e BALB/c estimulados com LPS ($1 \mu\text{g/mL}$) por 15, 30 e 60 minutos, utilizando anticorpo anti-p65 fosforilada, anti-IκB-α e anti-β-actina. **B)** Densitometria das bandas visualizadas no Western Blot com o programa ImageJ. O histograma representa a razão entre os valores quantificados das bandas de p65 ou IκB-α em relação aos valores obtidos para as respectivas bandas de β-actina. NE = não estimulado.

4.9. Ativação do fator de transcrição STAT-1

Outro fator de transcrição conhecidamente envolvido na transcrição da iNOS é o STAT-1. A expressão e a ativação deste fator de transcrição nos macrófagos de C57BL/6 e BALB/c foram analisadas através de Western Blot com anticorpos específicos para o STAT-1 total e o STAT-1 fosforilado. Pode-se observar que os macrófagos de C57BL/6 apresentam constitutivamente níveis maiores de STAT-1 total que os macrófagos de BALB/c. Além disso, o STAT-1 é diferencialmente fosforilado nos macrófagos peritoneais de C57BL/6 e BALB/c (Fig. 12 A e B). Após 4 horas de estimulação com LPS, foi possível visualizar duas bandas reativas com o anticorpo anti-fosfo-STAT-1 que devem corresponder a p91 (STAT-1 α) e p84 (STAT-1 β) tanto em C57BL/6 quanto em BALB/c (Fig. 12A). Entretanto, nos macrófagos de C57BL/6 a ativação do STAT-1 é mais forte e mais persistente já que permanece fosforilado nos tempos de 4 e 8 horas. Após 8 horas de estimulação com LPS, é observada uma queda no STAT-1 fosforilado. Já nos macrófagos de BALB/c a fosforilação do STAT-1 também é observada em 4 horas de estimulação com LPS, mas em 8 horas, o STAT-1 fosforilado diminui consideravelmente. Estes resultados mostram uma correlação entre a ativação diferencial do STAT-1 e a expressão diferencial da iNOS nos macrófagos de C57BL/6 e BALB/c estimulados por LPS.

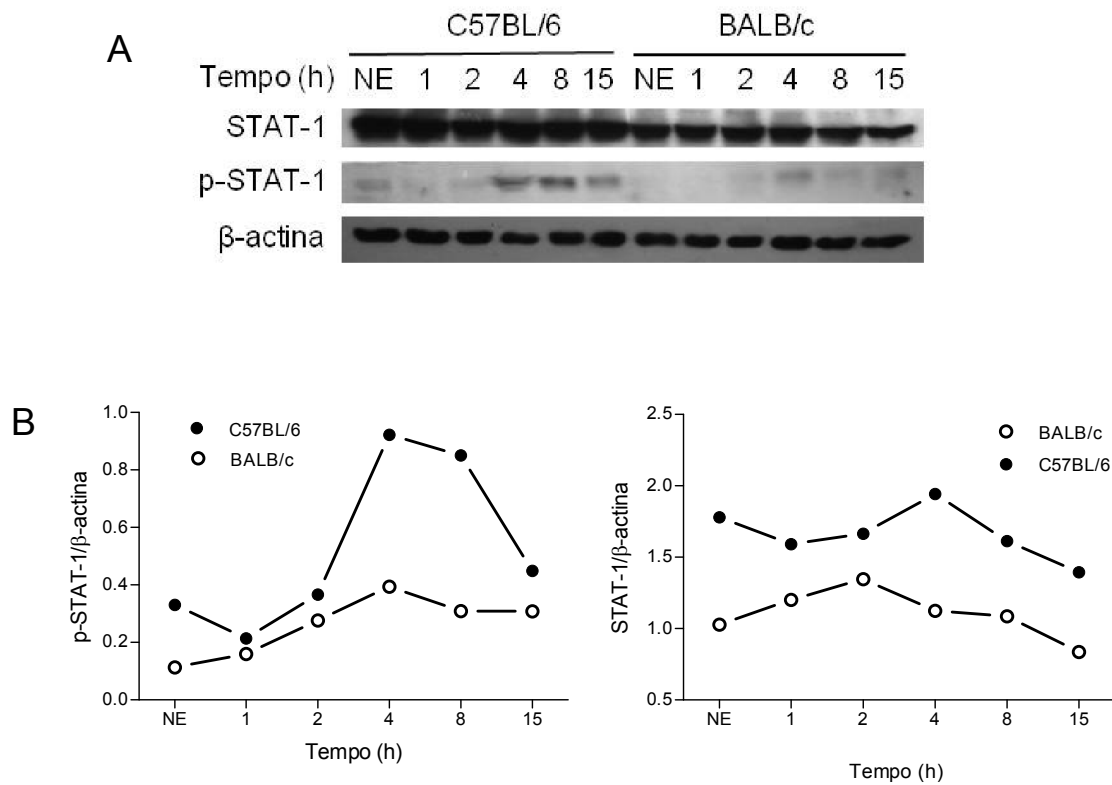


Figura 12. Expressão e ativação de STAT-1 nos macrófagos de C57BL/6 e BALB/c. A) Western Blot de extrato protéico total de macrófagos peritoneais (1×10^6 células) de C57BL/6 e BALB/c estimulados com LPS ($1 \mu\text{g/mL}$) por 1, 2, 4, 8 e 15 horas, utilizando anticorpo anti-STAT-1 fosforilado, anti-STAT-1 total e anti- β -actina. **B)** Densitometria das bandas visualizadas no Western Blot com o programa ImageJ. O histograma representa a razão entre os valores quantificados das bandas de p-STAT-1 ou STAT-1 total em relação aos valores obtidos para as respectivas bandas de β -actina. NE = não estimulado.

4.10. Análise da produção de IFN- β , um indutor da ativação do STAT-1 estimulado por LPS

Os interferons do tipo I, especialmente o IFN- β , podem ser fortes indutores da expressão de iNOS em macrófagos murinos quando estimulados com LPS, por meio da ativação de STAT-1 (Diefenbach *et al.*, 1998; Jacobs & Ignarro, 2001). Como foi observada a ativação diferencial de STAT-1 pelos macrófagos de C57BL/6 e BALB/c, foi realizado um experimento de *Real Time* PCR para verificar se esta ativação diferencial de STAT-1 está relacionada à produção diferencial de IFN- β por estes macrófagos. Compatível com a ativação diferencial de STAT-1, os macrófagos de C57BL/6 expressam mais IFN- β que os macrófagos de BALB/c em todos os tempos analisados (Fig. 13). O LPS induz um aumento na expressão de IFN- β após 1 e 5 horas de estimulação, sendo de forma mais proeminente nos macrófagos de C57BL/6. Após 15 horas de estimulação, os níveis de mRNA de IFN- β caem para valores próximos aos nível basal.

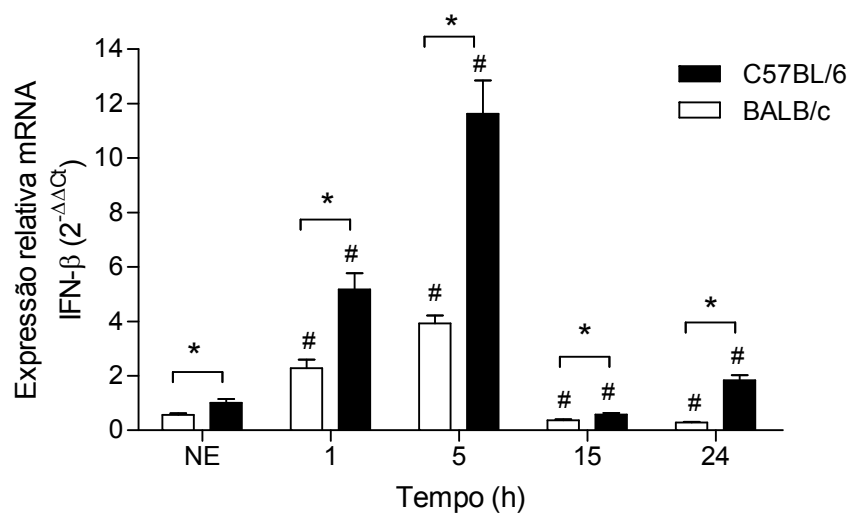


Figura 13. Expressão do mRNA de IFN- β nos macrófagos de C57BL/6 e BALB/c. Quantificação relativa de mRNA de IFN- β por *Real Time* PCR utilizando o RNA total extraído de macrófagos peritoneais (5×10^6 células) de C57BL/6 e BALB/c estimulados com LPS ($1 \mu\text{g/mL}$) por 1, 5, 15 ou 24 horas, o SYBR Green como fluorescência e o método de ΔCt relativo. O mRNA de β -actina foi utilizado como normalizador e a amostra C57BL/6 não estimulado como referência. Diferença estatisticamente significativa quando comparado C57BL/6 e BALB/c em cada tempo (*) ou quando com seu respectivo controle (não estimulado) (#), $p < 0,05$. NE = não estimulado.

4.11. Análise do Papel do IFN- β

Como o nível de mRNA de IFN- β é diferente nos macrófagos de C57BL/6 e BALB/c, foi realizado alguns experimentos na tentativa de verificar a importância desta citocina na produção diferencial de NO pelos macrófagos dos modelos animais estudados.

4.11.1. Produção de NO pelos macrófagos estimulados com Poli(I:C)

O Poli(I:C) é um RNA fita dupla sintético, agonista de TLR3, que induz IFN- β em macrófagos e células dendríticas. Por isso, este indutor foi utilizado para estimular os macrófagos peritoneais, bem como os macrófagos derivados de medula óssea, de camundongos C57BL/6 e BALB/c, para verificar se a produção de IFN- β mediada por TLR3 também leva a uma produção diferencial de NO por estas duas linhagens de camundongos. Como visto na figura 14, os macrófagos de C57BL/6 produzem mais NO quando estimulados com Poli(I:C) que os macrófagos de BALB/c e de uma maneira dose-dependente (Fig. 14A). Os macrófagos peritoneais de C57BL/6 têm uma cinética de produção de NO semelhante a quando estimulados com LPS, sempre com a produção superior às dos macrófagos de BALB/c. É interessante notar que quando estimulados por Poli(I:C) por 72 horas, macrófagos de BALB/c chegam a produzir NO em níveis comparáveis aos que os macrófagos de C57BL/6 produzem em 24 horas, o que pode sugerir que em concentrações apropriadas de IFN- β , os macrófagos de BALB/c podem ser capazes de produzir tanto NO quanto as células de C57BL/6. Também como quando estimulados com LPS, os macrófagos derivados de medula óssea produzem menos NO os macrófagos peritoneais (Fig. 14B e C). Estes resultados sugerem que o IFN- β pode ter um papel importante na produção diferencial de NO pelos macrófagos de C57BL/6 e BALB/c.

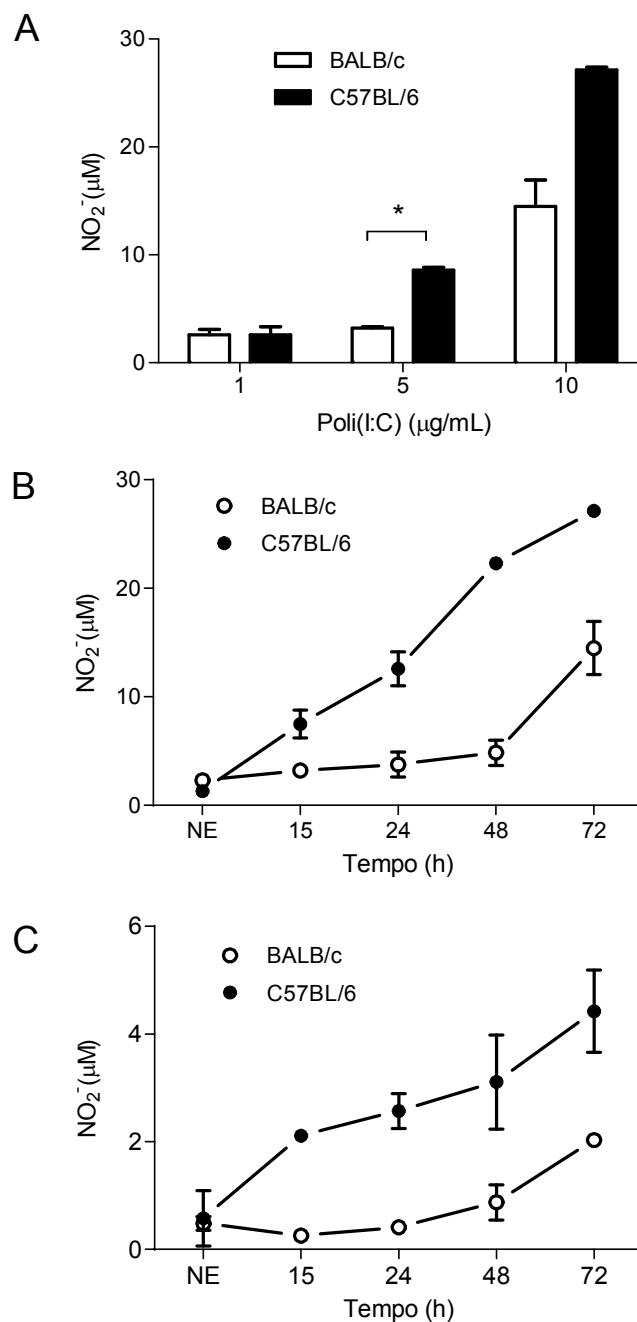


Figura 14. Produção de NO pelos macrófagos de C57BL/6 e BALB/c estimulados com poli(I:C). **A)** Dose resposta de produção de NO por macrófagos peritoneais (1×10^5 células) de C57BL/6 e BALB/c estimulados com diferentes doses de Poli(I:C) por 72 horas. (*) diferença estatisticamente significativa quando comparado C57BL/6 e BALB/c em cada tempo, $p < 0,05$. **B)** Cinética de produção de NO pelos macrófagos peritoneais (1×10^5 células) de C57BL/6 e BALB/c estimulados com Poli(I:C) ($10 \mu\text{g/mL}$) nos tempos 15, 24, 48 e 72 horas. **C)** Cinética de produção de NO pelos macrófagos derivados de medula óssea de C57BL/6 e BALB/c estimulados com Poli(I:C) ($10 \mu\text{g/mL}$) nos tempos 15, 24, 48 e 72 horas.

4.11.2. Ensaio de neutralização do IFN- β : produção de NO e ativação do STAT-1

Em busca de um maior entendimento do papel IFN- β na produção diferencial de NO pelos macrófagos de C57BL/6 e BALB/c, foi realizado um experimento onde os macrófagos foram estimulados com LPS e tratados com anticorpo de neutralização de IFN- β . Foi observado que a utilização do anticorpo de neutralização de IFN- β foi capaz de inibir a produção de NO nos macrófagos de C57BL/6, mas não nos macrófagos de BALB/c. A inibição nos macrófagos de C57BL/6 se mostrou dependente da concentração do anticorpo (Fig. 15A), sendo que com 200 U/mL do anticorpo neutralizante, houve uma redução de aproximadamente 60% na produção de NO (Fig. 15B). Na cinética de produção de NO representada na figura 15B, verifica-se que a produção de NO pelos macrófagos de C57BL/6 se iguala aos níveis de NO produzido pelos macrófagos de BALB/c. Este resultado indica que o IFN- β é o principal fator responsável pela produção diferencial de NO pelos macrófagos de C57BL/6 e BALB/c.

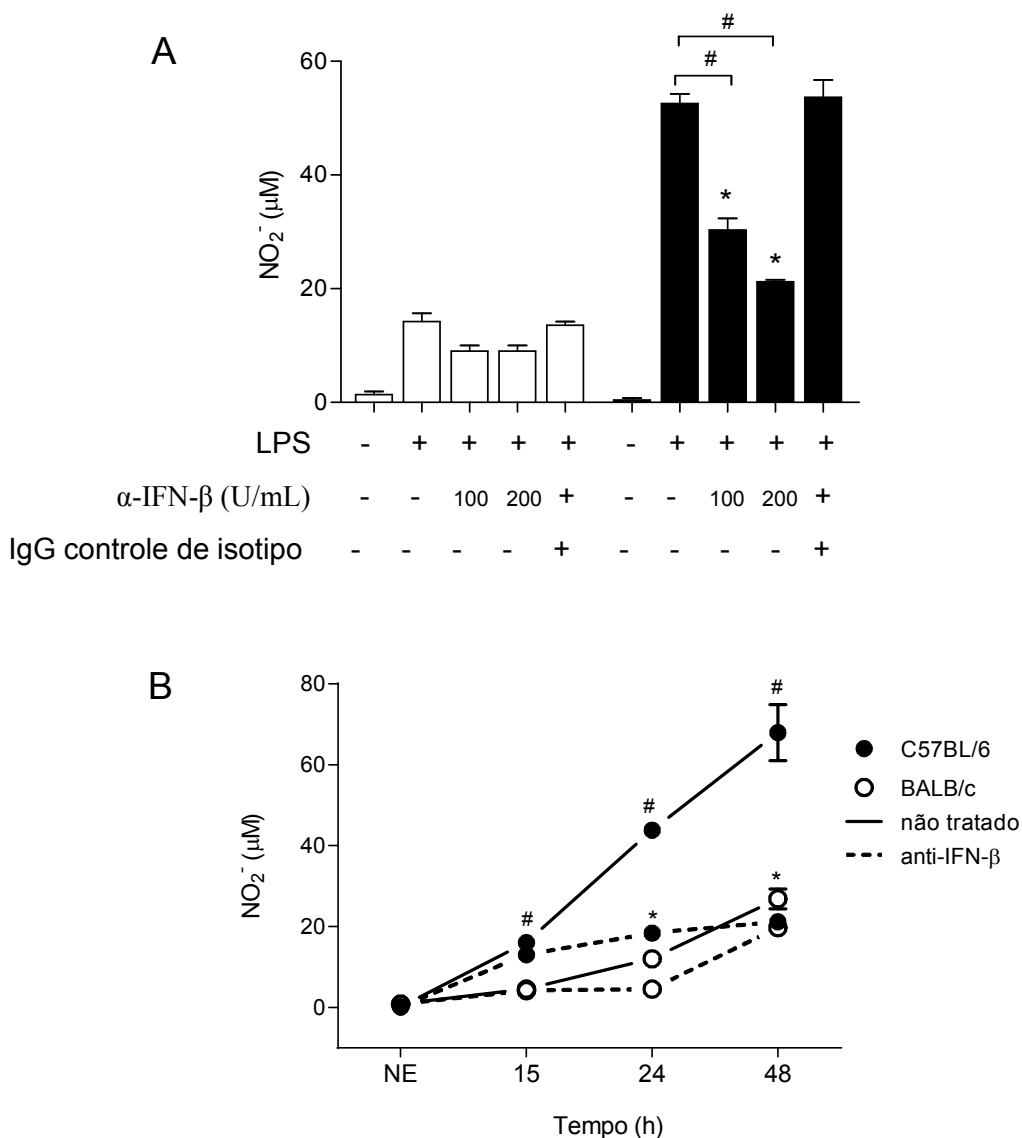


Figura 15. Efeito da neutralização de IFN-β na produção de NO pelos macrófagos de C57BL/6 e BALB/c. **A)** Produção de NO pelos macrófagos peritoneais (1×10^5 células) de C57BL/6 e BALB/c tratados com LPS ($1 \mu\text{g/mL}$), anticorpo anti-IFN-β (100 e 200 U/mL) e/ou IgG controle de isotipo por 24 horas. **B)** Cinética de produção de NO pelos macrófagos peritoneais (1×10^5 células) de C57BL/6 e BALB/c após estimulação com LPS ($1 \mu\text{g/mL}$) e/ou tratamento com anticorpo anti-IFN-β (200 U/mL) por 15, 24 e 48 horas. Como controle de isotipo foi utilizado IgG purificada de soro de coelho na concentração de 350 ng/mL o que equivale a concentração de 200 U/mL do anticorpo anti-IFN-β conforme as informações do fabricante. Diferença estatisticamente significante quando comparado C57BL/6 tratado com anti-IFN-β com o C57BL/6 não tratado em cada tempo (#) ou com o BALB/c não tratado (*), $p < 0,05$. NE = não estimulado.

Para verificar se a maior ativação do STAT-1 nos macrófagos de C57BL/6 é devido a maior produção de IFN- β , foi realizado um experimento de *Western Blot* para STAT-1 fosforilado nos extratos proteicos total de macrófagos peritoneais de C57BL/6 estimulados com LPS e/ou tratados com anticorpo de neutralização de IFN- β . A figura 16 mostra que a neutralização do IFN- β aboliu a ativação do STAT-1 nos macrófagos de C57BL/6. Assim, é possível inferir que a maior expressão de iNOS nos macrófagos de C57BL/6 em relação aos macrófagos de BALB/c é dependente da maior ativação de STAT-1 mediada pela maior produção de IFN- β .

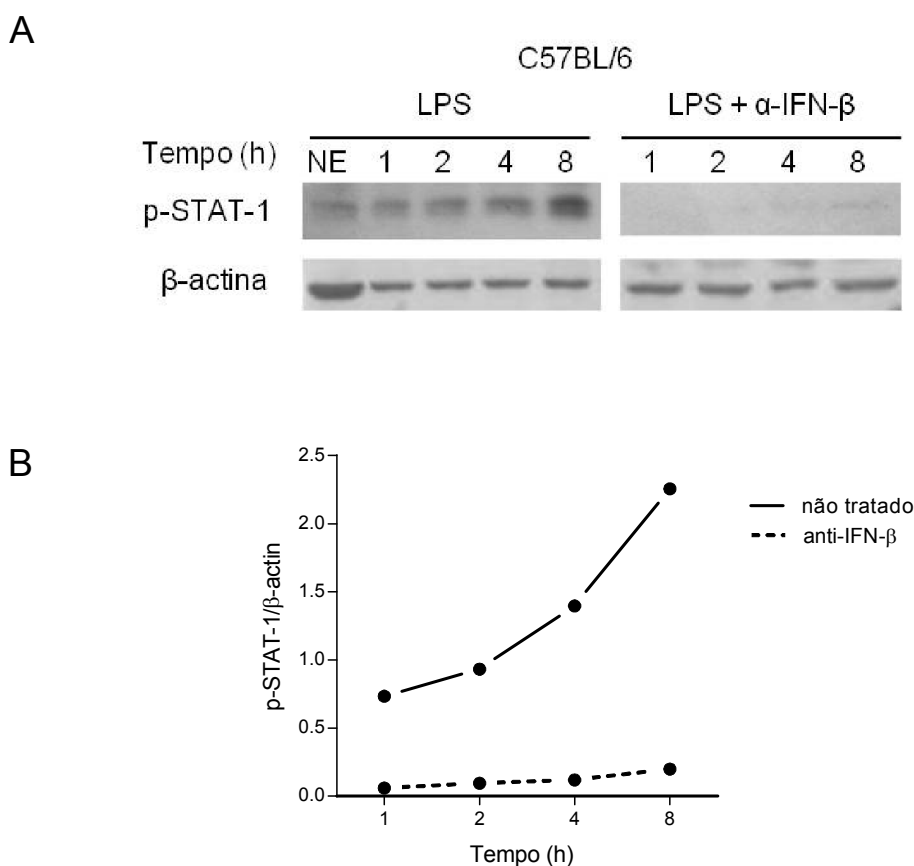


Figura 16. Efeito da neutralização de IFN- β na ativação de STAT-1 nos macrófagos de C57BL/6. **A)** Western Blot de extrato protéico total de macrófagos peritoneais (3×10^5 células) de C57BL/6 estimulados com LPS ($1 \mu\text{g/mL}$) e/ou tratados com anticorpo anti-IFN- β (250 U/mL) por 1, 2, 4, 8 horas, utilizando anticorpo anti-STAT-1 fosforilado e anti- β -actina. **B)** Densitometria das bandas visualizadas no Western Blot com o programa ImageJ. O histograma representa a razão entre os valores quantificados das bandas de p-STAT-1 em relação aos valores obtidos para as respectivas bandas de β -actina. NE = não estimulado.

4.12. Análise da produção de citocinas

Sabendo do papel de algumas citocinas na regulação da iNOS, também foram analisadas a produção de TNF- α , um possível indutor da iNOS e IL-10, um possível repressor desta proteína (Perrela *et al.*, 1996; MacMicking *et al.*, 1997; Zamora *et al.*, 2000) por meio das técnicas de *Real Time* PCR e ELISA. O resultado apresentado na figura 17 mostra que o LPS induz a expressão e secreção de IL-10 e TNF- α tanto nos macrófagos de C57BL/6 quanto de BALB/c. Entretanto, os macrófagos de C57BL/6 expressam e secretam de forma mais proeminente IL-10 (Fig. 17A e B), enquanto que os macrófagos de BALB/c expressam e secretam mais TNF- α que os macrófagos de C57BL/6 (Fig. 17C e D). Esses resultados mostram que a expressão de iNOS nos macrófagos de C57BL/6 apresenta uma correlação direta com a expressão de IL-10 e inversa com a expressão de TNF- α . Assim, é provável que estas citocinas não tenham um papel importante no acréscimo da produção de NO de macrófagos de C57BL/6 sobre a de células de BALB/c. No entanto, se essas citocinas estão envolvidas na produção diferencial de NO não foi ainda investigado.

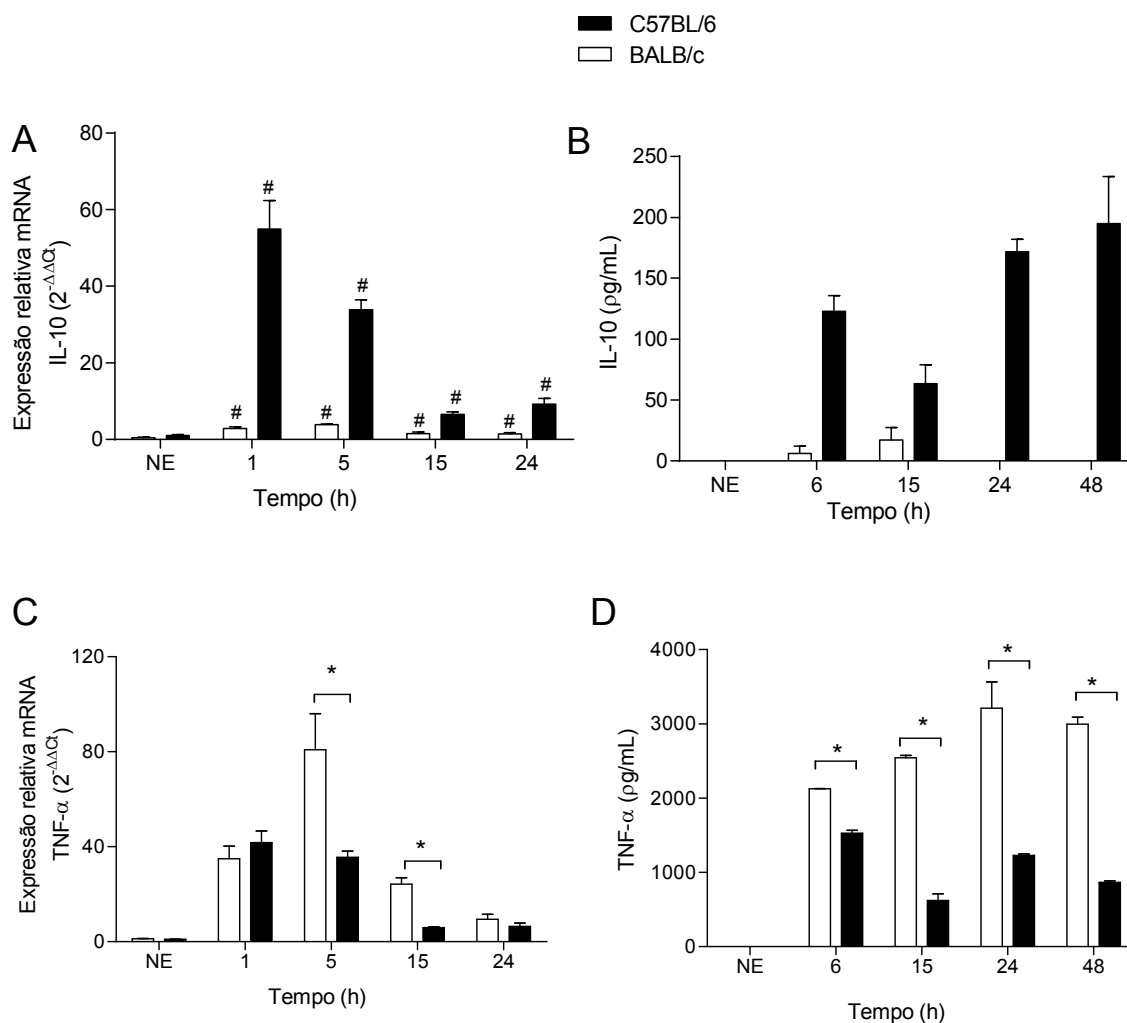


Figura 17. Produção de TNF- α e IL-10 pelos macrófagos de C57BL/6 e BALB/c. Quantificação relativa de mRNA de IL-10 (A) e TNF- α (C) por *Real Time* PCR utilizando o RNA total extraído de macrófagos peritoneais (5×10^6 células) de C57BL/6 e BALB/c estimulados com LPS ($1 \mu\text{g/mL}$) por 1, 5, 15 e 24 horas, o SYBR Green como fluorescência e o método de ΔC_t relativo. O mRNA de β -actina foi utilizado como normalizador e a amostra C57BL/6 não estimulado como referência. Dosagem de IL-10 (B) e TNF- α (D) no sobrenadante da cultura de macrófagos peritoneais (1×10^6 células) de C57BL/6 e BALB/c estimulados com LPS ($1 \mu\text{g/mL}$) por 6, 15, 24 e 48 horas pelo método ELISA. Os valores apresentados representam a média \pm SD de amostras testadas em triplicatas. Diferença estatisticamente significativa quando comparado C57BL/6 e BALB/c em cada tempo (*) ou quando com seu respectivo controle (não estimulado) (#), $p < 0,05$. NE = não estimulado.

*Mecanismos moleculares determinantes da sensibilidade diferencial de macrófagos
de camundongos C57BL/6 e BALB/c a LPS para produção de NO*

5. Discussão

O reconhecimento de produtos microbianos por TLRs estimula a ativação de mecanismos antimicrobianos nos macrófagos incluindo a produção de NO pela iNOS aumentando assim a capacidade do macrófago em matar o microrganismo fagocitado (Motoyama *et al.*, 2010; Buzzo *et al.*, 2010; Cole *et al.*, 2012). Dependendo da infecção, a contribuição da iNOS, assim como da maioria das “armas” do arsenal do sistema imune à proteção do hospedeiro pode ser maléfica, benéfica ou inócua, refletindo a diversidade das vias metabólicas, invasivas e evasivas do agente infeccioso e a necessidade do hospedeiro em desenvolver uma variedade de respostas (Nathan, 1997).

O NO é a principal molécula efetora da maquinaria antimicrobiana e antitumoricida dos macrófagos, dotando essas células com a capacidade de matar ou inibir o crescimento de vírus, bactérias, fungos, protozoários, helmintos e células tumorais (Bogdan, 2001). Em macrófagos, a iNOS, enzima que catalisa a síntese do NO, não possui expressão constitutiva mas pode ser induzida por uma variedade de citocinas tais como IFN- γ , IFN- β , TNF- α , IL-2 (Oswald *et al.*, 1994) e PAMPs ligantes de TLR3 (Pindado *et al.*, 2007; Motoyama *et al.*, 2009), TLR4 (Stuehr & Marletta, 1985; Beutler, 2000) e TLR5 (Mizel *et al.*, 2003; Buzzo *et al.*, 2010). Em modelos murinos, o NO tem-se mostrado importante ou mesmo essencial para o controle do patógeno em várias doenças infecciosas (Nathan, 1997; Rossol *et al.*, 2011). Em humanos apresentando lepra ou leishmaniose cutânea, uma redução na expressão da iNOS no tecido está correlacionada com uma doença mais grave (Khanolkar-Young *et al.*, 1998; Qadoumi *et al.*, 2002).

Embora se tenha uma grande quantidade de informação sobre a resposta imune nas doenças infecciosas, ainda é necessário um melhor entendimento sobre os mecanismos que conferem resistência para a maioria delas, particularmente daquelas causadas por parasitas. A descoberta que os linfócitos T auxiliares diferem nos seus padrões de produção de citocinas (Mosmann *et al.*, 1986) trouxe um progresso no entendimento da resistência do hospedeiro a doenças infecciosas. Usando o modelo de infecção por *L. major* em camundongos C57BL/6 e BALB/c, Heinzl e colaboradores (Heinzl *et al.*, 1989) e Locksley & Scott (1991) mostraram que camundongos C57BL/6, que apresentam um fenótipo de resistência, polarizam sua resposta a Th1 enquanto camundongos BALB/c, que possuem um fenótipo de susceptibilidade, polarizam para a resposta Th2. Este modelo também forneceu evidências inequívocas de que o NO produzido pelos macrófagos estimulados com IFN- γ derivado da resposta Th1 é o

principal componente responsável para o controle e erradicação do parasita (Reiner & Locksley, 1993; Liew *et al.*, 1999).

A polarização Th1/Th2 tem sido descrita em humanos e hospedeiros experimentais para muitas outras doenças infecciosas (Jankovic *et al.*, 2001). Entretanto, alguns dados têm desafiado a simplicidade do modelo de resistência e susceptibilidade baseado neste paradigma Th1/Th2. Parte desta reavaliação resulta da identificação de outras células T CD4⁺ que podem significativamente influenciar no resultado final da doença. Tais populações incluem células T CD4⁺ reguladoras, células T CD4⁺ Th17, Th9 e células T auxiliares foliculares (Matthews *et al.*, 2000; Sacks e Noben-Trauth, 2002; Alexander & Brombacher, 2012). Além disso, há várias observações de que a polarização Th não explica a resistência ou a susceptibilidade para todos os microrganismos (McMahon-Pratt & Alexander, 2004; Infante-Duarte & Kamradt, 1999) e também alguns trabalhos demonstrando o importante papel da imunidade inata no controle do crescimento microbiano e na modulação da resposta imunidade adaptativa (Scharton-Kersten & Scott, 1995; Dabbagh & Lewis, 2003).

Dentro deste contexto, o presente trabalho adiciona uma nova informação aos clássicos modelos de resistência e susceptibilidade dos camundongos C57BL/6 e BALB/c, respectivamente, a várias doenças infecciosas mostrando *in vitro* porque macrófagos de C57BL/6 são mais responsivos à estimulação de TLR4 para a produção de NO que camundongos BALB/c, de forma independente da resposta adaptativa Th. Nosso interesse nesta resposta diferencial reside no fato de que, *in vivo*, uma contenção precoce de parasitas, facilmente observada na pele e nos linfonodos no dia 1 da infecção com *L. major*, é crucial para a resistência de camundongos C57BL/6 a este parasita. Essa contenção do crescimento do parasita é independente de células T e NK e dependente de IFN- γ (Laskay *et al.*, 1995), sendo mediada por iNOS (Diefenbach *et al.*, 1998). Assim, nossa hipótese é de que a capacidade inerente dos macrófagos de camundongos C57BL/6 de produzir NO em resposta aos PAMPs dos patógenos e/ou citocinas, antes mesmo de produzirem uma resposta protetora Th1, levaria a uma diminuição do crescimento do patógeno facilitando a sua eliminação. Ao contrário, a capacidade inerentemente baixa de camundongos BALB/c de produzir NO em resposta à mesma carga parasitária ou quantidade de citocinas favoreceria o crescimento do parasita, que seria agravado pela resposta subsequente do tipo Th2. Além disto, já foi mostrado que macrófagos de camundongos C57BL/6 e de camundongos BALB/c

direcionam a polarização dos linfócitos Th para Th1 e Th2, respectivamente (Mills *et al.*, 2000).

Anteriormente, o nosso grupo mostrou que os macrófagos de C57BL/6 produzem mais NO que os macrófagos de BALB/c quando estimulados simultaneamente com LPS e IFN- γ , e que essa produção diferencial de NO é uma consequência da maior expressão da proteína e do mRNA da iNOS, mostrando que a expressão de iNOS é regulada diferencialmente em macrófagos de camundongos C57BL/6 e BALB/c (Santos *et al.*, 2006). Contudo, até o momento, as causas dessa regulação diferencial são desconhecidas. Para este estudo, a produção diferencial de NO nestes mesmos modelos experimentais foi estudada tendo como estímulo apenas a ativação por LPS, para restringir o estudo para a sinalização mediada por TLR4.

Inicialmente foi mostrado que nas concentrações de LPS utilizadas, macrófagos peritoneais ou derivados da medula óssea de camundongos C57BL/6 produzem consideravelmente mais NO do que as células de camundongos BALB/c (Fig. 4), ficando claro que os baixos níveis de NO produzidos não são devidos a um atraso em sua síntese. Uma vez que a arginase também age sobre a L-arginina e sua expressão pode ser modulada por LPS era necessário determinar se esta enzima estaria interferindo com a produção de NO pelos macrófagos estimulados. Embora as isoformas arginase I e arginase II sejam constitutivamente mais expressas e tenham essa expressão aumentada por LPS em macrófagos de camundongos C57BL/6 e BALB/c, respectivamente, não foi observada diferença na atividade total da enzima (Fig. 6). Assim, a menor produção de NO por macrófagos de camundongos BALB/c não parece ser devido a uma depleção da L-arginina pela arginase. No entanto, não se pode ignorar a possibilidade que a indução diferencial das isoformas da arginase possa ter alguma relevância para as demais diferenças observadas entre os macrófagos de C57BL/6 e BALB/c após estimulação com o LPS. Estes dados estão de acordo com Mills e colaboradores (2000), que mostraram que embora macrófagos de camundongos C57BL/6 constitutivamente apresentem uma maior atividade de arginase do que células de BALB/c, a ativação desses macrófagos leva a uma pequena diminuição da atividade de arginase em macrófagos de C57BL/6 e um aumento em BALB/c resultando apenas em pequenas diferenças na atividade da arginase nesses dois tipos celulares. A coindução de iNOS e arginase pode ser um mecanismo de regular a produção de NO, e assim impedir a

apoptose mediada pelo NO, já que a sua superprodução é tóxica aos macrófagos e células vizinhas (Salimuddin *et al.*, 1999; Mori, 2007).

Da mesma forma que verificado anteriormente com o estímulo simultâneo de LPS e IFN- γ , foi mostrado aqui que a regulação diferencial da síntese de NO induzida pela estimulação apenas do TLR4 correlaciona diretamente com o acúmulo da enzima iNOS (Fig. 7). O maior estoque de iNOS em macrófagos de camundongos C57BL/6 não é devido a uma menor degradação da enzima (Fig. 8) e correlaciona com a maior expressão de mRNA (Fig. 9). O maior acúmulo de mRNA não parece ser devido a uma maior estabilidade da molécula, uma vez que a degradação de mRNA de iNOS segue a mesma cinética em macrófagos de C57BL/6 e BALB/c (Santos *et al.*, 2006). Portanto, após a ativação do TLR4, há uma regulação diferencial da expressão de iNOS tanto no nível da proteína como do mRNA semelhante ao observado em células simultaneamente estimuladas com LPS e IFN- γ . Junto com o fato de que macrófagos de C57BL/6 duplamente estimulados expressam mais mRNA de STAT-1 e de IRF-1, e de que STAT-1 permanece ativado por 30 minutos a mais do que em macrófagos de BALB/c (resultados não publicados), os resultados obtidos neste trabalho sugerem fortemente que a transcrição da iNOS é mais eficiente em macrófagos de C57BL/6 do que em células de BALB/c.

Os fatores de transcrição STAT-1 e NF- κ B cooperam para a ativação transcrricional de muitos genes inflamatórios que contem sítios de ligação relacionados em seus promotores (Ohmori *et al.*, 1997; Ohmori & Hamilton, 2001). De fato, foi observado que STAT-1 e NF- κ B são ativados em macrófagos tanto de C57BL/6 como de BALB/c. Contudo, o grau e/ou o tempo de ativação são diferentes nessas células. Quanto ao STAT-1, a fosforilação é mais forte e observada por mais tempo em macrófagos de C57BL/6 (pelo menos até 15 horas) do que em células de BALB/c (Fig. 12). Contudo, inesperadamente, a ativação de NF- κ B em macrófagos de BALB/c é algo um pouco mais proeminente e duradoura do que em células de C57BL/6 (Fig. 11). É possível que a quantidade de NF- κ B ativo em macrófagos de C57BL/6, nos quais o STAT-1 é eficientemente ativo, seja suficiente para a transcrição completa da iNOS. Assim como, o fato de que STAT-1 ativo seja escasso em macrófagos de BALB/c (Fig. 12) pode explicar uma menor transcrição de iNOS mesmo em um ambiente de mais alta ativação de NF- κ B. Estes resultados estão de acordo com o trabalho de Ohmori &

Hamilton (2001) que mostrou que o NF- κ B não é suficiente para a completa transcrição da iNOS e que STAT-1 é um determinante crítico para a expressão de vários genes induzíveis por LPS, como a iNOS, em macrófagos murinos.

A ligação de LPS a TLR4 não induz diretamente a ativação de STAT-1 (Deng *et al.*, 1996; Lu *et al.*, 2008). Foi então necessário procurar por citocinas que exercesse esta função. Uma busca pelo perfil de citocinas produzidas por macrófagos em resposta à ativação de TLR4 mostrou que TNF- α , IL-10 e IFN- β são diferencialmente expressos em macrófagos de camundongos C57BL/6 e BALB/c, sendo que TNF- α é menos expresso em macrófagos de camundongos C57BL/6 do que em células de camundongos BALB/c, e o oposto foi observado para IL-10 e IFN- β (Figs. 13 e 17). Já é sabido há longo tempo que IFN- β endógeno fornece um sinal essencial para a produção de NO desencadeada por LPS por macrófagos murinos, embora, por si só, esta citocina não seja capaz de induzir a produção de NO (Zhang *et al.*, 1994; Gao *et al.*, 1998). Em macrófagos estimulados com IFN- α ou LPS mais IFN- γ , sabe-se que STAT-1 é essencial para a produção de NO (Meraz *et al.*, 1996). Além disto, a expressão de iNOS em macrófagos estimulados apenas com LPS é dependente da fosforilação de STAT-1, a qual é, em grande parte, atribuída à síntese e ação autócrina/parácrina de IFN- α/β (Fujihara *et al.*, 1994; Zhang *et al.*, 1994; Ohmori & Hamilton, 2001; Thomas *et al.*, 2006), que atua como o segundo estímulo necessário para a indução “ótima” do gene da iNOS.

Foi mostrado aqui que a sinalização gerada pela estimulação por LPS para a produção ótima de NO é altamente dependente da ativação de STAT-1 mediada por IFN- β , em macrófagos de C57BL/6, mas não em macrófagos de BALB/c (Fig. 15). Mais importantes são os novos achados de que: 1) esta importante via para a produção de NO está severamente comprometida em macrófagos de BALB/c (Fig. 13) e 2) esta é a razão pela qual estas células são incapazes de produzir tanto NO quanto macrófagos de C57BL/6. Este último achado é claramente demonstrado pelo fato de que a neutralização do IFN- β com anticorpo específico abole a ativação de STAT-1 nos macrófagos de C57BL/6 (Fig. 16) e os deixa equivalentes aos macrófagos de BALB/c com relação à produção de NO (Fig. 15).

O gene codificador do IFN- β é constitutivamente transcrito em macrófagos peritoneais. Entretanto seus mRNAs são instáveis e por isso estão presentes em baixas

quantidades em células não estimuladas. O tratamento com LPS estabiliza o mRNA do IFN- β resultando na secreção desta citocina no meio de cultura (Gessani *et al.*, 1991; Gao *et al.*, 1998). Ambos os interferons do tipo I e do tipo II induzem a fosforilação de STAT-1 α . O STAT-1 não só se liga diretamente ao promotor da iNOS como favorece ainda mais a transcrição deste gene pela indução da transcrição do gene do IRF-1. A acumulação no núcleo de NF- κ B, de homodímeros de STAT-1 α , do IRF-1 e dos fatores de transcrição Oct-1 e Oct-2, que já estão constitutivamente presentes no núcleo, permite a *trans*-ativação do gene da iNOS (Gao *et al.*, 1998). A maior produção de NO pelos macrófagos de C57BL/6 em relação aos macrófagos de BALB/c quando estimulados com Poli(I:C), um agonista de TLR3 e indutor da produção de IFN- β , além de reforçar que é a expressão diferencial de IFN- β determinante para a produção diferencial de NO, mostra que macrófagos de BALB/c também são deficientes na produção de NO mediada por TLR3. É ainda bem possível que o STAT-1 ativado por IFN- β possa induzir a expressão de mais IFN- β que também parece depender da ativação de STAT-1 (Kamezaki *et al.*, 2004; Schindler *et al.*, 2007; Sin *et al.*, 2012), um aspecto que ainda precisa ser investigado.

A maior densidade de TLR4 na membrana celular dos macrófagos de C57BL/6 antes e após estimulação com o LPS (Fig. 10), pode estar permitindo que estes macrófagos sejam mais sensíveis à ativação pelo LPS que os macrófagos de BALB/c, embora isto não pareça ser o determinante principal. Entretanto o papel dessa diferença de expressão de TLR4 nos macrófagos de C57BL/6 e BALB/c precisa ser mais bem investigado. O TLR4 induz duas vias de sinalização independentes que são reguladas pelos pares de adaptadores TIRAP-MyD88 e TRAM-TRIF. A via de sinalização dependente de TIRAP-MyD88 induz uma rápida ativação de serino-treonina cinases tais como p38 e IKK β , enquanto a via TRAM-TRIF induz a ativação de fatores reguladores de interferons tais como o IRF3 (Kagan *et al.*, 2008). Os resultados de expressão de IFN- β e de ativação de STAT-1 sugerem que a via de sinalização dependente de TRAM-TRIF é uma via mais ativa nos macrófagos de C57BL/6 do que em células de BALB/c. Kagan e colaboradores (2008) propuseram um novo modelo de sinalização pelo TLR4 onde após o reconhecimento do LPS, este receptor ativa as duas vias de sinalização em um modo sequencial a partir de compartimentos subcelulares distintos. A via TIRAP-MyD88 é induzida a partir da membrana plasmática enquanto a via TRAM-TRIF é induzida a partir de endossomos. Para isso, após a sinalização inicial

desencadeada pela montagem do complexo CD14, MD-2 e TLR4 na membrana plasmática, o TLR4 é endocitado em um processo dependente de dinamina. No endossomo, o TLR4 é capaz de induzir uma segunda fase de sinalização que culmina na produção de IFN- β . É possível que após a ativação do TLR4 pelo LPS este processo de endocitose ocorra com maior intensidade nos macrófagos de C57BL/6 favorecendo a produção do IFN- β nestas células, o que está sendo atualmente investigado.

Além de interferons do tipo I, macrófagos murinos quando ativados secretam outras citocinas que podem induzir ou inibir a produção de NO. Como falado anteriormente, neste trabalho foi investigado também a expressão e secreção de TNF- α e IL-10. A IL-10 é usualmente conhecida como uma citocina anti-inflamatória que inibe a produção de NO (Cunha *et al.*, 1992; Romani *et al.*, 1994). Entretanto alguns relatos demonstraram que IL-10 pode também aumentar a produção de NO em macrófagos murinos estimulados com LPS ou IFN- γ (Corradin *et al.*, 1993; Zidek & Francová, 1999). A ativação dos macrófagos e consequente produção de citocinas inflamatórias deve ser um processo finamente controlado. Neste contexto, a liberação de IL-10 e subsequente ativação de STAT-3 é um dos mais importantes mecanismo de *feedback* anti-inflamatório (Bode *et al.*, 2012). Em macrófagos estimulados com LPS, a produção de IFN- β é essencial para sustentar a transcrição de IL-10 e isto requer a ativação do STAT-1 seguida da indução de IL-27 dependente de IFN- β em uma maneira autócrina/parácrina (Chang *et al.*, 2007; Iyer *et al.*, 2010; Pattison *et al.*, 2012). Assim, a maior produção de IL-10 pelos macrófagos de C57BL/6 está de acordo com a sua maior produção de IFN- β . Por outro lado, é também possível que IL-10 esteja exercendo um papel na ativação dos macrófagos como já relatado em células monocíticas humanas através da indução da fosforilação de STAT-1 (Finbloom & Winestock, 1995; Rahimi *et al.*, 2005). Caso isto esteja acontecendo, é possível que STAT-1 ativada por IL-10 contribua para a ativação dos macrófagos: diretamente, induzindo a transcrição de IFN- β (Schindler *et al.*, 2007; Sin *et al.*, 2012) ou indiretamente mediando o aumento da expressão de CD14 (Rahimi *et al.*, 2005), que na forma ligado à membrana é essencial para a produção de IFN- β induzida por LPS (Saito *et al.*, 2000). Ou seja, a IL-10 levaria a um aumento do IFN- β induzido por STAT-1 e mediado por TLR4, num circuito de amplificação IFN- β /IL-10/STAT-1.

O TNF- α é uma citocina secretada pelos macrófagos em resposta ao LPS, que pode agir de maneira autócrina mediando os efeitos induzidos pelo LPS via o NF- κ B.

Esta citocina parece ser importante para a indução da iNOS em macrófagos tratados com IFN- γ , mas não em macrófagos tratados com LPS (Chen *et al.*, 1996) ou IFN- β (Zhang *et al.*, 1994). Em muitos casos, o sinergismo entre IFN- γ e TNF- α é resultado da presença combinada de sítios de ligação ao STAT-1, que é induzido pelo IFN- γ e NF- κ B, induzido pelo TNF- α , nos elementos promotores dos genes responsivos (Schroder *et al.*, 2004). Isto está de acordo com os resultados obtidos a despeito da maior produção de TNF- α , uma ativação mais persistente do NF- κ B, menor ativação de STAT-1 e menor acúmulo de iNOS nos macrófagos de camundongos BALB/c em relação às células de C57BL/6 (Figs 7, 9, 11, 12 e 17).

Como parte do mecanismo de *feedback* anti-inflamatório, a IL-10 inibe a produção de TNF- α pelos macrófagos (Riley *et al.*, 1999). Assim, é possível que o fato dos macrófagos de C57BL/6 produzirem menos TNF- α que os macrófagos de BALB/c seja devido a sua maior produção de IL-10. Entretanto, tanto o papel da IL-10 quanto do TNF- α na produção diferencial de NO pelos macrófagos de C57BL/6 e BALB/c serão mais bem compreendidos após a realização de experimentos de neutralização destas citocinas. É possível que, em macrófagos de camundongos BALB/c, a sinalização induzida por LPS é dirigida para a ativação autócrina por TNF- α , enquanto em células de camundongos C57BL/6, o LPS sinaliza em direção à ativação autócrina por IFN- β .

O envolvimento de NO (Bogdan *et al.*, 2000), IFN- β (Mattner *et al.*, 2004) e TLR4 (Kropf *et al.*, 2004a e b) na imunidade precoce de camundongos à *L. major* já foi demonstrado. Sabe-se que o complexo proteolipídico de superfície P8 de *L. pifanoi* (Whitaker *et al.*, 2008) é capaz de ativar TLR4 e, recentemente, Assis e colaboradores (2012) mostraram que fosfolipídeos de glicoinositol de *L. braziliensis* e *L. infantum* também são estimuladores de TLR4 em macrófagos. Além disto, em uma infecção por *L. major*, macrófagos positivos para IFN- α e IFN- β são detectados na pele de camundongos C57BL/6 no primeiro dia após a infecção e *in vitro*, estas células também liberam IFN- α/β após a infecção. Porém, nem *L. major* nem IFN- α/β sozinhos induzem a expressão da iNOS (Diefenbach *et al.*, 1998). Contudo, nenhum estudo comparativo foi feito para se determinar porque a produção de NO mediada por TLR4 é maior em macrófagos de C57BL/6 do que em células de BALB/c, dois modelos experimentais clássicos para infecção por *Leishmania*, sem a interferência de linfócitos Th.

Aqui, foi demonstrado pela primeira vez que macrófagos de camundongos BALB/c, que morrem se infectados por *L. major*, são intrinsecamente baixos produtores de NO porque são defeituosos na expressão de IFN- β induzida por TLR4 e, portanto na ativação de STAT-1, comparados com macrófagos de camundongos C57BL/6, que são resistentes à mesma infecção. A diferença na via TLR4-IFN- β -STAT-1-iNOS entre C57BL/6 e BALB/c na ausência de respostas adaptativas é um achado novo que corrobora suposições prévias de que os mecanismos precoces envolvendo TLR4, IFN- β e NO são fundamentais na resistência do hospedeiro (Bogdan *et al.*, 2000; Kropf *et al.*, 2004a e b; Nagai *et al.*, 2003).

Um importante aspecto dos resultados obtidos neste trabalho é a correlação entre os fenótipos murinos de resistência/susceptibilidade com a capacidade intrínseca de seus macrófagos em produzir NO, independentemente da resposta Th1 ou Th2 formada. *In vivo*, com pequenas concentrações de indutores (PAMPs/citocina) camundongos C57BL/6, mas não BALB/c podem matar um patógeno com a produção de NO, antes da influência do linfócito T. Em modelos experimentais de células humanas, o IFN- β secretado por macrófagos, *in vitro*, é capaz de promover a polarização Th1 (Nagai *et al.*, 2003) o que não acontece em modelos murinos, provavelmente devido à perda da ativação de STAT-4 por IFN-I em células T (Sinigaglia *et al.*, 1999). Entretanto, as demais diferenças observadas aqui podem também contribuir para que os macrófagos de C57BL/6 ou BALB/c distintamente afetem a subsequente produção de citocinas Th1 ou Th2, respectivamente, como já mostrado por Mills e colaboradores (2000). Esta correlação implica que os macrófagos de C57BL/6 e BALB/c devem contribuir, precocemente, de maneira efetiva para a manifestação da infecção, tanto por diminuir ou aumentar a carga parasitária enquanto a resposta imune adaptativa está sendo formada como por direcionar esta resposta na direção Th1 ou Th2, consolidando o fenótipo de resistência ou de susceptibilidade do hospedeiro.

*Mecanismos moleculares determinantes da sensibilidade diferencial de macrófagos
de camundongos C57BL/6 e BALB/c a LPS para produção de NO*

6. Conclusão

Os resultados obtidos neste trabalho demonstram que vários fatores/mecanismos envolvidos na sinalização por LPS e na consequente indução da iNOS são diferencialmente regulados nos macrófagos peritoneais de C57BL/6 e BALB/c. Alguns destes fatores aparentemente não se correlacionam com a produção diferencial de NO por estas células como a expressão/atividade de arginase, a expressão do TLR4, a ativação do NF- κ B e a produção de TNF- α e IL-10. Outros, entretanto estão diretamente relacionados com a maior produção de NO pelos macrófagos de C57BL/6 como a ativação do STAT-1 e do IFN- β . Como a neutralização do IFN- β resultou numa produção de NO pelos macrófagos de C57BL/6 em níveis semelhantes aos produzidos pelos macrófagos de BALB/c pode-se concluir que a esta citocina é o principal fator envolvido no fenótipo de produção diferencial de NO por estas células.

Mecanismos moleculares determinantes da sensibilidade diferencial de macrófagos de camundongos C57BL/6 e BALB/c a LPS para produção de NO

7. Referências Bibliográficas

- Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Imunologia Celular E Molecular*. 6. Ed. Saunders, 564 p. 2008.
- Adams LB, Hibbs JB Jr, Taintor RR, Krahenbuhl JL. Microbiostatic effect of murine-activated macrophages for *Toxoplasma gondii*. Role for synthesis of inorganic nitrogen oxides from L-arginine. *Journal of Immunology*, 144(7): 2725-2729. 1990.
- Afonso LC, Scott P. Immune responses associated with susceptibility of C57BL/10 mice to *Leishmania amazonensis*. *Infection and Immunity*, 61(7): 2952-2959. 1993.
- 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. *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.
- Alexander J, Brombacher F. T helper1/T helper2 cells and resistance/susceptibility to *Leishmania* infection: is this paradigm still relevant? *Frontiers in Immunology*, 3: (80). 2012.
- Assis RR, Ibraim IC, Noronha FS, Turco SJ, Soares RP. Glycoinositolphospholipids from *Leishmania braziliensis* and *L. infantum*: modulation of innate immune system and variations in carbohydrate structure. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6(2): e1543. 2012.
- Assreuy J, Cunha FQ, Epperlein M, Noronha-Dutra A, O'Donnell CA, Liew FY, Moncada S. Production of nitric oxide and superoxide by activated macrophages and killing of *Leishmania major*. *European Journal of Immunology*, 24(3): 672-676. 1994.
- Beutler B. Tlr4: central component of the sole mammalian LPS sensor. *Current Opinion in Immunology*, 12(1): 20-26. 2000.

- Biswas SK, Mantovani A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nature Immunology*, 11(10): 889-896. 2010.
- Bogdan C, Röllinghoff M, Diefenbach A. The role of nitric oxide in innate immunity. *Immunological Reviews*, 173: 17-26. 2000.
- Bogdan C. Nitric oxide and the immune response. *Nature Immunology*, 2(10):907-916. 2001.
- Bowie A, O'Neill LA. The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal generators for pro-inflammatory interleukins and microbial products. *Journal of Leukocyte Biology*, 67(4): 508-514. 2000.
- Bredt DS. Endogenous nitric oxide synthesis: biological functions and pathophysiology. *Free Radical Research*, 31(6): 577-596. 1999.
- 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.
- Cardoso CR, Teixeira G, Provinciatio PR, Godoi DF, Ferreira BR, Milanezi CM, Ferraz DB, Rossi MA, Cunha FQ, Silva JS. Modulation of mucosal immunity in a murine model of food-induced intestinal inflammation. *Clinical Experimental Allergy*, 38(2): 338-349. 2008.
- 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.
- Chang EY, Guo B, Doyle SE, Cheng G. Cutting edge: involvement of the type I IFN production and signaling pathway in lipopolysaccharide-induced IL-10 production. *Journal of Immunology*, 178(11): 6705-6709. 2007.

- Chen, B, Stout, R, Campbell, WF. Nitric oxide production: a mechanism of *Chlamydia trachomatis* inhibition in interferon-gamma-treated RAW264.7 cells. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 14(2-3): 109-120. 1996.
- 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.
- Corradin SB, Fasel N, Buchmuller-Rouiller Y, Ransijn A, Smith J, Muel J. Induction of macrophage nitric oxide production by interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha is enhanced by interleukin-10. *European Journal of Immunology*, 23(8): 2045-2048. 1993.
- Corraliza IM, Campo ML, Soler G, Modolell M. Determination of arginase activity in macrophages: a micromethod. *Journal of Immunological Methods*, 174(1-2): 231-235. 1994.
- Crane BR. The enzymology of nitric oxide in bacterial pathogenesis and resistance. *Biochemical Society Transactions*, 36:1149-1154. 2008.
- Cunha FQ, Moncada S, Liew FY. Interleukin-10 (IL-10) inhibits the induction of nitric oxide synthase by interferon-gamma in murine macrophages. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 182(3): 1155-1159. 1992.
- Dabbagh, K, Lewis DB. Toll-like receptors and T-helper-1/T-helper-2 responses. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 16(3): 199-204. 2003.
- Daff S. NO synthase: structures and mechanisms. *Nitric Oxide*, 23(1): 1-11. 2010.
- Deng, W, Ohmori, Y, Hamilton, TA. LPS does not directly induce STAT activity in mouse macrophages. *Cellular Immunology*, 170(1): 20-24. 1996.

- Diefenbach A, Schindler H, Donhauser N, Lorenz E, Laskay T, MacMicking J, Bogdan C. Type 1 Interferon (IFN α/β) and Type 2 Nitric oxide synthase regulate the innate immune response to a protozoan parasite. *Immunity*, 8(1): 77-87. 1998.
- Egan CE, Sukhumavasi W, Butcher BA, Denkers EY. Functional aspects of Toll-like receptor/MyD88 signalling 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.
- Finbloom, DS, Winestock, KD. IL-10 induces the tyrosine phosphorylation of tyk2 and Jak1 and the differential assembly of STAT1 alpha and STAT3 complexes in human T cells and monocytes. *Journal of Immunology*, 155(3): 1079-1090. 1995.
- 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.
- 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 α in mouse macrophages: pivotal role of Stat1 α 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.
- Gessani S, Di Marzio P, Rizza P, Belardelli F, Baglioni C. Posttranscriptional regulation of Interferon mRNA levels in peritoneal macrophages. *Journal of Virology*, 65(2): 989-991. 1991.
- 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.

- Heinzel FP, Sadick MD, Holaday BJ, Coffman RL, Locksley RM. Reciprocal expression of interferon gamma or interleukin 4 during the resolution or progression of murine leishmaniasis. Evidence for expansion of distinct helper T cell subsets. *Journal of Experimental Medicine*, 169(1): 59-72. 1989.
- Hettinger J, Richards DM, Hansson J, Barra MM, Joschko AC, Krijgsveld J, Feuerer M. Origin of monocytes and macrophages in a committed progenitor. *Nature Immunology*, 14(8): 821-830. 2013.
- Hibbs JB Jr, Taintor RR, Vavrin Z, Rachlin EM. Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 157(1): 87-94. 1988.
- Hibbs JB Jr, Taintor RR, Vavrin Z. Macrophage cytotoxicity: role for L-arginine deiminase and imino nitrogen oxidation to nitrite. *Science*, 235(4787): 473-476. 1987.
- Hibbs JB Jr, Westenfelder C, Taintor R, Vavrin Z, Kablitz C, Baranowski RL, Ward JH, Menlove RL, McMurry MP, Kushner JP, Samlowski WE. Evidence for cytokine-inducible nitric oxide synthesis from L-arginine in patients receiving interleukin-2 therapy. *Journal of Clinical Investigation*, 89(3): 867-877. 1992.
- 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.
- Infante-Duarte C, Kamradt T. Th1/Th2 balance in infection. *Springer Seminars in Immunopathology*, 21(3): 317-338. 1999.
- Iyer SS, Ghaffari AA, Cheng G. Lipopolysaccharide-mediated IL-10 transcriptional regulation requires sequential induction of type I IFNs and IL-27 in macrophages. *Journal of Immunology*, 185(11): 6599-6607. 2010.
- Jacobs AT, Ignarro LJ. Lipopolysaccharide-induced expression of interferon- β mediates the timing of inducible nitric-oxide synthase induction in RAW 264.7 macrophages. *Journal of Biological Chemistry*, 276(51): 47950-47957. 2001.

- Jankovic D, Liu Z, Gause WC. Th1- and Th2-cell commitment during infectious disease: asymmetry in divergent pathways. *Trends in Immunology*, 22(8): 450-457. 2001.
- 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.
- Jones DE, Elloso MM, Scott P. Host susceptibility factors to cutaneous leishmaniasis. *Frontiers in Bioscience*, 3:D1171-1180. 1998.
- Kagan JC, Su1 T, Horng T, Chow A, Akira S, Medzhitov R. TRAM couples endocytosis of Toll-like receptor 4 to the induction of interferon-beta. *Nature Immunology*, 9(4):361-368. 2008.
- Kamezaki K, Shimoda K, Numata A, Matsuda T, Nakayama K-I, Harada M. The role of Tyk2, Stat1 and Stat4 in LPS-induced endotoxin signals. *International Immunology* 16(8): 1173-1179. 2004.
- Kaushik RS, Uzonna JE, Gordon JR, Tabel H. Innate resistance to *Trypanosoma congolense* infections: differential production of nitric oxide by macrophages from susceptible BALB/c and resistant C57Bl/6 mice. *Experimental Parasitology*, 92(2):131-43. 1999.
- Kawai T, Akira S. The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition. *International Immunology*, 21(4): 317-337. 2009.
- Khanolkar-Young S, Snowden D, Lockwood DN. Immunocytochemical localization of inducible nitric oxide synthase and transforming growth factor-beta (TGF-beta) in leprosy lesions. *Clinical and Experimental Immunology*, 113(3): 438-442. 1998.
- 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.
- 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.

- Kleinert H, Schwarz PM, Forstermann U. Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. *Biological Chemistry*, 384(10-11): 1343-1364. 2003
- Kropf P, Freudenberg MA, Modolell M, Prece HP, Herath S, Antoniazzi S, Galanos C, Smith DF, Müller I. Toll-like receptor 4 contributes to efficient control of infection with the protozoan parasite *Leishmania major*. *Infection and Immunity* 72(4): 1920-1928. 2004b.
- Kropf P, Freudenberg N, Kalis C, Modolell M, Herath S, Galanos C, Freudenberg M, Müller I. Infection of C57BL/10ScCr and C57BL/10ScNcr mice with *Leishmania major* reveals a role for toll-like receptor 4 in the control of parasite replication. *Journal of Leukocyte Biology* 76(1): 48-57. 2004a.
- Kumar H, Kawai T, Akira S. Pathogen recognition by the innate immune system. *International Reviews of Immunology*, 30: 16-34. 2011.
- Langrish CL, Chen Y, Blumenschein WM, Mattson J, Basham B, Sedgwick JD, McClanahan T, Kastelein RA, Cua DJ. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *Journal of Experimental Medicine*, 201(2): 233-240. 2005.
- Laskay T, Diefenbach A, Röllinghoff M, Solbach W. Early parasite containment is decisive for resistance to *Leishmania major* infection. *European Journal of Immunology*, 25(8): 2220-2227. 1995
- Lewis ND, Asim M, Barry DP, Singh K, de Sablet T, Boucher JL, Gobert AP, Chaturvedi R, Wilson KT. Arginase II restricts host defense to *Helicobacter pylori* by attenuating inducible nitric oxide synthase translation in macrophages. *Journal of Immunology*, 184(5): 2572-2582. 2010.
- Liang Y, Zhou Y, Shen P. NF- κ 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.

- Liew FY, Xu D, Chan WL. Immune effector mechanism in parasitic infections. *Immunology Letters*, 65(1-2): 101-104. 1999.
- Locksley RM, Scott P. Helper T-cell subsets in mouse leishmaniasis: induction, expansion and effector function. *Immunology Today*, 12(3): A58-A61. 1991.
- Lopez-Castejón G, Baroja-Mazo A, Pelegrín P. Novel macrophage polarization model: from gene expression to identification of new anti-inflammatory molecules. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 68(18): 3095-3107. 2011.
- Lorenz M, Hewing B, Hui J, Zepp A, Baumann G, Bindereif A, Stangl V, Stangl K. Alternative splicing in intron 13 of the human eNOS gene: a potential mechanism for regulating eNOS activity. *The FASEB Journal*, 21(7): 1556-1564. 2007.
- Lu Y-C, Yeh W-C, Ohashi PS. LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine* 42(2): 145-151. 2008.
- MacMicking J, Xie QW, Nathan C. Nitric oxide and macrophage function. *Annual Review of Immunology*, 15:323-350. 1997.
- 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.
- Martin E, Nathan C, Xie QW. Role of interferon regulatory factor 1 in induction of nitric oxide synthase. *The Journal of Experimental Medicine*, 180(3): 977-984. 1994.
- Martinez FO, Helming L, Gordon S. Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. *Annual Review of Immunology*, 27: 451-483. 2009.
- Martinez FO, Sica A, Mantovani A, Locati M. Macrophage activation and polarization. *Frontiers in Bioscience*, 13(2): 453-461. 2008.
- Matthews DJ, Emson CL, McKenzie GJ, Jolin HE, Blackwell JM, McKenzie AN. IL-13 is a susceptibility factor for *Leishmania major* infection. *Journal of Immunology*, 164(3): 1458-1462. 2000.

- Mattner J, Wandersee-Steinhäuser A, Pahl A, Rölinghoff M, Majeau GR, Hochman PS, Bogdan C. Protection against progressive leishmaniasis by IFN- β . *Journal of Immunology*, 172(12): 7574-7582. 2004.
- McMahon-Pratt D, Alexander J. Does the *Leishmania major* paradigm of pathogenesis and protection hold for New World cutaneous leishmaniases or the visceral disease? *Immunological Reviews*, 201: 206-224. 2004
- Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*, 388(6640): 394-397. 1997.
- Mehta DR, Ashkar AA, Mossman KL. The nitric oxide pathway provides innate antiviral protection in conjunction with the type I interferon pathway in fibroblasts. *PLoS ONE*, 7(2): 1-12. 2012.
- Meraz MA, White JM, Sheehan KCF, Bach EA, Rodig SJ, Dighe AS, Kaplan DH, Riley, JK, Greenlund, AC, Campbell, D, Carver-Moore, K, DuBois, RN, Clark, R, Aguet, M, Schreiber, RD. Targeted disruption of the *Stat1* gene in mice reveals unexpected physiologic specificity in the JAK-STAT signaling pathway. *Cell*, 84(3): 431-442. 1996.
- Miller SI, Ernst RK, Bader MW. LPS, TLR4 and infectious disease diversity. *Nature Reviews Microbiology*, 3(1): 36-46. 2005.
- Mills CD, Kincaid K, Alt JM, Heilman MJ, Hill AM. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *Journal of Immunology*, 164(12): 6166-6173. 2000.
- Mizel SB, Honko AN, Moors MA, Smith PS, West AP. Induction of macrophage nitric oxide production by Gram-negative flagellin involves signaling via heteromeric Toll-like receptor 5/Toll-like receptor 4 complexes. *Journal of Immunology*, 170(12): 6217-6223. 2003.
- Mori M. Regulation of nitric oxide synthesis and apoptosis by arginase and arginine recycling. *Journal of Nutrition*, 137(6 Suppl 2): 1616S-1620S. 2007.

- Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *Journal of Immunology*, 136(7): 2348-2357. 1986.
- Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature Review Immunology*, 8(12): 958-969. 2008.
- Motoyama K, Hashimoto Y, Hirayama F, Uekama K, Arima H. Inhibitory effects of 2, 6-di-O-methyl- α -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.
- Murray HW, Nathan CF. Macrophage microbicidal mechanisms in vivo: reactive nitrogen versus oxygen intermediates in the killing of intracellular visceral *Leishmania donovani*. *Journal of Experimental Medicine*, 189(4): 741-746. 1999.
- Nagai T, Devergne O, Mueller TF, Perkins DL, van Seventer JM, van Seventer GA. Timing of IFN- β exposure during human dendritic cell maturation and naïve Th cell stimulation has contrasting effects on Th1 subset generation: a role for IFN- β -mediated regulation of IL-12 family cytokines and IL-18 in naïve Th cell differentiation. *Journal of Immunology*, 171(10): 5233-5243. 2003.
- Nathan C. Inducible nitric oxide synthase: what difference does it make? *Journal of Clinical Investigation*, 100(10): 2417-2423. 1997.
- Ohmori Y, Hamilton TA. Requirement for STAT1 in LPS-induced gene expression in macrophages. *Journal of Leukocyte Biology*, 69(4): 598-604. 2001.
- Ohmori Y, Schreiber RD, Hamilton TA. Synergy between interferon- γ and tumor necrosis factor- α in transcriptional activation is mediated by cooperation between signal transducer and activator of transcription 1 and nuclear factor κ B. *Journal of Biological Chemistry*, 272(23): 14899-14907. 1997.

- 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.
- Oswald IP, Wynn TA, Sher A, James SL. NO as an effector molecule of parasite killing: modulation of its synthesis by cytokines. *Comparative Biochemistry and Physiology. Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, 108(1): 11-18. 1994.
- Overbergh L, Valckx D, Waer M, Mathieu C. Quantification of murine cytokine mRNAs using real time quantitative reverse transcriptase PCR. *Cytokine*, 11(4): 305-312. 1999.
- Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*, 327(6122):524–526. 1987.
- Pattison MJ, Mackenzie KF, Arthur JS. Inhibition of JAKs in macrophages increases lipopolysaccharide-induced cytokine production by blocking IL-10-mediated feedback. *Journal of Immunology*, 189(6): 2784-2792. 2012.
- 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.
- Perrela MA, Patterson C, Tan L, Yet S-F, Hsieh C-M. Suppression of interleukin-1 β -induced nitric-oxide synthase promoter/enhancer activity by transforming growth factor- β -1 in vascular smooth muscle cells: evidence for mechanisms other NF- κ B. *Journal of Biological Chemistry*, 271(23): 13776-13780. 1996.
- 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.
- Piazza M, Futrega K, Spratt DE, Dieckmann T, Guillemette JG. Structure and dynamics of calmodulin (CaM) bound to nitric oxide synthase peptides: effects of a phosphomimetic CaM mutation. *Biochemistry*, 51(17): 3651-3661. 2012.

- Pindado J, Balsinde J, Balboa MA. TLR3-dependent induction of nitric oxide synthase in RAW 264.7 macrophage-like cells via a cytosolic phospholipase A2/cyclooxygenase-2 pathway. *Journal of Immunology*, 179(7): 4821-4828. 2007.
- Popovic PJ, Zeh HJ 3rd, Ochoa JB. Arginine and immunity. *Journal of Nutrition*, 137(6 Suppl 2): 1681S-1686S. 2007.
- Qadoumi M, Becker I, Donhauser N, Röllinghoff M, Bogdan C. Expression of inducible nitric oxide synthase in skin lesions of patients with american cutaneous leishmaniasis. *Infection and Immunity*, 70(8): 4638-4642. 2002.
- Rahimi AA, Gee K, Mishra S, Lim W, Kumar A. STAT-1 mediates the stimulatory effect of IL-10 on CD14 expression in human monocytic cells. *Journal of Immunology*, 174(12): 7823-7832. 2005.
- Reiner SL, Locksley RM. Cytokines in the differentiation of Th1/Th2 CD4+ subsets in leishmaniasis. *Journal of Cellular Biochemistry*, 53(4): 323-328. 1993.
- Riley JK, Takeda K, Akira S, Schreiber RD. Interleukin-10 receptor signaling through the JAK-STAT pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 274(23): 16513-16521. 1999.
- Romani L, Puccetti P, Mencacci A, Cenci E, Spaccapelo R, Tonnetti L, Grohmann U, Bistoni F. Neutralization of IL-10 up-regulates nitric oxide production and protects susceptible mice from challenge with *Candida albicans*. *Journal of Immunology*, 152(7): 3514-3521. 1994.
- 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.
- Sacks D, Noben-Trauth N. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nature Reviews Immunology*, 2(11): 845-858. 2002.

- Saito S, Matsuura M, Tominaga K, Kirikae T, Nakano M. Important role of membrane-associated CD14 in the induction of IFN-beta and subsequent nitric oxide production by murine macrophages in response to bacterial lipopolysaccharide. *European Journal of Biochemistry*, 267(1): 37-45. 2000.
- Sakaguchi S, Fukuma K, Kuribayashi K, Masuda T. Organ-specific autoimmune diseases induced in mice by elimination of T cell subset. I. Evidence for the active participation of T cells in natural self-tolerance; deficit of a T cell subset as a possible cause of autoimmune disease. *Journal of Experimental Medicine*, 161(1): 72-87. 1985.
- Salimuddin, Nagasaki T, Gotoh T, Isobe H, Mori M. Regulation of the genes for arginase isoforms and related enzymes in mouse macrophages by lipopolysaccharide. *American Journal of Physiology*, 277(1 Pt 1):E110-117, 1999.
- 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, Andrade AA, Dias AA, Bonjardim CA, Reis LF, Teixeira SM, Horta MF. Differential sensitivity of C57BL/6 (M-1) and BALB/c (M-2) macrophages to the stimuli of IFN-gamma/LPS for the production of NO: correlation with iNOS mRNA and protein expression. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 26(9): 682-688. 2006.
- Santos, JL. Determinantes da sensibilidade diferencial a IFN- γ e LPS ou TNF- α para a produção de óxido nítrico de macrófagos de camundongos BALB/c e C57BL/6. 2002. Tese (Doutorado em Bioquímica e Imunologia) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 2002.
- Santos, JL. Participação do óxido nítrico na citotoxicidade de macrófagos de camundongos susceptíveis e resistentes à *Leishmania amazonensis*. 1997. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Imunologia) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 1997.
- Scharton-Kersten T, Scott P. The role of the innate immune response in Th1 cell development following *Leishmania major* infection. *Journal of Leukocyte Biology*, 57(4): 515-522. 1995.

- Schindler C, Levy DE, Decker T. JAK-STAT signaling: from interferons to cytokines. *Journal of Biological Chemistry*, 282(28): 20059-20063. 2007.
- Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *Journal of Leukocyte Biology*, 75(2): 163-189. 2004.
- Scott P, Natovitz P, Coffman RL, Pearce E, Sher A. Immunoregulation of cutaneous leishmaniasis. T cell lines that transfer protective immunity or exacerbation belong to different T helper subsets and respond to distinct parasite antigens. *Journal of Experimental Medicine*, 168(5): 1675-1684. 1988.
- Sin WX, Li P, Yeong JP, Chin KC. Activation and regulation of interferon- β in immune responses. *Immunologic Research*, 53(1-3): 25-40. 2012.
- Sinigaglia F, D'Ambrosio D, Rogge L. Type I interferons and the Th1/Th2 paradigm. *Developmental and Comparative Immunology*, 23(7-8): 657-63. 1999.
- Stuehr DJ, Marletta MA. Mammalian nitrate biosynthesis: mouse macrophages produce nitrite and nitrate in response to *Escherichia coli* lipopolysaccharide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 82(22): 7738-7742. 1985.
- Sun SC, Ley SC. New insights into NF- κ B regulation and function. *Trends in Immunology*, 29(10): 469-478. 2008.
- Tacchini-Cottier F, Weinkopff T, Launois P. Does T helper differentiation correlate with resistance or susceptibility to infection with *L. major*? Some answers from the murine model. *Frontiers in Immunology*, 3(32): 1-9. 2012.
- Taylor-Robinson AW, Smith EC. A dichotomous role for nitric oxide in protection against blood stage malaria infection. *Immunology Letters*, 67: 1-9. 1999.
- Teixeira MM, Almeida IC, Gazzinelli RT. Introduction: innate recognition of bacteria and protozoan parasites. *Microbes and Infection*, 4(9): 883-886. 2002.
- Tennyson AG, Lippard SJ. Generation, translocation, and action of nitric oxide in living systems. *Chemistry & Biology*, 18(10): 1211-1220. 2011.

- Thomas, KE, Galligan, CL, Newman, RD, Fish, EN, Vogel, SN. Contribution of interferon-beta to the murine macrophage response to the toll-like receptor 4 agonist, lipopolysaccharide. *Journal of Biological Chemistry*, 281(41): 31119-31130. 2006.
- Villaseñor-Cardoso MI, Ortega E. Polymorphisms of innate immunity receptors in infection by parasites. *Parasite Immunology*, 33(12): 643-653. 2011.
- Wang WW, Jenkinson CP, Griscavage JM, Kern RM, Arabolos NS, Byrns RE, Cederbaum SD, Ignarro LJ. Co-induction of arginase and nitric oxide synthase in murine macrophages activated by lipopolysaccharide. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 210(3): 1009-1016. 1995.
- 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.
- Whitaker, SM, Colmenares, M, Pestana, KG, McMachon-Pratt D. *Leishmania pifanoi* proteoglycolipid complex P8 induces macrophage cytokine production through toll-like receptor 4. *Infection and Immunity*, 76(5): 2149-2156. 2008.
- Wynn TA, Oswald IP, Eltoun IA, Caspar P, Lowenstein CJ, Lewis FA, James SL, Sher A. Elevated expression of Th1 cytokines and nitric oxide synthase in the lungs of vaccinated mice after challenge infection with *Schistosoma mansoni*. *Journal of Immunology*, 153(11): 5200-5209. 1994.
- Xie QW, Kashiwabara Y, Nathan C. Role of transcription factor NF- κ 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 γ and bacterial lipopolysaccharide. *Journal of Experimental Medicine*, 177(6):1779-1784. 1993.
- Yim CY, McGregor JR, Kwon OD, Bastian NR, Rees M, Mori M, Hibbs JBJ, Samlowski WE. Nitric oxide synthesis contributes to IL-2-induced antitumor

responses against intraperitoneal Meth A tumor. *Journal of Immunology*, 155(9): 4382-4390. 1995.

Zamora R, Vodovotz Y, Billiar TR. Inducible nitric oxide synthase and inflammatory diseases. *Molecular Medicine*, 6(5):347-373. 2000.

Zanoni I, Granucci F. Differences in lipopolysaccharide-induced signaling between conventional dendritic cells and macrophages. *Immunobiology*, 215(9-10): 709-712. 2010.

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.

Zidek Z, Francová D. Interleukin-10 in combination with interferon gamma and tumor necrosis factor-alpha enhances in vitro production of nitric oxide by murine resident peritoneal macrophage. *European Cytokine Network*, 10(1): 25-32. 1999.