

Capítulo 3

Efeito do LPS na expressão da isoforma indutível da sintase do monóxido de azoto e na activação do factor de transcrição NF- κ B

3.1. RESUMO

Neste trabalho investigou-se o efeito do lipopolissacarídeo (LPS) na expressão da isoforma indutível da sintase do monóxido de azoto (iNOS) e na produção de monóxido de azoto (NO) por células dendríticas da epiderme de murganho (FSDC). As vias de sinalização intracelular, activadas pelo LPS, responsáveis pelo aumento da expressão da iNOS foram também investigadas. Os resultados obtidos demonstraram que o LPS aumentou a expressão da iNOS com o conseqüente aumento da produção de NO pelas FSDC. A expressão da iNOS induzida por LPS demonstrou ser dependente da cinase de *Janus 2* (JAK2) e foi inibida pelo antioxidante ditiocarbamato de pirrolidina (PDTC), um inibidor do factor de transcrição NF- κ B.

3.2. INTRODUÇÃO

As células dendríticas (DC) são células apresentadoras de antígenos com a capacidade única de iniciar respostas imunológicas naturais e respostas imunológicas adquiridas, de uma forma altamente específica. Estas células activam linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ de memória e virgens, pelo que têm sido recentemente utilizadas em imuno-terapia, nomeadamente na imunidade contra o cancro e infecções microbianas. Localizadas na maior parte dos tecidos, as DC funcionam como células de defesa contra agentes infecciosos e produtos bacterianos inflamatórios. Após contacto com as bactérias, as DC sofrem um processo de maturação que lhes permite activar, de um modo eficaz, os linfócitos T (Banchereau e Steinman, 1998; Flores-Romo, 2001).

Os lipopolissacarídeos (LPS) bacterianos, principais componentes da membrana externa das bactérias Gram-negativas, são potentes activadores do sistema imunológico natural, sendo o lípido A a estrutura do LPS responsável pela sua interacção com as células do sistema imunológico (Aderem e Ulevitch, 2000).

As respostas celulares ao LPS são mediadas pelo receptor de superfície CD14. Esta glicoproteína membranar está ligada a um grupo fosfatidilinositol glicosilado e é expressa na superfície dos monócitos e das células polimorfonucleares (Wright *et al.*, 1990; Yamamoto *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 1998). O CD14 também existe sob uma forma solúvel presente no soro e é responsável pelas respostas ao LPS de células que não possuem a forma membranar do CD14 (Frey *et al.*, 1992; Juan *et al.*, 1995), nomeadamente as células dendríticas (Verhasselt *et al.*, 1997). As duas formas do CD14 (membranar e solúvel) ligam ao LPS e esta interacção é potenciada pela proteína que liga o LPS (LBP) (Wright *et al.*, 1990; Yu e Wright, 1996). A proteína CD14 não tem um domínio intracelular, pelo que a transdução do sinal é efectuada por proteínas transmembranares, os receptores *Toll-Like* (TLR), envolvidos no reconhecimento de padrões moleculares associados a agentes patogénicos (PAMPs).

O domínio extracelular dos TLR, rico em repetições de leucina, é responsável pelo reconhecimento dos PAMPs, sendo o domínio citoplasmático essencial para a

sinalização intracelular. Deste modo, os TLR possuem um domínio intracelular homólogo ao do *Toll*/receptor de IL-1, denominado domínio TIR, capaz de ligar duas proteínas adaptadoras citoplasmáticas, que possuem também domínios TIR, o factor de diferenciação mielóide 88 (MyD88) e a proteína adaptadora contendo um domínio TIR (TIRAP/MAL) (Hornig *et al.*, 2002; Yamamoto *et al.*, 2002 a). Estas duas proteínas estão envolvidas na transdução do sinal dos TLR.

A proteína MyD88 interage com a cinase associada ao receptor da interleucina 1 (IRAK), uma cinase de resíduos serina/treonina. Esta interacção induz a auto-fosforilação da IRAK e a sua ligação a uma outra proteína adaptadora, o factor 6 associado ao receptor do factor de necrose tumoral (TRAF6). Este factor está envolvido na activação de duas cascatas de sinalização intracelular: 1) através da MKK6 (cinase 6 activadora de proteínas da família da MAPK), ocorre activação das MAPKs (p38 MAPK e JNK) que, por sua vez, activam o factor de transcrição AP-1; 2) através da cinase activada pelo factor de crescimento transformante- β (TGF- β), TAK1, ocorre activação da cinase do $\text{I}\kappa\text{B}$ (IKK) com consequente activação do factor de transcrição NF- κB . Estes factores de transcrição, NF- κB e AP-1, induzem a expressão de uma série de proteínas importantes para a imunidade natural, nomeadamente citocinas (TNF- α , IL-1, IL-6, IL-12), quimiocinas (MIP α , IL-8), moléculas de adesão (ICAM-1), moléculas co-estimuladoras, moléculas do complexo *major* de histocompatibilidade (MHC), bem como moléculas efectoras, designadamente péptidos anti-microbianos, espécies reactivas de oxigénio e a proteína iNOS (Reisser *et al.*, 2002; Jefferies e O'Neill, 2002).

O TLR4 é o receptor do LPS e o CD14 funciona como co-receptor do TLR4 (Poltorak *et al.*, 1998; Hoshino *et al.*, 1999). Este receptor possui um domínio extracelular, que se associa a uma proteína extracelular, denominada MD2, envolvida no reconhecimento do TLR4 pelo LPS (Shimazu *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 2000).

Nas células dendríticas os eventos de sinalização activados pelo LPS, após ligação ao TLR4, parecem envolver duas cascatas de sinalização intracelular (figura 1). A via dependente da proteína MyD88 é utilizada por todos os TLR e é essencial para a

produção de citocinas e quimiocinas (IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-12) (Kaisho e Akira, 2001; Jefferies e O'Neill, 2002). A outra cascata de sinalização intracelular, independente da proteína MyD88, envolve a activação do NF- κ B e das MAPKs, embora com uma cinética mais lenta, e parece estar relacionada com a maturação das células dendríticas e com a expressão de genes induzidos pelo IFN, nomeadamente a proteína induzida pelo IFN- γ (IP-10) (Kaisho *et al.*, 2001; Kawai *et al.*, 2001). Estudos recentes têm demonstrado o envolvimento de uma outra proteína adaptadora contendo um domínio TIR e indutora do IFN- β , denominada de TRIF, na sinalização do TLR3 e possivelmente do TLR4 (Yamamoto *et al.*, 2002 b; Imler e Hoffmann, 2003). Esta proteína poderá actuar através da via de sinalização independente da proteína MyD88, e participar na maturação das células dendríticas. Recentemente têm sido identificadas várias moléculas adaptadoras que poderão estar envolvidas na activação de diferentes vias de sinalização intracelular dos TLR e, conseqüentemente, em diferentes efeitos biológicos (Akira *et al.*, 2003; Kaisho e Akira, 2003).

Vários estudos demonstram o envolvimento do TLR4 e TLR2 na maturação das células dendríticas. A sinalização intracelular activada por estes receptores parece induzir a expressão de moléculas co-estimuladoras (CD80 e CD86) e a produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-6, IL-12) (Hertz *et al.*, 2001; Michelsen *et al.*, 2001; Visintin *et al.*, 2001), por um processo dependente da activação da p38 MAPK e PI3K (Re e Strominger, 2001).

A descoberta das inúmeras implicações das DC como mediadores entre a imunidade natural e adquirida tem levado à realização de vários estudos, que visam o conhecimento aprofundado dos mecanismos de sinalização intracelular activados durante a maturação das células dendríticas. Entre outros, o LPS é um dos compostos que induz a maturação das células dendríticas *in vivo* e *in vitro* (De Smedt *et al.*, 1997; Verhasselt *et al.*, 1997; Granucci *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 2002 b; Ismaili *et al.*, 2002) por mecanismos de sinalização intracelular que envolvem a activação da p38 MAPK e do NF- κ B (Hacker *et al.*, 1998; Oyama *et al.*, 1998; Rescigno *et al.* 1998; Ammon *et al.*, 2000; Ardeshtna *et*

al., 2000; Neumann *et al.*, 2000; Puig-Kröger *et al.*, 2000; Arrighi *et al.*, 2001; Re e Strominger, 2001; Uchi *et al.*, 2002).

Figura 1. Vias de sinalização intracelular activadas pelo LPS após interacção com o TLR4 nas células dendríticas. Nas células dendríticas o LPS activa duas cascatas de sinalização intracelular: uma dependente da proteína adaptadora MyD88, envolvida na activação dos factores de transcrição AP-1 e NF- κ B e que induz a produção de citocinas pró-inflamatórias, e outra independente da proteína MyD88, que envolve a activação do NF- κ B (embora com uma cinética mais lenta) e é responsável pela maturação das células dendríticas.

O monóxido de azoto produzido pelas células dendríticas modula a apresentação de antígenos aos linfócitos T (Lu *et al.*, 1996; Aiello *et al.*, 2000; Paolucci *et al.*, 2000; Hoffman *et al.*, 2002) e a expressão da proteína iNOS aumenta durante a maturação das DC (Chen *et al.*, 2002 b). Deste modo, o trabalho realizado neste capítulo teve como objectivo o estudo do efeito do LPS na expressão da proteína iNOS e na produção de NO pelas células FSDC. Além disso, foram investigadas as vias de sinalização intracelular, activadas pelo LPS, que estão envolvidas na expressão desta enzima.

3.3. RESULTADOS

3.3.1. Transcrição do ARNm da iNOS, expressão da proteína iNOS e produção de NO estimuladas por LPS

Com o objectivo de avaliar o efeito do LPS na produção de NO por FSDC, as células foram cultivadas com concentrações crescentes de LPS (0,5-10 $\mu\text{g/ml}$), durante 48 horas. Os resultados apresentados na figura 3.1 demonstraram que a produção de nitritos, avaliada pela técnica de *Griess*, aumentou com a concentração de LPS utilizada para estimular as células, reflectindo assim um aumento na produção de NO. Após estimulação das células com 5 e 10 $\mu\text{g/ml}$ de LPS, a produção de NO aumentou, relativamente ao controlo, $6,5 \pm 1,4$ ($p < 0,01$) e $9,4 \pm 2,7$ ($p < 0,001$) vezes, respectivamente. Para confirmar que a produção de NO se devia à actividade da isoforma indutível da sintase do monóxido de azoto, as células foram estimuladas com LPS (5 $\mu\text{g/ml}$), durante 48 horas, na presença de 1 mM de aminoguanidina (AG), um inibidor da iNOS. A AG é um derivado nucleofílico da hidrazina, estruturalmente análogo à L-arginina, com maior selectividade para a isoforma indutível da sintase do NO (Misko *et al.*, 1993, Corbett e McDaniel, 1996; Bryk e Wolff, 1998; Alderton *et al.*, 2001). Os resultados apresentados na figura 3.2 demonstraram que a produção de nitritos estimulada por LPS foi completamente inibida pela aminoguanidina, confirmando-se, deste modo, que a produção de NO é específica da enzima iNOS.

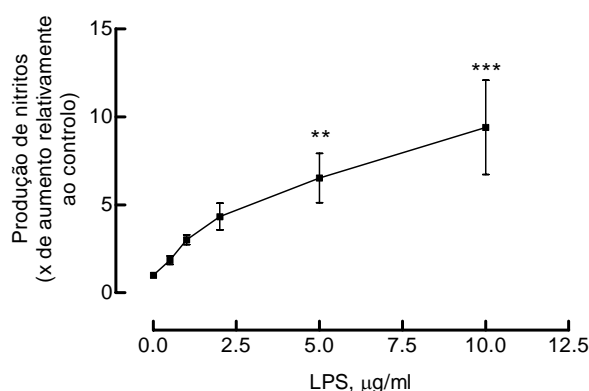


Figura 3.1- Efeito do LPS na produção de nitritos.

As células FSDC foram incubadas com concentrações crescentes de LPS (0.5-10 µg/ml), durante 48 horas. A concentração de nitritos nos sobrenadantes das culturas celulares foi determinada pelo método de *Griess*, usando uma curva padrão de nitrito de sódio. Os resultados foram expressos em número de vezes de aumento da produção de nitritos relativamente ao controlo (células cultivadas na ausência de LPS). A produção de nitritos nas células controlo foi de $1,0 \pm 0,07$ µM. Os resultados apresentados correspondem a médias \pm SEM de seis experiências independentes, realizadas em duplicado. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ quando comparados com o controlo.

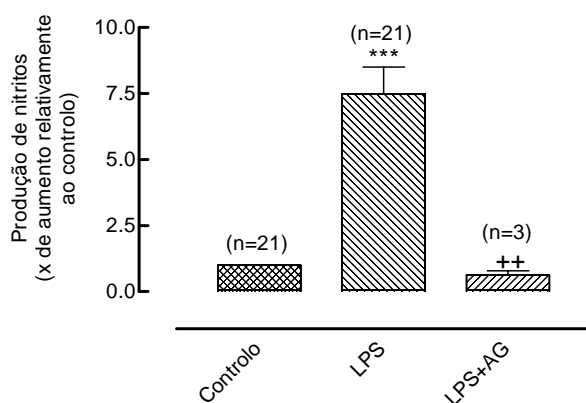


Figura 3.2- Efeito da aminoguanidina na produção de nitritos por células FSDC estimuladas com LPS.

As células FSDC foram incubadas na ausência (controlo) ou na presença de 5 µg/ml de LPS, durante 48 horas. Onde indicado as células foram também incubadas com 1 mM de aminoguanidina (AG) durante o período de estimulação com o LPS. A concentração de nitritos nos sobrenadantes das culturas celulares foi determinada pelo método de *Griess*, usando uma curva padrão de nitrito de sódio. Os resultados foram expressos em número de vezes de aumento da produção de nitritos relativamente ao controlo. A produção de nitritos nas células controlo foi de $4,2 \pm 0,74$ µM. Os resultados apresentados correspondem a médias \pm SEM do número de experiências indicado na figura, realizadas em duplicado. *** $p < 0,001$ quando comparado com o controlo; ++ $p < 0,01$ quando comparado com as células estimuladas com LPS e na ausência da AG.

Com o objectivo de avaliar se o aumento da produção de NO por células estimuladas com LPS envolvia um aumento da transcrição do ARNm e um aumento da expressão da proteína iNOS, procedeu-se à análise do ARNm e da proteína, por *Northern blot* e imunocitoquímica, respectivamente (figura 3.3). Os resultados demonstraram que o LPS (5 µg/ml) induziu a transcrição do ARNm da iNOS (figura 3.3 A), e aumentou a expressão da proteína iNOS (figura 3.3 B). Estes resultados permitiram-nos concluir que o LPS induziu a transcrição do gene *iNOS* e a tradução da proteína iNOS com o conseqüente aumento da produção de monóxido de azoto pelas FSDC.

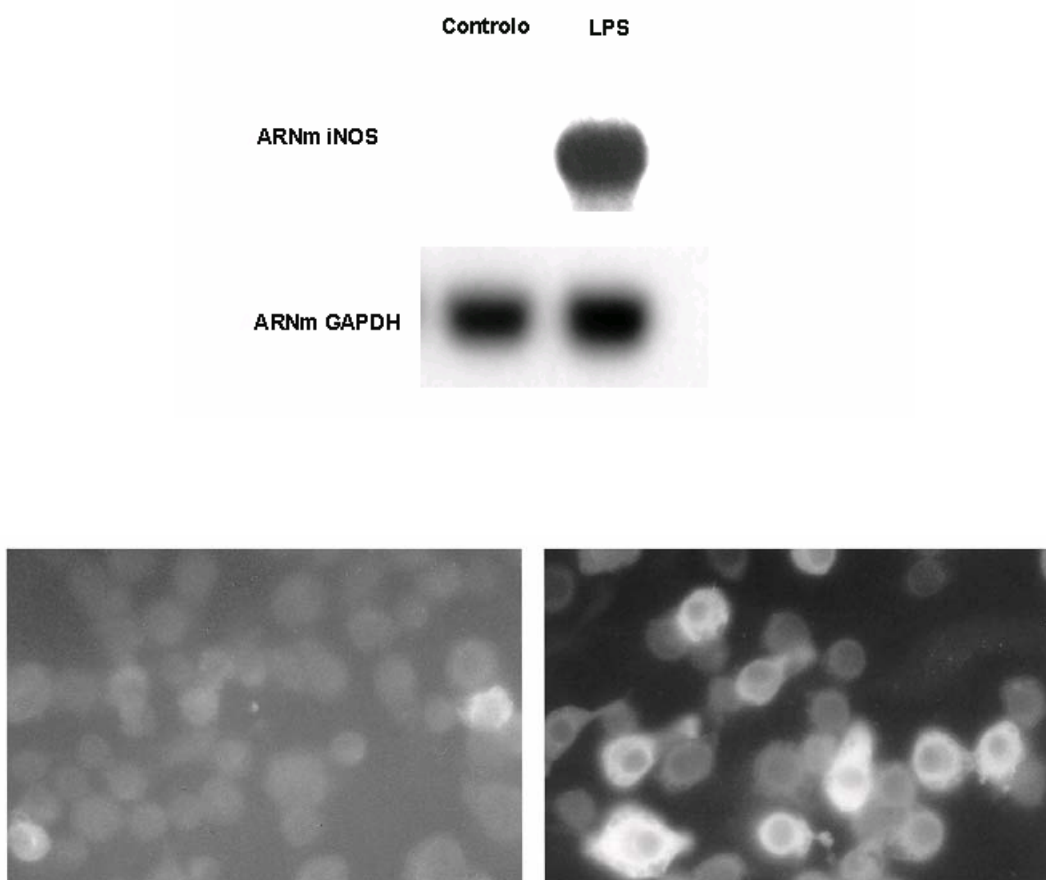


Figura 3.3- Efeito do LPS na transcrição do ARN mensageiro (ARNm) e na expressão da proteína iNOS.

(A) As células FSDC foram incubadas ou não com LPS (5 μ g/ml), durante 6 horas. O isolamento do ARN foi realizado com o reagente *Trizol* e o ARN (25 μ g) foi separado, por electroforese em gel de agarose-formaldeído, em condições desnaturantes. O ARN foi posteriormente transferido do gel para uma membrana de náilon, e o ARN mensageiro da iNOS foi localizado por hibridação com um fragmento de ADN complementar marcado com o radioisótopo 32 P, e visualizado por autoradiografia. Para demonstrar a presença de uma quantidade equivalente de ARN nas diferentes amostras da membrana, procedeu-se ao *stripping* da mesma e à hibridação com um fragmento de ADN complementar do ARNm da desidrogenase do gliceraldeído (GADPH). (B) As células FSDC foram incubadas ou não com LPS (5 μ g/ml), durante 48 horas. A expressão e distribuição da proteína iNOS foram avaliadas por imunocitoquímica. Após fixação e permeabilização, as células foram incubadas com um anticorpo policlonal, produzido em coelho, contra a proteína iNOS (10 μ g/ml). A distribuição do anticorpo foi visualizada com anticorpos de porco desenvolvidos contra imunoglobulinas de coelho e conjugados com o fluoróforo isotiocianato de fluoresceína (1:40). As preparações foram observadas por microscopia de fluorescência normal (ampliação de 250 x) e são representativas de três preparações com resultados similares.

3.3.2. Efeito de inibidores de cinases de proteínas na produção de NO estimulada por LPS

Para caracterizar as cascatas de sinalização intracelular activadas pelo LPS e envolvidas na produção de NO, as FSDC foram estimuladas, durante 48 horas, com LPS (5 µg/ml), ou simultaneamente com LPS e inibidores de diferentes cinases de proteínas (tabela 3.1), cuja activação pelo LPS tem sido descrita em diversos sistemas biológicos (Gao *et al.*, 1997; Bhat *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 1999 a; Nakashima *et al.*, 1999; Dell'Albani *et al.*, 2001; Jacobs e Ignarro, 2001; Kristof *et al.*, 2001; Ohmori e Hamilton, 2001; Samardzic *et al.*, 2001). A genisteína (30 µM), um inibidor de largo espectro de cinases de resíduos tirosina (Akiyama e Ogawara, 1991), inibiu a produção de nitritos em $75,4 \pm 5,5$ % ($p < 0,001$), contrariamente ao seu análogo inactivo, a genistina, que demonstrou não afectar a produção de NO estimulada por LPS. O composto PD 098059 (30 µM), inibidor selectivo da cinase da ERK (MEK) (Dudley *et al.*, 1995), não afectou a produção de NO. Estes resultados indicam que a via de sinalização intracelular da MEK não está envolvida na produção de NO estimulada por LPS nas FSDC. Pelo contrário, o inibidor da p38 MAPK, SB 203580 (Badger *et al.*, 1998), diminuiu a produção de nitritos para $78,6 \pm 4,4$ % do controlo ($p < 0,05$). No entanto, para a concentração de SB 203580 utilizada nestas experiências (20 µM), observou-se uma diminuição na redução do MTT para $86,3 \pm 2,9$ % do controlo ($p < 0,05$, resultados não apresentados). O composto tyrphostin B42, inibidor da cinase de resíduos de tirosina *Janus 2* (JAK2) (Meydan *et al.*, 1996), demonstrou ser um potente inibidor da produção de NO estimulada por LPS (tabela 3.1), uma vez que 20 µM de tyrphostin B42 diminuiu a produção de NO estimulada por LPS, para $41,9 \pm 7,9$ % do controlo ($p < 0,001$). Estes resultados indicam que a via de sinalização intracelular da JAK2 é crucial na regulação da produção de NO, nas células FSDC. O efeito inibitório do tyrphostin B42 demonstrou ser dependente da concentração utilizada (figura 3.4 A) e máximo para a concentração de 50 µM ($p < 0,001$).

Para avaliar se este efeito inibitório ocorria numa fase anterior ou posterior à síntese da proteína iNOS, as células foram incubadas com LPS (5 µg/ml) e com o inibidor

da JAK2, durante 24 horas, e os homogeneizados celulares foram em seguida sujeitos à análise de *Western blot*. Os resultados apresentados na figura 3.4 B e C demonstraram que o LPS aumentou a expressão da proteína iNOS em 80,5 % relativamente ao controlo. Pelo contrário, na presença de tyrphostin B42 o aumento da expressão da proteína estimulado por LPS foi inibido para 135,1 % do controlo (figura 3.4 C). Estes resultados mostraram que o efeito inibitório do tyrphostin B42 ocorreu numa fase de sinalização intracelular que antecede a indução da expressão da iNOS estimulada por LPS.

Tabela 3.1- Efeito de inibidores de cinases de proteínas na produção de nitritos estimulada por LPS.

<i>Inibidor</i>	<i>Produção de nitritos (% da produção máxima)</i>
Genisteína (30 μ M)	24,6 \pm 5,5*** (n=5)
Genistina (30 μ M)	91,2 \pm 1,1 (n=3)
PD 098059 (30 μ M)	103,4 \pm 13,5 (n=4)
SB 203580 (20 μ M)	78,6 \pm 4,4* (n=5)
Tyrphostin B42 (20 μ M)	41,9 \pm 7,9*** (n=4)

As células FSDC foram incubadas com os inibidores de cinases de proteínas nas concentrações indicadas na tabela, na presença de LPS (5 μ g/ml), durante 48 horas. A concentração de nitritos nos sobrenadantes das culturas celulares foi determinada pelo método de *Griess*, a partir de uma curva padrão de nitrito de sódio. Os resultados foram expressos em percentagem da produção de nitritos por células cultivadas na presença de LPS e na ausência dos inibidores (100 % = 4,6 \pm 0,8 μ M de nitritos) e correspondem a médias \pm SEM do número de experiências indicado na tabela, realizadas em duplicado. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ quando comparados com as células cultivadas com LPS e na ausência dos inibidores.

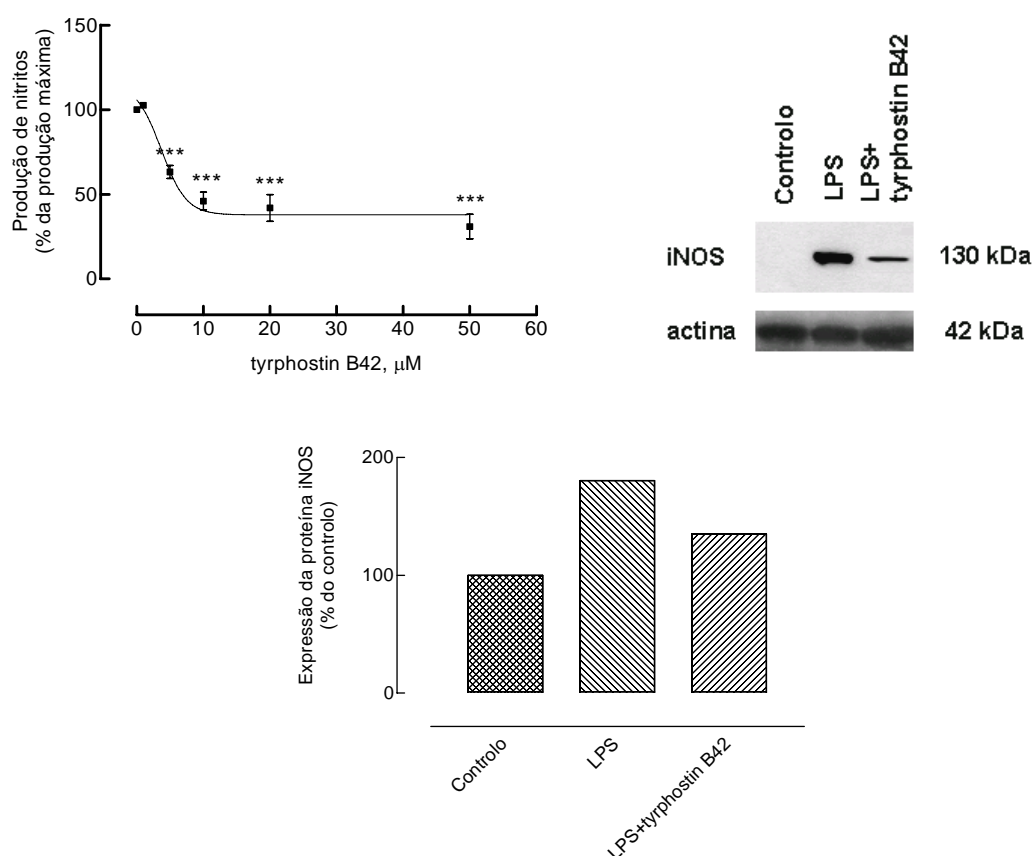


Figura 3.4- Efeito do typhostin B42 na produção de nitritos e na expressão da proteína iNOS estimuladas por LPS.

(A) As células FSDC foram incubadas com o typhostin B42 nas concentrações indicadas no gráfico, na presença de LPS (5 μ g/ml), durante 48 horas. A concentração de nitritos nos sobrenadantes das culturas celulares foi determinada pelo método de *Griess*, a partir de uma curva padrão de nitrito de sódio. Os resultados foram expressos em percentagem da produção de nitritos por células cultivadas na presença de LPS e na ausência do inibidor (100 % = 11,4 \pm 2,7 μ M de nitritos) e correspondem a médias \pm SEM de seis experiências, realizadas em duplicado. *** $p < 0,001$ quando comparado com as células cultivadas com LPS e na ausência do inibidor. (B) As células FSDC foram incubadas com meio de cultura (controlo), ou com de LPS (5 μ g/ml), ou com LPS (5 μ g/ml) na presença de typhostin B42 (50 μ M), durante 24 horas. Os extractos celulares totais foram desnaturados e sujeitos a uma electroforese SDS-PAGE num gel com 10 % de acrilamida, seguida de electrotransferência das proteínas para a membrana de PVDF. A expressão da proteína iNOS foi avaliada por *Western blot*, com um anticorpo contra a proteína iNOS (1:2000). Para demonstrar a presença de uma quantidade equivalente de proteína nas diferentes amostras, procedeu-se ao *stripping* da membrana e utilizou-se um anticorpo contra a proteína actina (1:10000). (C) Análise densitométrica do *Western blot*. A densidade das bandas correspondentes à proteína iNOS, nas células cultivadas com LPS e cultivadas com LPS na presença de typhostin B42, foi expressa em percentagem da densidade das bandas nas células controlo. Os resultados são médias de duas experiências.

3.3.3. Efeito do tyrphostin B42 na migração para o núcleo da subunidade p65 do NF- κ B, na sua ligação ao ADN e na degradação citoplasmática do I κ B- α estimuladas por LPS

O gene que codifica a expressão da proteína iNOS contém, na sua região promotora, locais de ligação para o factor de transcrição NF- κ B (Xie *et al.*, 1994; de Vera *et al.*, 1996; Weisz *et al.*, 1996; Taylor *et al.*, 1998; Ganster *et al.*, 2001). Em células não estimuladas, as proteínas constituintes do factor de transcrição NF- κ B (p50, p52, p65/RelA, RelB e c-Rel) formam dímeros e estão localizadas no citoplasma em associação com proteínas inibitórias, denominadas I κ B. A activação celular por diversos estímulos conduz à fosforilação e degradação da proteína inibitória I κ B, ocorrendo a migração para o núcleo do factor de transcrição NF- κ B com a consequente indução da expressão de genes dependentes deste factor de transcrição (Pahl, 1999), nomeadamente o gene *iNOS*.

Com o objectivo de avaliar a eventual activação do factor de transcrição NF- κ B pelo LPS, bem como o de investigar se o inibidor da JAK2, tyrphostin B42, interfere com a via de sinalização do NF- κ B, estudou-se o efeito do LPS e do tyrphostin B42 na activação da subunidade p65 do NF- κ B. As FSDC foram estimuladas com 5 μ g/ml de LPS durante 30 minutos, e os extractos citoplasmáticos foram sujeitos à análise de *Western blot* com um anticorpo contra a subunidade p65 (figura 3.5 A e B). Procedeu-se também à avaliação da distribuição intracelular da proteína p65 por imunocitoquímica (figura 3.5 C). Nalgumas experiências as células foram previamente incubadas com o tyrphostin B42 (50 μ M), durante 30 minutos, tendo sido depois estimuladas com LPS, durante outros 30 minutos, na presença do inibidor. Os resultados demonstraram que 30 minutos de estimulação celular com LPS induziram uma diminuição citoplasmática da proteína p65, de 100 para $53,5 \pm 4,8$ % ($p < 0,001$) (figuras 3.5 A e B). Este efeito foi parcialmente inibido quando as células estimuladas por LPS, durante 30 minutos, foram previamente incubadas com o tyrphostin B42, observando-se neste caso uma expressão citoplasmática da proteína p65 de $78,3 \pm 6,7$ % do controlo ($p < 0,05$) (figuras 3.5 A e B). O

estudo imunocitoquímico da distribuição da proteína p65 em células controlo e em células estimuladas pelo LPS (figura 3.5. C), demonstrou que na ausência de LPS esta subunidade do NF- κ B se localiza essencialmente no citoplasma, ocorrendo a migração da proteína p65 para o núcleo após estimulação celular com LPS, durante 30 minutos. Este efeito foi, mais uma vez, inibido quando as FSDC foram simultaneamente incubadas com tyrphostin B42 e LPS, durante 30 minutos (figura 3.5. C). Estes resultados demonstraram que o LPS activou a proteína p65, induzindo a sua migração para o núcleo das FSDC, sendo este efeito parcialmente mediado pela proteína cinase de resíduos tirosina JAK2.

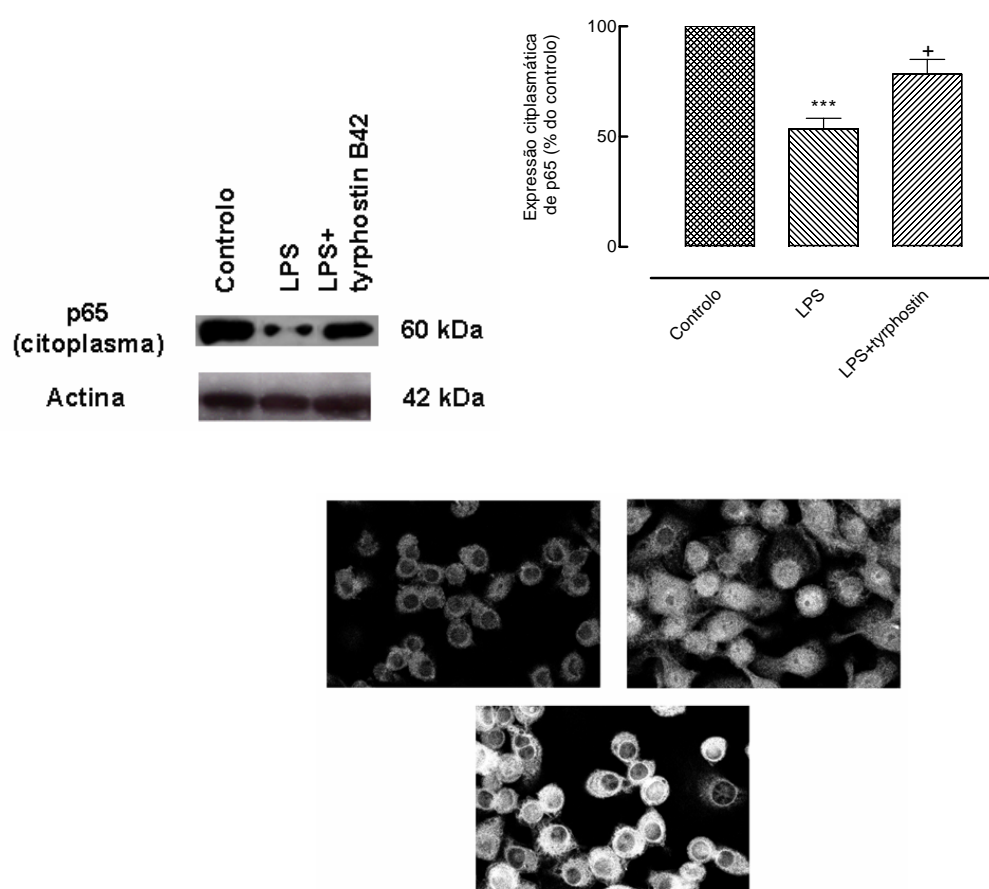


Figura 3.5- Efeito do tyrphostin B42 na migração para o núcleo da proteína p65 estimulada por LPS.

As células FSDC foram incubadas com meio de cultura (controlo), ou com LPS (5 $\mu\text{g/ml}$), durante 30 minutos. Quando o efeito do tyrphostin B42 foi estudado, as células foram pré-incubadas com o inibidor (50 μM), durante 30 minutos, antes da estimulação com LPS (5 $\mu\text{g/ml}$), durante outros 30 minutos, na presença do inibidor. (A) Os extractos citoplasmáticos foram desnaturados e sujeitos a uma electroforese SDS-PAGE num gel com 15 % de acrilamida, seguida de electrotransferência das proteínas para a membrana de PVDF. A expressão da proteína citoplasmática p65 foi avaliada por *Western blot*, com um anticorpo contra a proteína p65 (1:1000). Para demonstrar a presença de uma quantidade equivalente de proteína nas diferentes amostras, procedeu-se ao *stripping* da membrana e utilizou-se um anticorpo contra a proteína actina (1:10000). (B) Análise densitométrica do *Western blot*. A densidade das bandas correspondentes à proteína citoplasmática p65, nas células cultivadas com LPS e cultivadas com LPS na presença de tyrphostin B42, foi expressa em percentagem da densidade das bandas nas células controlo. Os resultados são médias \pm SEM de três experiências. *** $p < 0,001$ quando comparado com o controlo; + $p < 0,05$ quando comparado com LPS. (C) A distribuição da proteína p65 foi avaliada por imunocitoquímica. Após fixação e permeabilização, as células foram incubadas com um anticorpo policlonal, produzido em coelho, contra a proteína p65 (1:200). Este anticorpo foi visualizado com anticorpos de porco desenvolvidos contra imunoglobulinas de coelho e conjugados com o fluoróforo FITC (1:40). As preparações foram observadas por microscopia de fluorescência confocal (ampliação de 250 x) e são representativas de cinco preparações com resultados similares.

Para investigar a capacidade de ligação ao ADN do factor da transcrição NF- κ B que migrou para o núcleo, os núcleos de células estimuladas com LPS (5 μ g/ml), durante 30 minutos, foram submetidos à análise de EMSA, e os resultados obtidos foram comparados com o controlo (figura 3.6). Os resultados demonstraram que o LPS induziu a ligação do NF- κ B ao ADN, tendo este efeito sido inibido em células previamente tratadas com tyrphostin B42 (50 μ M), durante 30 minutos, e posteriormente estimuladas com LPS, durante outros 30 minutos. Os ensaios de *supershift* realizados permitiram-nos ainda concluir que as FSDC possuem todas as proteínas do NF- κ B (p50, p52, p65, RelB e c-Rel) e que todas as proteínas ligaram ao ADN em resposta ao LPS (figura 3.6).

Com o objectivo de investigar se o efeito inibitório do tyrphostin B42 na migração para o núcleo (figura 3.5) e ligação ao ADN (figura 3.6) da proteína p65 do NF- κ B, estimuladas por LPS, ocorre por modulação da degradação da proteína inibitória do NF- κ B, I κ B- α , os níveis citoplasmáticos desta proteína foram analisados por *Western blot* (figura 3.7). Os resultados demonstraram ocorrer uma diminuição de abundância da proteína I κ B- α no citoplasma, tendo esta diminuição sido máxima, e de $55,1 \pm 8,3$ %, após 30 minutos de incubação com LPS ($p < 0,01$) (figura 3.7 B). Em células pré-incubadas com tyrphostin B42 e posteriormente estimuladas com LPS, durante 30 minutos, verificou-se uma inibição da degradação proteolítica do I κ B- α induzida por LPS.

Estes resultados permitiram-nos concluir que o LPS induziu a degradação da proteína I κ B- α (figura 3.7) ocorrendo, deste modo, a libertação da proteína p65 do NF κ B, previamente sequestrado no citoplasma, e a consequente migração da mesma para o núcleo das FSDC (figura 3.5). Esta proteína ligou-se ao ADN (figura 3.6) para eventualmente induzir a transcrição de genes dependentes deste factor de transcrição. Estes efeitos foram mediados pela JAK2, uma vez que todo este processo de sinalização intracelular foi inibido pelo tyrphostin B42, um inibidor da fosforilação catalisada por esta cinase de resíduos tirosina.

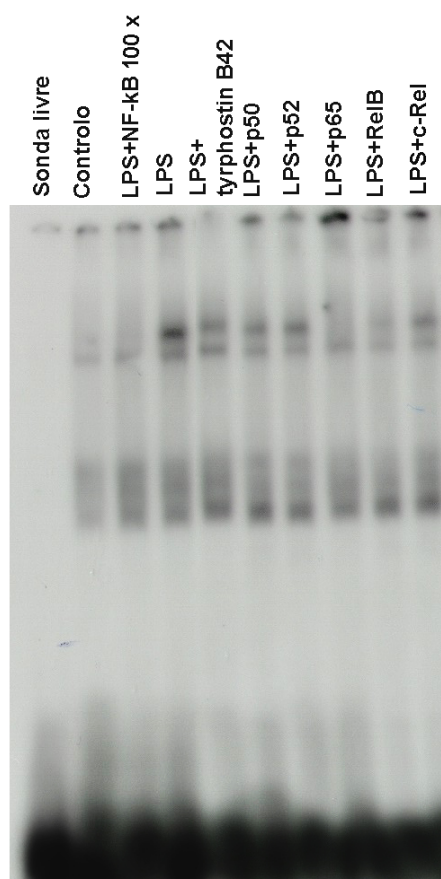


Figura 3.6- Efeito do tyrphostin B42 na ligação do NF- κ B ao ADN estimulada por LPS.

As células FSDC foram incubadas com meio de cultura (controlo), ou com LPS (5 μ g/ml), durante 30 minutos. Quando o efeito do tyrphostin B42 foi estudado, as células foram pré-incubadas com o inibidor (50 μ M), durante 30 minutos, antes da estimulação com LPS (5 μ g/ml), durante outros 30 minutos, na presença do inibidor. Os extractos nucleares das FSDC foram sujeitos à análise de EMSA com o oligonucleótido de dupla cadeia contendo a região de consenso para o factor de transcrição NF- κ B. Para confirmar a especificidade das bandas, foram realizados ensaios de competição, que consistiram na adição prévia de um excesso (100 x) de oligonucleótido não marcado aos extractos nucleares, o que resultou na diminuição dos complexos específicos. Os ensaios de *supershift*, que visam identificar as proteínas constituintes do factor de transcrição activado, consistiram na adição, ao extracto nuclear, de anticorpos específicos (2 μ g) contra as diferentes proteínas constituintes do NF- κ B (p50, p52, p65, RelB e c-Rel). Os complexos foram resolvidos por electroforese em gel de poliacrilamida a 7 %, em condições não desnaturantes, e as bandas NF- κ B/ADN foram examinadas por autoradiografia. O gel apresentado é representativo de dois geles com resultados similares.

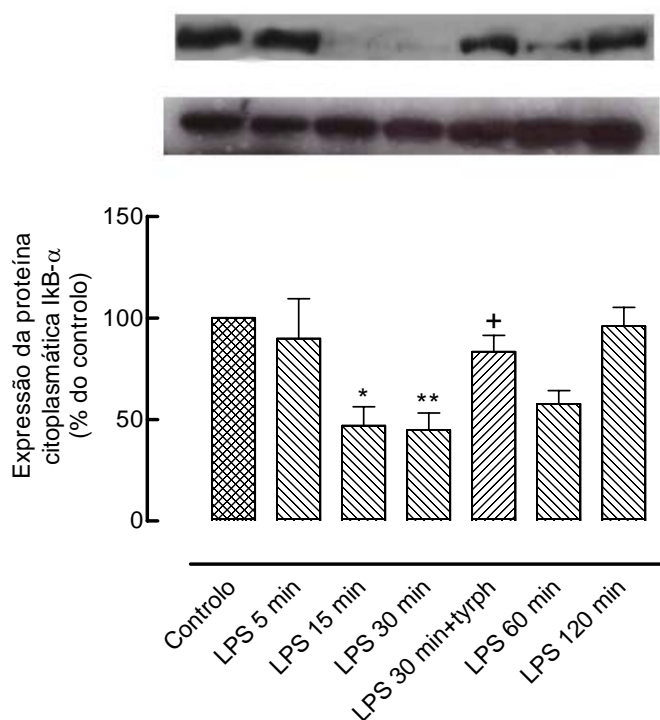


Figura 3.7- Efeito do tyrphostin B42 na degradação citoplasmática do I κ B- α estimulada por LPS.

As células FSDC foram incubadas com meio de cultura (controlo), ou com LPS (5 μ g/ml), durante os tempos indicados na figura. Quando o efeito do tyrphostin B42 foi estudado, as células foram pré-incubadas com o inibidor (50 μ M), durante 30 minutos, antes da estimulação com LPS (5 μ g/ml), durante outros 30 minutos, na presença do inibidor. (A) Os extractos citoplasmáticos foram desnaturados e sujeitos a uma electroforese SDS-PAGE num gel com 15 % de acrilamida, seguida de electrotransferência das proteínas para a membrana de PVDF. A expressão da proteína citoplasmática I κ B- α foi avaliada por *Western blot*, com um anticorpo contra a proteína I κ B- α (1:1000). Para demonstrar a presença de uma quantidade equivalente de proteína nas diferentes amostras, procedeu-se ao *stripping* da membrana e utilizou-se um anticorpo contra a proteína actina (1:10000). (B) Análise densitométrica do *Western blot*. A densidade das bandas correspondentes à proteína citoplasmática I κ B- α nas células cultivadas com LPS, durante os vários tempos indicados na figura, ou cultivadas com LPS na presença de tyrphostin B42, foi expressa em percentagem da densidade das bandas nas células controlo. Os resultados são médias \pm SEM de três experiências. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ quando comparados com o controlo; + $p < 0,05$ quando comparado com LPS 30 minutos.

3.3.4. Efeito inibitório do antioxidante e inibidor do factor de transcrição NF- κ B, PDTC, na expressão da proteína iNOS e na produção de NO estimuladas por LPS

Com o objectivo de avaliar se a activação do NF- κ B é requerida para a expressão da iNOS e produção de NO nas células FSDC, investigou-se o efeito do antioxidante e inibidor do factor de transcrição NF- κ B, ditiocarbamato de pirrolidina (PDTC) (Schreck *et al.*, 1992), na produção de NO e na expressão da iNOS estimuladas por LPS. O composto PDTC demonstrou ser um potente inibidor da produção de NO estimulada por LPS, sendo o efeito inibitório do PDTC dependente da concentração utilizada (figura 3.8 A). O efeito inibitório máximo foi obtido com a concentração de 30 μ M, tendo-se observado uma diminuição na produção de NO para $23,5 \pm 10,42$ % do controlo ($p < 0,001$). Para investigar o efeito do PDTC na expressão da proteína iNOS, as células foram incubadas com LPS (5 μ g/ml) e com o inibidor, durante 24 horas, e os homogeneizados celulares foram posteriormente sujeitos à análise de *Western blot*. Os resultados apresentados na figura 3.8 B e C mostraram que o PDTC inibiu o aumento da expressão da proteína iNOS estimulado por LPS em 62,8 % (figura 3.8 C). Estes resultados sugerem um efeito modulatório do factor de transcrição NF- κ B na expressão da proteína iNOS e na produção de NO estimuladas por LPS e são, portanto, consistentes com a hipótese de que a activação do NF- κ B está envolvida na expressão da iNOS, estimulada por LPS, nas células FSDC.

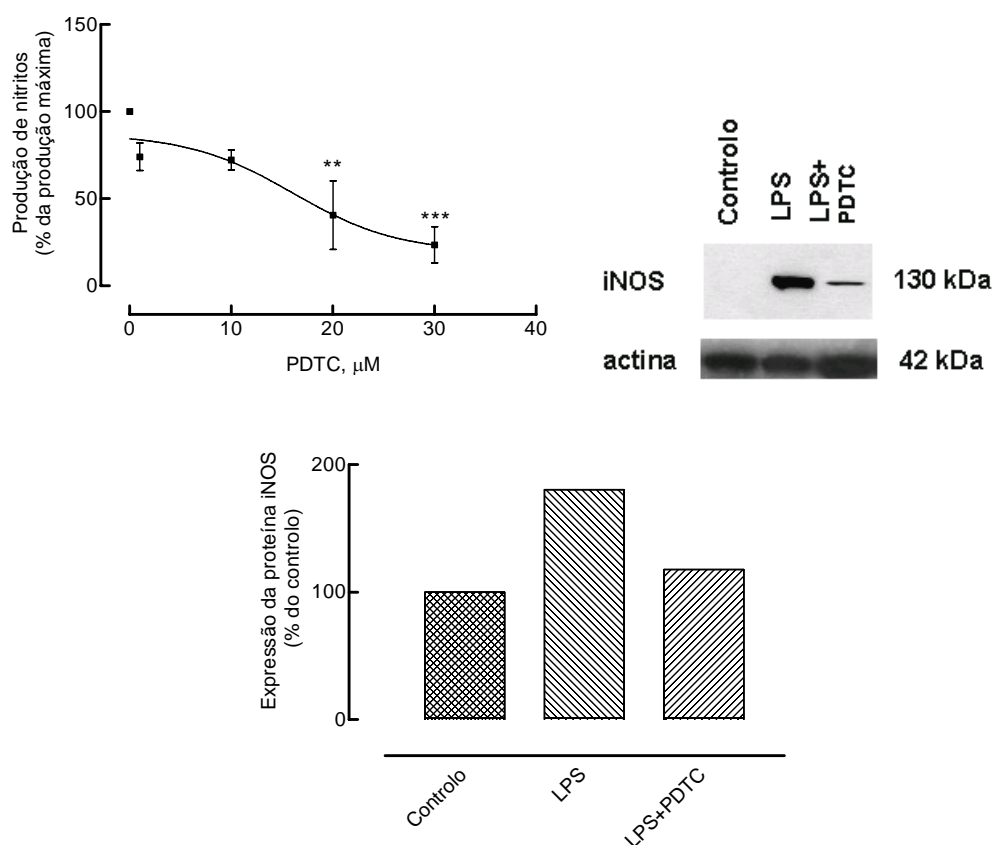


Figura 3.8- Efeito do PDTC na produção de nitritos e na expressão da proteína iNOS estimuladas por LPS.

(A) As células FSDC foram incubadas com o PDTC nas concentrações indicadas no gráfico, na presença de LPS (5 μ g/ml), durante 48 horas. A concentração de nitritos nos sobrenadantes das culturas celulares foi determinada pelo método de *Griess*, usando uma curva padrão de nitrito de sódio. Os resultados foram expressos em percentagem da produção de nitritos por células cultivadas na presença de LPS e na ausência do inibidor (100 % = $31,3 \pm 2,8$ μ M de nitritos) e correspondem a médias \pm SEM de sete experiências, realizadas em duplicado. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ quando comparados com as células cultivadas com LPS e na ausência do inibidor. (B) As células FSDC foram incubadas com meio de cultura (controlo), ou com de LPS (5 μ g/ml), ou com LPS (5 μ g/ml) na presença de PDTC (30 μ M), durante 24 horas. Os extractos celulares totais foram desnaturados e sujeitos a uma electroforese SDS-PAGE num gel com 10 % de acrilamida, seguida de electrotransferência das proteínas para a membrana de PVDF. A expressão da proteína iNOS foi avaliada por *Western blot*, com um anticorpo contra a proteína iNOS (1:2000). Para demonstrar a presença de uma quantidade equivalente de proteína nas diferentes amostras, procedeu-se ao *stripping* da membrana e utilizou-se um anticorpo contra a proteína actina (1:10000). (C) Análise densitométrica do *Western blot*. A densidade das bandas correspondentes à proteína iNOS, nas células cultivadas com LPS e cultivadas com LPS na presença de PDTC, foi expressa em percentagem da densidade das bandas nas células controlo. Os resultados são médias de duas experiências.

3.4. DISCUSSÃO

A capacidade que as células dendríticas possuem para activar linfócitos T virgens e iniciar uma resposta imunológica, depende do estado de maturação em que se encontram. Embora seja possível obter DC imaturas *in vitro* após cultura de monócitos sanguíneos periféricos com GM-CSF e IL-4, são necessários estímulos adicionais, nomeadamente o ligando CD40, a citocina TNF- α ou o LPS, para se obter uma maturação completa e uma eficiente apresentação de antígenos aos linfócitos T. O LPS, um glicolípido constituinte da membrana exterior das bactérias Gram-negativas, induz a migração das DC em órgãos não linfóides (Roake *et al.*, 1995) e induz a maturação das células dendríticas *in vivo* e *in vitro* (De Smedt *et al.*, 1997; Verhasselt *et al.*, 1997; Granucci *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 2002 b; Ismaili *et al.*, 2002).

O objectivo do trabalho incluído neste capítulo consistiu no estudo do efeito do LPS na expressão da isoforma indutível da sintase do monóxido de azoto. Os resultados obtidos mostraram que o LPS induziu um aumento da transcrição do ARNm da iNOS, da expressão da proteína iNOS e da produção de NO em células dendríticas da epiderme de murganho (figuras 3.1, 3.2 e 3.3). Os resultados obtidos sugerem ainda que a expressão da iNOS e a produção de NO envolveram a activação da JAK2 e do NF- κ B (tabela 3.1 e figuras 3.4 e 3.8). Estes resultados estão de acordo com os obtidos por outros autores que detectaram a expressão da iNOS e a produção de NO em células de *Langerhans* e em células dendríticas derivadas da medula óssea, estimuladas por LPS e/ou interferão- γ (IFN- γ) (Lu *et al.*, 1996; Qureshi *et al.*, 1996).

Neste trabalho verificámos também que a inibição da activação da JAK2 pelo tyrphostin B42 preveniu a degradação da proteína inibitória do NF- κ B, I κ B- α (figura 3.7), bem como a migração para o núcleo e a ligação do factor de transcrição NF- κ B ao ADN das células FSDC (figuras 3.5 e 3.6). Estes resultados sugerem que o tyrphostin B42 inibiu a expressão da proteína iNOS por inibir a activação do factor de transcrição NF- κ B. De facto, a região promotora do gene *iNOS* contém locais de ligação para vários factores de transcrição, nomeadamente para o NF- κ B (Xie *et al.*, 1994; de Vera *et al.*, 1996; Weisz

et al., 1996; Taylor *et al.*, 1998; Ganster *et al.*, 2001) e o envolvimento deste factor de transcrição na expressão da iNOS induzida por LPS foi já claramente demonstrado em vários tipos de células (Chen *et al.*, 1998; Heitmeier *et al.*, 1998; Mustafa e Olson, 1998; Zhou *et al.*, 1999; Bhat *et al.*, 2002; Tan *et al.*, 2002). No entanto, os mecanismos de sinalização intracelular activados pelo LPS, e que medeiam a expressão da proteína iNOS, parecem variar com o tipo de célula envolvida. Outros autores demonstraram o envolvimento da PI3K (Dias-Guerra *et al.*, 1999; Pahan *et al.*, 1999), da PKA (Chen *et al.*, 1999 b), da PKB/Akt (Tan *et al.*, 2002), da JAK2/STAT1 (Gao *et al.*, 1997; Nakashima *et al.*, 1999; Dell'Albani *et al.*, 2001; Jacobs e Ignarro, 2001; Ohmori e Hamilton, 2001; Samardzic *et al.*, 2001), da p38 MAPK e ERK (Bhat *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 1999 a; Kristof *et al.*, 2001), e ainda da PKC (Chen *et al.*, 1998) na modulação da expressão da iNOS induzida por LPS.

Os resultados obtidos neste trabalho demonstraram que o inibidor da cinase da ERK (MEK), PD 098059, não afectou a produção de NO, excluindo deste modo a participação da MEK/ERK na produção de NO estimulada por LPS nas células FSDC. De acordo com estes resultados, outros autores observaram que a ERK não está envolvida na expressão da iNOS e na produção de NO em macrófagos (Chen e Wang, 1999; Chen *et al.*, 1999 a) e em células da microglia (Watters *et al.*, 2002), estimuladas com LPS. A ERK regula negativamente a maturação funcional e fenotípica de células dendríticas derivadas de monócitos (Puig-Kröger *et al.*, 2001). No entanto, existem registos do envolvimento da ERK na expressão da iNOS e na produção de NO induzidas por LPS em culturas primárias de células da glia (Bhat *et al.*, 1998) e em células epiteliais (Kristof *et al.*, 2001). Deste modo, a participação da ERK na expressão da iNOS induzida por LPS parece ser controversa e depender do tipo de célula envolvida.

O inibidor da p38 MAPK, SB 203580, inibiu a produção de NO pelas células FSDC. Estes resultados estão de acordo com os de outros autores que também detectaram a participação desta cinase na expressão da iNOS e na produção de NO induzidas por LPS (Bhat *et al.*, 1998; Chen e Wang, 1999; Chen *et al.*, 1999 a; Kristof *et al.*, 2001). Além disso, a maturação das DC tem sido relacionada com a activação da p38

MAPK (Häcker *et al.*, 1998; Ardeshtna *et al.*, 2000; Puig-Kröger *et al.*, 2000; Arrighi *et al.*, 2001; Re e Strominger, 2001; Uchi *et al.*, 2002), pelo que esta cinase parece desempenhar um papel fisiológico importante nas células dendríticas.

Nas células FSDC, a expressão da iNOS estimulada por LPS mostrou depender essencialmente da activação da JAK2. De referir ainda que, recentemente, foi demonstrado, em células dendríticas plasmacitóides, a fosforilação da proteína STAT1, um dos substratos da JAK2, por mecanismos dependentes da p38 MAPK (Takauji *et al.*, 2002), pelo que nas FSDC é possível ocorrer cooperação entre as duas vias de sinalização, JAK2 e p38 MAPK, na indução da expressão da iNOS e na produção de NO estimuladas por LPS. A apoiar os nossos resultados, outros autores demonstraram o envolvimento da JAK2/STAT1 na indução da iNOS em resposta ao LPS e/ou IFN- γ em células da glia (Nishiya *et al.*, 1995; Nishiya *et al.*, 1997; Kitamura *et al.*, 1996; Dell'Albani *et al.*, 2001), em macrófagos (Gao *et al.*, 1997; Ohmori e Hamilton, 2001; Chen *et al.*, 2002 a), em células mesangiais (Nakashima *et al.*, 1999), em células epiteliais (Kleinert *et al.*, 1998; Cavicchi e Whittle, 1999) e em células do fígado (Lee *et al.*, 1997). Pelo contrário, em células musculares, a JAK2 inibe a expressão da iNOS estimulada por LPS e IFN- γ (Marrero *et al.*, 1998).

Os resultados obtidos neste trabalho demonstraram ainda que o efeito inibitório do tyrphostin B42 na activação do NF- κ B e na indução da expressão da iNOS induzidas por LPS ocorre por bloqueio de eventos de sinalização intracelular que antecedem a degradação do I κ B- α . Estes resultados sugerem que a estimulação da JAK2 induz a activação de enzimas responsáveis pela fosforilação do I κ B, ocorrendo libertação do NF- κ B sequestrado no citoplasma e sua migração para o núcleo, para, provavelmente, induzir a transcrição do gene *iNOS*. De acordo com estes resultados, estudos efectuados em neurónios demonstraram o envolvimento da JAK2 na fosforilação da proteína inibitória do NF- κ B, I κ B, na migração para o núcleo do NF- κ B e na transcrição de genes alvo deste factor de transcrição (Digicaylioglu e Lipton, 2001). A reforçar ainda o envolvimento da JAK2 na activação do NF- κ B, outro estudo demonstra que a proteína STAT5, substrato da JAK2, pode também estimular o NF- κ B (Nakamura *et al.*, 2002).

As células dendríticas derivadas de monócitos sanguíneos expressam todos os TLR e, após reconhecimento dos respectivos ligandos, sofrem maturação (Medzhitov, 2001). Neste trabalho não se procedeu à detecção dos receptores TLR na linha celular FSDC. No entanto, é possível que a activação do NF- κ B e a expressão da iNOS estimuladas por LPS nas células FSDC ocorra após interacção da endotoxina com o TLR4. A apoiar esta hipótese foi recentemente demonstrado que a internalização do complexo LPS/CD14 induziu a expressão da iNOS e a produção de NO em células musculares cardíacas (Cowan *et al.*, 2001), e em macrófagos verificou-se que a expressão da iNOS e a consequente produção de NO induzidas por lipoproteínas bacterianas envolvia os TLR (Brightbill *et al.*, 1999).

A expressão do TLR4 e da proteína MD-2, essenciais para a activação das MAPKs e do NF- κ B em resposta ao LPS (Yang *et al.*, 2000), parece ser regulada pela via de sinalização JAK/STAT em células epiteliais humanas (Abreu *et al.*, 2002) e pela ERK, p38 MAPK e NF- κ B, em células dendríticas de murganho (An *et al.*, 2002). Deste modo, a inibição da JAK2 ou da p38 MAPK poderá regular negativamente a expressão do TLR4 e da proteína MD-2 e, como tal, as respostas celulares ao LPS, nomeadamente a expressão da iNOS. Estes resultados estão de acordo com os obtidos nas células FSDC, em que a inibição da JAK2 pelo tyrphostin B42 e a inibição da p38 MAPK pelo SB 203580 induziu uma diminuição na produção de NO, estimulada por LPS.

A maturação das células dendríticas, células do sistema imunológico natural, permite-lhes, através da estimulação de linfócitos T virgens, activar o sistema imunológico adquirido. Para além do papel essencial das células dendríticas na estimulação do sistema imunológico, elas desempenham também um papel importante na defesa contra infecções, provavelmente através da produção de NO (Stenger *et al.*, 1996; Rescigno *et al.*, 2002; Dalpke *et al.*, 2002; Norimatsu *et al.*, 2003). O monóxido de azoto produzido pelas DC é também parcialmente responsável pelas propriedades anti-tumorais destas células (Shimamura *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2002), o que demonstra a importância vital deste radical no desempenho das funções biológicas das DC. Foi demonstrado que o LPS aumenta a actividade anti-tumoral mediada pelas células

dendríticas (Chapoval *et al.*, 2000), pelo que o LPS e o seu componente activo, lípido A, têm sido utilizados isolados, ou como adjuvantes, em vacinas anti-tumorais (Reisser *et al.*, 2002). Por outro lado, o facto de as células dendríticas serem responsáveis pelo início de uma resposta imunológica dos linfócitos T contra antígenos específicos, nomeadamente antígenos tumorais, tem aberto novas perspectivas na imuno-terapia do cancro, através da utilização de células dendríticas como vacinas (Reinhard *et al.*, 2002). Deste modo, o conhecimento das vias de sinalização intracelular activadas pelo LPS que estimulam a produção de NO nas células dendríticas, poderá contribuir para aperfeiçoar estratégias terapêuticas, designadamente vacinas, que utilizam as DCs e as propriedades adjuvantes do LPS na indução de respostas imunológicas celulares.