

Capítulo 4

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

4.1. RESUMO

Neste trabalho investigou-se o efeito do factor estimulante de colónias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) 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 GM-CSF, responsáveis pelo aumento da expressão da iNOS foram também investigadas. Os resultados obtidos demonstraram que o GM-CSF aumentou a expressão da iNOS com o consequente aumento da produção de NO pelas FSDC. A expressão da iNOS induzida por GM-CSF 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.

4.2. INTRODUÇÃO

As células dendríticas da epiderme, células de *Langerhans*, captam os antígenos que entram em contacto com a pele, sofrem um processo de maturação e migram para os gânglios linfáticos, sendo aí desencadeado o processo de apresentação dos antígenos aos linfócitos. Estes processos de migração e maturação dependem de citocinas produzidas na epiderme, nomeadamente de IL-1, do TNF- α e do factor de crescimento GM-CSF, que induzem alterações funcionais e fenotípicas nas células dendríticas (Holt e Thomas, 1997; Bancherau e Steinman, 1998; Lipscomb e Masten, 2002).

O GM-CSF está envolvido na diferenciação das DC a partir de monócitos sanguíneos (Poggi *et al.*, 1998) e é um factor de crescimento essencial para a sobrevivência (Witmer-Pack *et al.*, 1987; Woltman *et al.*, 2003) e maturação (Inaba *et al.*, 1992; Lutz *et al.*, 2002) das células dendríticas. A libertação intradermal de GM-CSF altera o estado de maturação das células apresentadoras de antígenos cutâneas e promove reacções imunológicas mais severas contra alérgenos (Kremer *et al.*, 2000). Em células da microglia, o GM-CSF induz a transcrição de vários genes envolvidos na apresentação de antígenos aos linfócitos (Re *et al.*, 2002).

A ligação do GM-CSF ao seu receptor, presente na maior parte dos progenitores mielóides e em células diferenciadas, designadamente em neutrófilos, células dendríticas, monócitos, eosinófilos e basófilos (Guthridge *et al.*, 1998), promove uma série de eventos de sinalização intracelular. Apesar de não se conhecerem completamente as vias de sinalização activadas por esta citocina, vários estudos referem o envolvimento da JAK/STAT (Watanabe *et al.*, 1996; Welte *et al.*, 1997; Yamaoka *et al.*, 1998; Okuda *et al.*, 1999), da ras/MAPK (Bittorf *et al.*, 1994; Liu *et al.*, 1997 b; McLeish *et al.*, 1998) e da PI3K/PKB (Al-Shami e Naccache, 1999; Dijkers *et al.*, 1999), na sinalização intracelular activada pelo GM-CSF.

A lista de agentes imunológicos que induzem a expressão da isoforma indutível da sintase do monóxido de azoto (iNOS) tem aumentado substancialmente nos últimos

anos (Lamas *et al.*, 1998). O trabalho desenvolvido neste capítulo teve por objectivo investigar o efeito do GM-CSF na expressão da iNOS e na produção de NO por células dendríticas da pele. Além disso, foram investigadas as vias de sinalização intracelular, activadas pelo GM-CSF, que estão envolvidas na expressão desta enzima e na produção do monóxido de azoto.

4.3. RESULTADOS

4.3.1. Expressão da proteína iNOS e produção de NO estimuladas por GM-CSF

Com o objectivo de avaliar o efeito do GM-CSF na produção de NO por FSDC, as células foram cultivadas com concentrações crescentes de GM-CSF (1-200 ng/ml), durante 48 horas. Os resultados apresentados na figura 4.1 demonstraram que a produção de nitritos, avaliada pela técnica de *Griess*, aumentou com a concentração de GM-CSF utilizada para estimular as células, reflectindo assim um aumento na produção de NO. Após estimulação das células com 200 ng/ml, a produção de NO aumentou, relativamente ao controlo, $3,0 \pm 1,1$ vezes ($p < 0,05$). 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 GM-CSF (200 ng/ml), durante 48 h, na presença de 1 mM do inibidor da iNOS, a aminoguanidina (AG) (Misko *et al.*, 1993, Corbett e McDaniel, 1996; Bryk e Wolff, 1998; Alderton *et al.*, 2001). Os resultados apresentados na figura 4.2 demonstraram que a produção de nitritos estimulada por GM-CSF foi totalmente inibida pela aminoguanidina, confirmando-se, deste modo, que a produção de NO é específica da enzima iNOS.

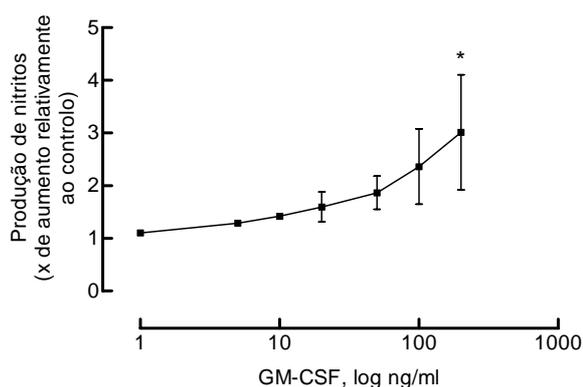


Figura 4.1- Efeito do GM-CSF na produção de nitritos.

As células FSDC foram incubadas com concentrações crescentes de GM-CSF (1-200 ng/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 GM-CSF). A produção de nitritos nas células controlo foi de $11,9 \pm 3,2 \mu\text{M}$. Os resultados apresentados correspondem a médias \pm SEM de cinco experiências independentes. * $p < 0,05$ quando comparado com o controlo.

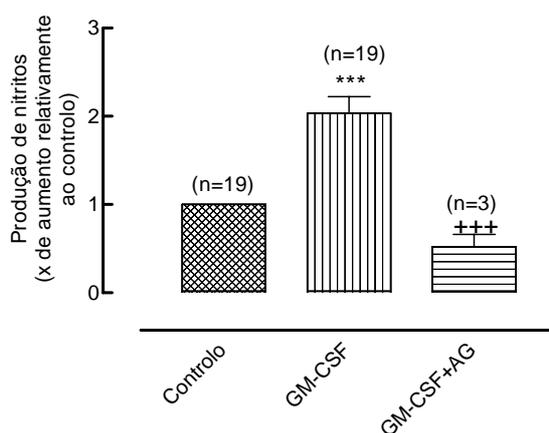


Figura 4.2- Efeito da aminoguanidina na produção de nitritos por FSDC estimuladas com GM-CSF.

As células FSDC foram incubadas na ausência (controlo) ou na presença de 200 ng/ml de GM-CSF, durante 48 horas. Onde indicado, as células foram também incubadas com 1 mM de aminoguanidina (AG) durante o período de estimulação com o GM-CSF. 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 $3,9 \pm 0,8 \mu\text{M}$. 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; +++ $p < 0,001$ quando comparado com as células estimuladas com GM-CSF e na ausência da AG.

Com o objectivo de investigar se o aumento da produção de NO por células estimuladas com GM-CSF envolvia um aumento da expressão da proteína iNOS, procedeu-se à análise da proteína por imunocitoquímica e por *Western blot* (figura 4.3). Os estudos de imunofluorescência demonstraram que o GM-CSF (200 ng/ml) induziu um aumento da expressão citoplasmática da proteína iNOS (figura 4.3 A). Estes resultados foram confirmados por *Western blot* (figura 4.3 B), tendo-se observado que o GM-CSF aumentou a expressão da proteína iNOS 57,8 % (figura 4.3 C) relativamente ao controlo. Estes resultados permitiram-nos concluir que o GM-CSF induziu um aumento na expressão da proteína iNOS com o consequente aumento da produção de monóxido de azoto pelas FSDC.

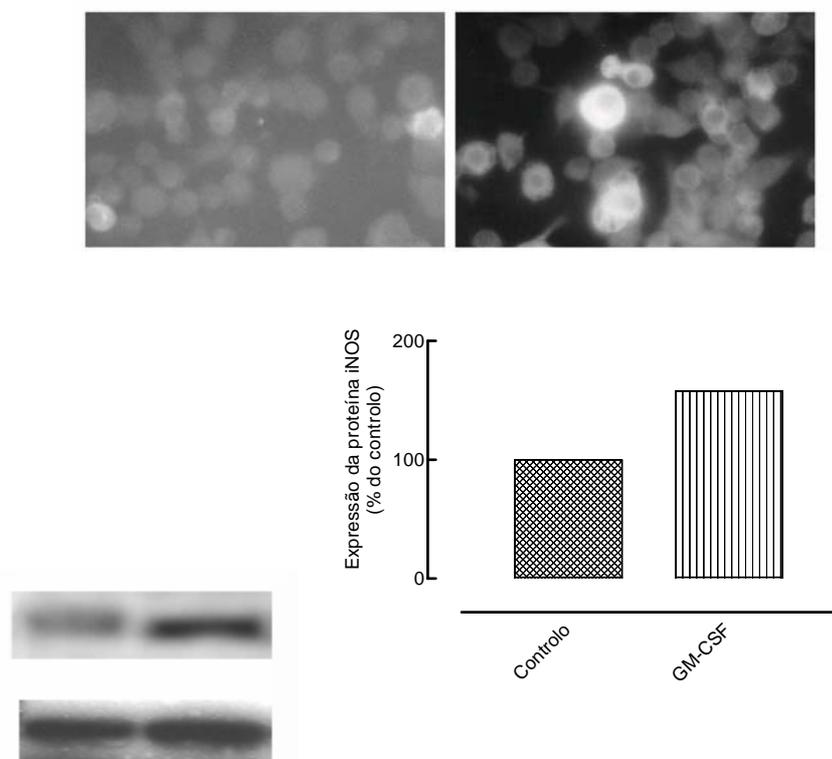


Figura 4.3- Efeito do GM-CSF na expressão da proteína iNOS.

(A) As células FSDC foram incubadas com GM-CSF (200 ng/ml), durante 48 horas. A expressão e distribuição intracelular 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). 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 normal (ampliação de 250 x) e são representativas de duas preparações com resultados similares. (B) As células FSDC foram incubadas com GM-CSF (200 ng/ml), 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 GM-CSF, foi expressa em percentagem da densidade das bandas nas células controlo. Os resultados são médias de duas experiências.

4.3.2. Efeito de inibidores de cinases de proteínas na produção de NO estimulada por GM-CSF

Para avaliar o papel de diversas cinases de proteínas na produção de NO estimulada por GM-CSF, as FSDC foram estimuladas, durante 48 horas, com GM-CSF (200 ng/ml), ou simultaneamente com GM-CSF e os inibidores de diferentes cinases (tabela 4.1) cuja activação tem sido descrita em diversos sistemas biológicos por esta citocina epidérmica (Zhao *et al.*, 1995; Paul *et al.*, 1997; Matsuguchi *et al.*, 1998; McLeish *et al.*, 1998; Zu *et al.*, 1998; Okuda *et al.*, 1999). A genisteína (30 μ M), um inibidor de largo espectro de cinase de resíduos tirosina (Akiyama e Ogawara, 1991), inibiu a produção de nitritos em $43,9 \pm 13,4$ % ($p < 0,001$), contrariamente ao seu análogo inactivo, a genistina, que demonstrou não afectar a produção de NO estimulada por GM-CSF. O composto PD 098059 (30 μ M), inibidor selectivo da cinase da ERK (MEK) (Dudley *et al.*, 1995), não afectou a produção de NO, pelo que a via de sinalização intracelular da MEK não está envolvida na produção de NO estimulada por GM-CSF nas FSDC. Pelo contrário, o inibidor da p38 MAPK, SB 203580 (20 μ M) (Badger *et al.*, 1998), diminuiu a produção de nitritos para $72,4 \pm 7,0$ % do controlo ($p < 0,05$). O composto tyrphostin B42, inibidor da cinase de resíduos de tirosina JAK2 (Meydan *et al.*, 1996), demonstrou ser um potente inibidor da produção de NO estimulada por GM-CSF (tabela 4.1), uma vez que 20 μ M de tyrphostin B42 diminuiu a produção de NO estimulada por GM-CSF para $38,2 \pm 7,5$ % do controlo ($p < 0,001$). Estes resultados indicam que a via de sinalização intracelular da JAK2 é crucial na regulação da produção de NO induzida por GM-CSF nas células FSDC. O efeito inibitório do tyrphostin B42 demonstrou ser dependente da concentração utilizada (figura 4.4 A), tendo-se observado um efeito inibitório máximo na produção de NO estimulada por GM-CSF para a concentração de 100 μ M ($p < 0,001$).

Tabela 4.1- Efeito de inibidores de cinases de proteínas na produção de nitritos estimulada por GM-CSF.

<i>Inibidor</i>	<i>Produção de nitritos (% da produção máxima)</i>
Genisteína (30 μ M)	56,1 \pm 13,3*** (n=5)
Genistina (30 μ M)	128,4 (n=2)
PD 098059 (30 μ M)	89,5 \pm 6,1 (n=5)
SB 203580 (20 μ M)	72,4 \pm 7,0* (n=4)
Tyrphostin B42 (20 μ M)	38,2 \pm 7,5*** (n=3)

As células FSDC foram incubadas com os inibidores de cinases de proteínas nas concentrações indicadas na tabela, na presença de GM-CSF (200 ng/ml), durante 48 horas. A concentração de nitritos nos sobrenadantes das culturas celulares foi determinada a partir de uma curva padrão de nitrito de sódio e de acordo com o ensaio de *Griess*. Os resultados foram expressos em percentagem da produção de nitritos por células cultivadas na presença de GM-CSF e na ausência dos inibidores (100 % = 2,2 \pm 0,5 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 GM-CSF e na ausência dos inibidores.

Para avaliar se o efeito inibitório do tyrphostin B42 ocorria numa fase anterior ou posterior à síntese da proteína iNOS, as células foram incubadas com GM-CSF (200 ng/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 4.4 B e C mostraram que o tyrphostin B42 inibiu o aumento da expressão da iNOS estimulada por GM-CSF (de 157,8 para 120,1 %) (figura 4.4 C), confirmando-se, deste modo, que o efeito inibitório do tyrphostin B42 ocorre numa fase de sinalização intracelular anterior à indução da expressão da iNOS.

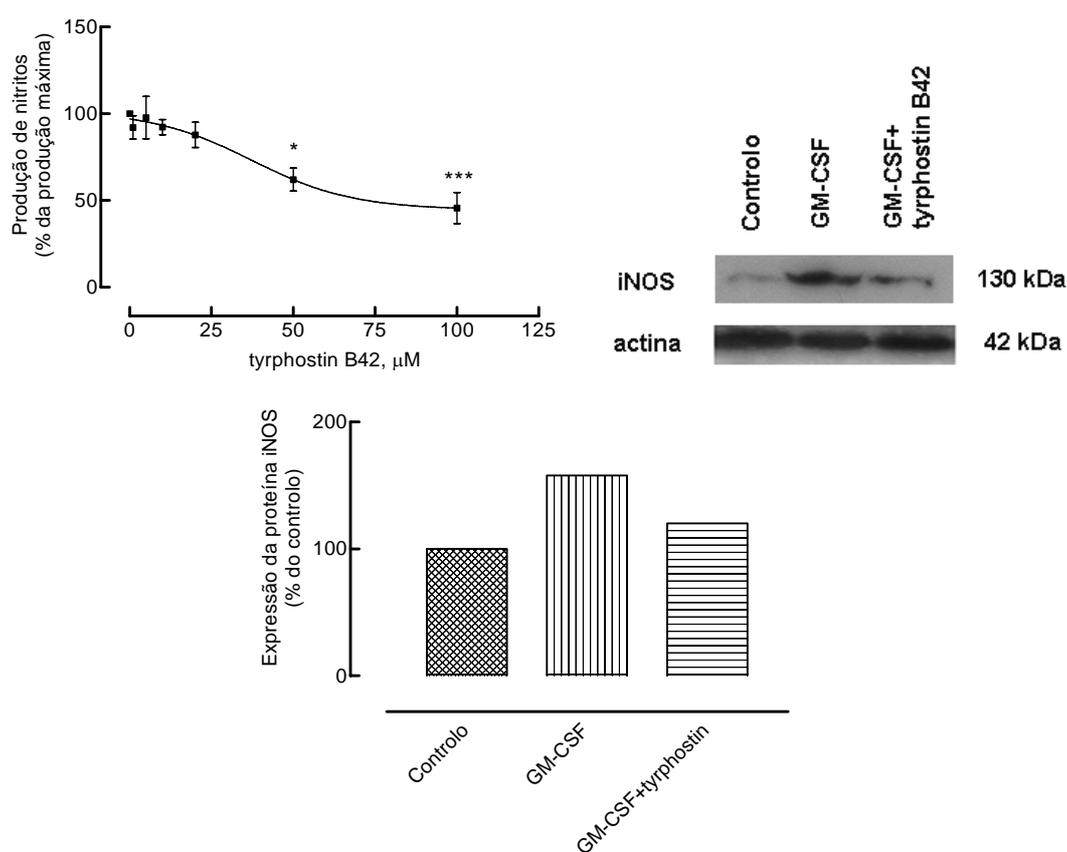


Figura 4.4.- Efeito do tyrphostin B42 na produção de nitritos e na expressão da proteína iNOS estimuladas por GM-CSF.

(A) As células FSDC foram incubadas com o tyrphostin B42 nas concentrações indicadas no gráfico, na presença de GM-CSF (200ng/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 GM-CSF e na ausência do inibidor (100 % = $26,6 \pm 5,4$ µM de nitritos) e correspondem a médias \pm SEM de três experiências. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ quando comparados com as células cultivadas com GM-CSF e na ausência do inibidor. (B) As células FSDC foram incubadas com meio de cultura (controlo), ou com GM-CSF (200ng/ml), ou com GM-CSF (200ng/ml) na presença de tyrphostin B42 (50 µM), 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 GM-CSF e cultivadas com GM-CSF na presença de tyrphostin B42, foi expressa em percentagem da densidade das bandas nas células controlo. Os resultados são médias de duas experiências.

4.3.3. Migração das diferentes subunidades do factor de transcrição NF- κ B para o núcleo, ligação ao ADN e degradação citoplasmática do I κ B- α estimuladas por GM-CSF

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 GM-CSF, investigou-se o efeito desta citocina na activação das várias subunidades constituintes do NF- κ B. As FSDC foram estimuladas com 200 ng/ml de GM-CSF durante vários tempos (5 a 60 minutos), e os extractos citoplasmáticos e nucleares foram sujeitos à análise de *Western blot* com anticorpos específicos contra as diferentes subunidades constituintes do NF- κ B. Os resultados obtidos mostraram que 15 e 30 minutos de estimulação celular com GM-CSF induziram uma diminuição no citoplasma e um aumento no núcleo das proteínas p50 (figura 4.5), p52 (figura 4.6) e RelB (figura 4.7). As proteínas p65 e c-Rel não sofreram migração nuclear em resposta ao GM-CSF (resultados não apresentados).

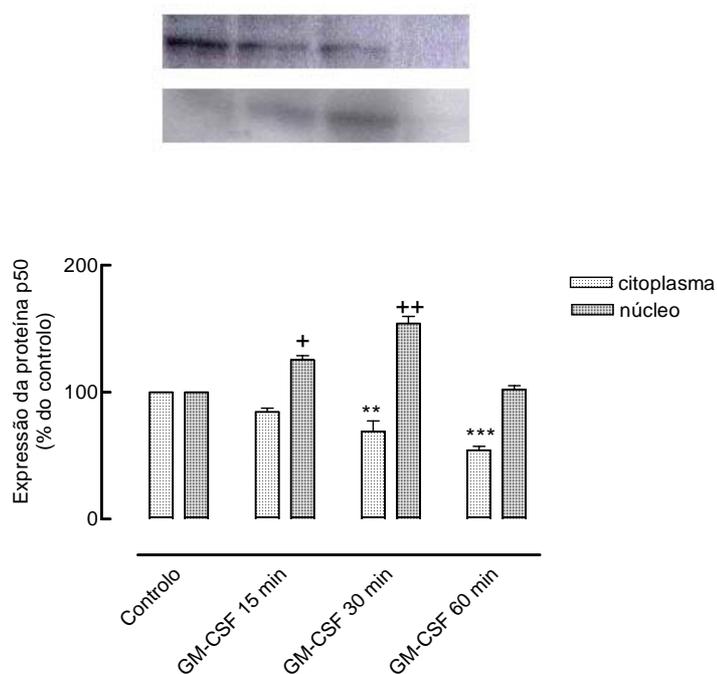


Figura 4.5- O GM-CSF induz a migração para o núcleo da proteína p50.

As células FSDC foram incubadas com meio de cultura (controlo), ou com GM-CSF (200 ng/ml), durante os tempos indicados na figura. (A) Os extractos citoplasmáticos e nucleares 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 p50 foi avaliada por *Western blot*, com um anticorpo policlonal contra a proteína p50 (1:100). (B) Análise densitométrica do *Western blot* para a proteína p50. A densidade das bandas correspondentes à proteína p50 nas células cultivadas com GM-CSF, durante os vários tempos indicados na figura, foi expressa em percentagem da densidade das bandas equivalentes nas células controlo. Os resultados são médias \pm SEM de três experiências. ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ quando comparados com o controlo referente à proteína p50 existente no citoplasma; + $p < 0,05$ e ++ $p < 0,01$ quando comparados com o controlo referente à proteína p50 existente no núcleo.

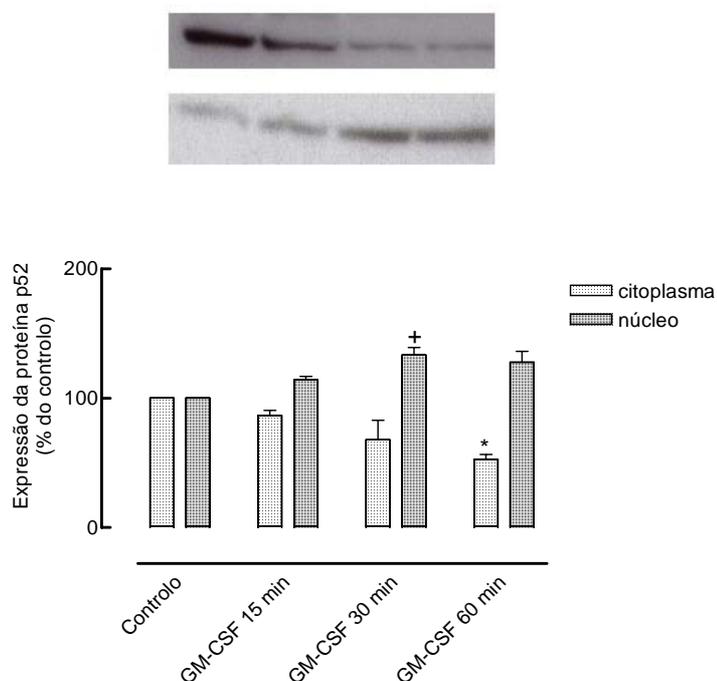


Figura 4.6- O GM-CSF induz a migração para o núcleo da proteína p52.

As células FSDC foram incubadas com meio de cultura (controlo), ou com GM-CSF (200 ng/ml), durante os tempos indicados na figura. (A) Os extractos citoplasmáticos e nucleares 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 das proteínas p52 foi avaliada por *Western blot*, com um anticorpo policlonal contra a proteína p52 (1:500). (B) Análise densitométrica do *Western blot* para a proteína p52. A densidade das bandas correspondentes à proteína p52 nas células cultivadas com GM-CSF, durante os vários tempos indicados na figura, foi expressa em percentagem da densidade das bandas equivalentes nas células controlo. Os resultados são médias \pm SEM de três experiências. * $p < 0,05$ quando comparado com o controlo referente à proteína p52 existente no citoplasma; + $p < 0,05$ quando comparado com o controlo referente à proteína p52 existente no núcleo.

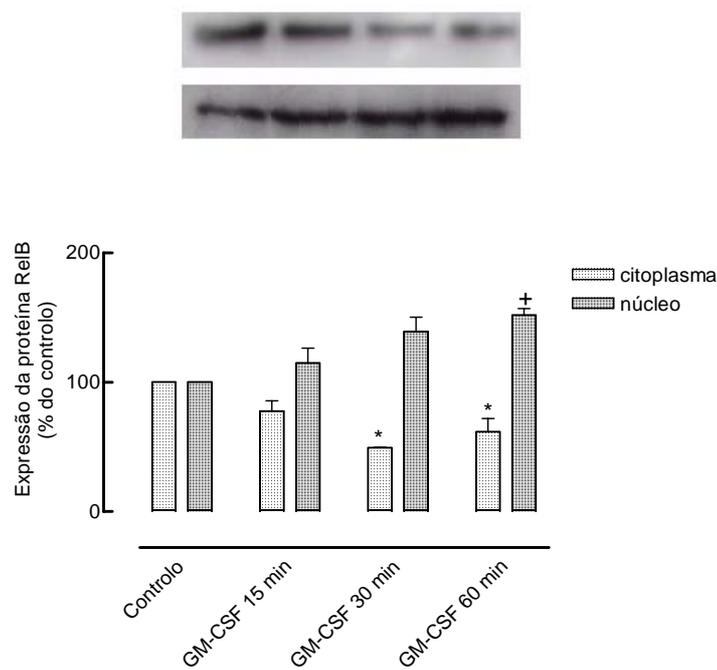


Figura 4.7- O GM-CSF induz a migração para o núcleo da proteína RelB.

As células FSDC foram incubadas com meio de cultura (controlo), ou com GM-CSF (200 ng/ml), durante os tempos indicados na figura. (A) Os extractos citoplasmáticos e nucleares 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 das proteína RelB foi avaliada por *Western blot*, com um anticorpo policlonal contra a proteína RelB (1:500). (B) Análise densitométrica do *Western blot* para a proteína RelB. A densidade das bandas correspondentes à proteína RelB nas células cultivadas com GM-CSF, durante os vários tempos indicados na figura, foi expressa em percentagem das densidade das bandas equivalentes nas células controlo. Os resultados são médias \pm SEM de três experiências. * $p < 0,05$ quando comparados com o controlo referente à proteína RelB existente no citoplasma; + $p < 0,05$ quando comparado com o controlo referente à proteína RelB existente no núcleo.

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 GM-CSF (200 ng/ml), durante 30 minutos, foram submetidos à análise de EMSA (figura 4.8). Os resultados demonstraram que o GM-CSF 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 GM-CSF na presença de tyrphostin B42, durante outros 30 minutos. Os ensaios de *supershift* realizados permitiram-nos ainda concluir que nas FSDC as proteínas do NF- κ B p50, p52, e RelB ligaram ao ADN em resposta ao GM-CSF (figura 4.8).

Com o objectivo de investigar se a migração para o núcleo das proteínas do NF- κ B (figuras 4.5, 4.6 e 4.7) e a ligação ao ADN (figura 4.8) ocorria por modulação da fosforilação e degradação da proteína inibitória do NF- κ B, os níveis citoplasmáticos da proteína I κ B- α e da proteína I κ B- α fosforilada nos resíduos serina 32 e 36 (pI κ B- α) foram analisados por *Western blot* (figura 4.9). Os resultados demonstraram ocorrer uma fosforilação da proteína I κ B- α aos 5 e 15 minutos (figura 4.9 B) com a consequente degradação da mesma, sendo esta degradação máxima e de $55,4 \pm 8,6$ %, após 30 minutos de incubação com GM-CSF ($p < 0,01$) (figura 4.9 C). Estes resultados permitiram-nos concluir que o GM-CSF induziu a fosforilação e degradação da proteína I κ B- α (figura 4.9) ocorrendo, deste modo, a libertação no citoplasma das proteínas do NF- κ B com a consequente migração das mesmas para o núcleo (figuras 4.5, 4.6 e 4.7). Estas proteínas ligaram ao ADN (figura 4.8) para eventualmente induzir a transcrição de genes dependentes deste factor de transcrição, designadamente o gene *iNOS*. O tyrphostin B42, um inibidor selectivo da cinase de resíduos tirosina JAK2, inibiu a ligação do NF- κ B ao ADN, o que demonstra que, nas FSDC, a activação do factor de transcrição NF- κ B pelo GM-CSF depende da JAK2.

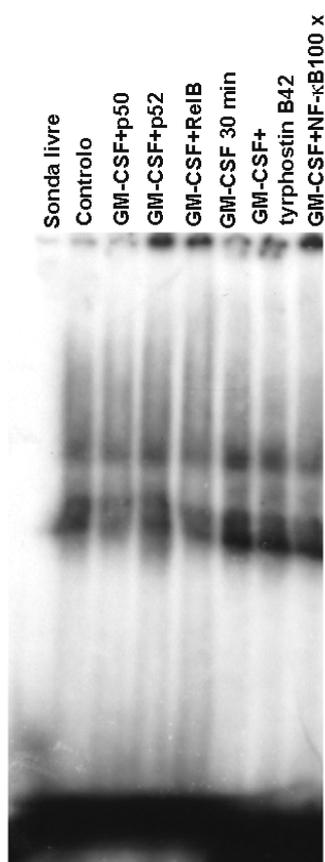


Figura 4.8- Efeito do tyrphostin B42 na ligação do NF- κ B ao ADN induzida por GM-CSF.

As células FSDC foram incubadas com meio de cultura (controlo), ou com GM-CSF (200 ng/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, seguindo-se a estimulação com GM-CSF (200 ng/ml), durante 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 três geles com resultados similares.

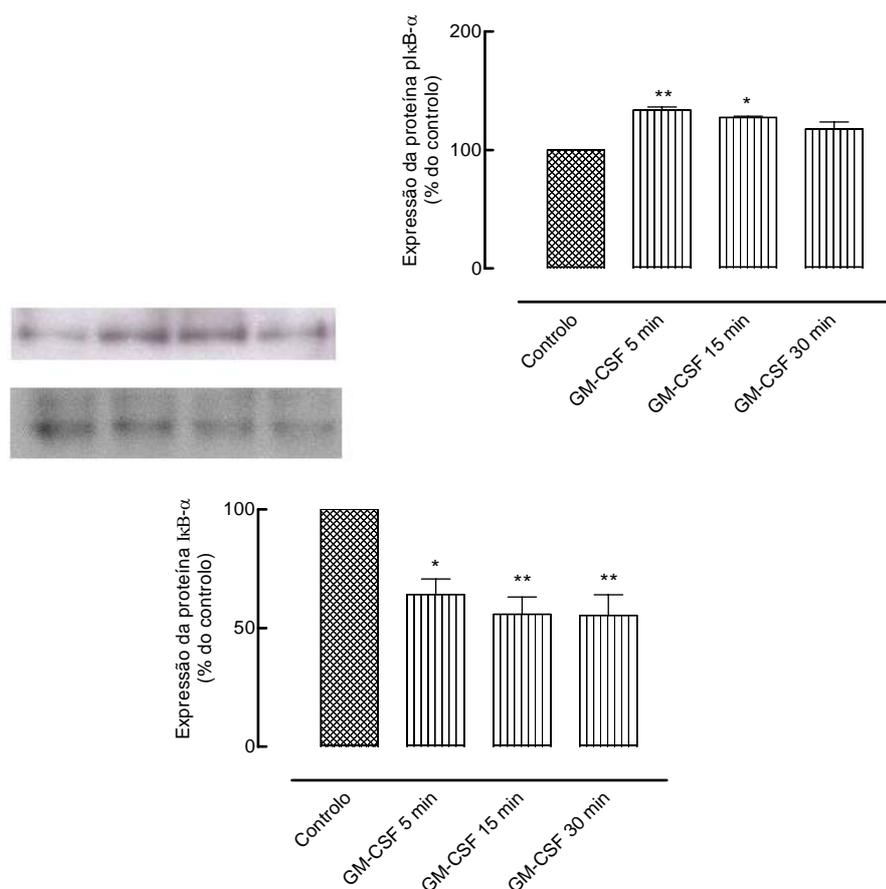


Figura 4.9- O GM-CSF induz a fosforilação e a degradação citoplasmática da proteína IκB- α .

As células FSDC foram incubadas com meio de cultura (controlo), ou com GM-CSF (200 ng/ml), durante os tempos indicados na figura. (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 das proteínas citoplasmáticas pIκB- α e IκB- α foi avaliada por *Western blot*, com um anticorpo monoclonal contra a proteína pIκB- α (Ser32/36) (1:1000) e com um anticorpo policlonal contra a proteína IκB- α (1:1000), respectivamente. (B) Análise densitométrica do *Western blot* para a proteína pIκB- α . A densidade das bandas correspondentes à proteína citoplasmática pIκB- α nas células cultivadas com GM-CSF, durante os vários tempos indicados na figura, 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. (C) Análise densitométrica do *Western blot* para a proteína IκB- α . A densidade das bandas correspondentes à proteína citoplasmática IκB- α nas células cultivadas com GM-CSF, durante os vários tempos indicados na figura, 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.

4.3.4. 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 GM-CSF

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 GM-CSF. O composto PDTC demonstrou ser um potente inibidor da produção de NO estimulada por GM-CSF, sendo o efeito inibitório do PDTC dependente da concentração utilizada (figura 4.10 A). O efeito inibitório máximo foi obtido com a concentração de 30 μ M, tendo-se observado uma diminuição na produção de NO para $25,5 \pm 4,0$ % do controlo ($p < 0,001$). Para investigar o efeito do PDTC na expressão da proteína iNOS, as células foram incubadas com GM-CSF (200 ng/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 4.10 B e C demonstraram que o PDTC inibiu o aumento da expressão da iNOS estimulada por GM-CSF em 56,0 % (figura 4.10 C). Estes resultados sugerem que o NF- κ B está envolvido na indução da expressão da proteína iNOS e na produção de NO estimuladas por GM-CSF.

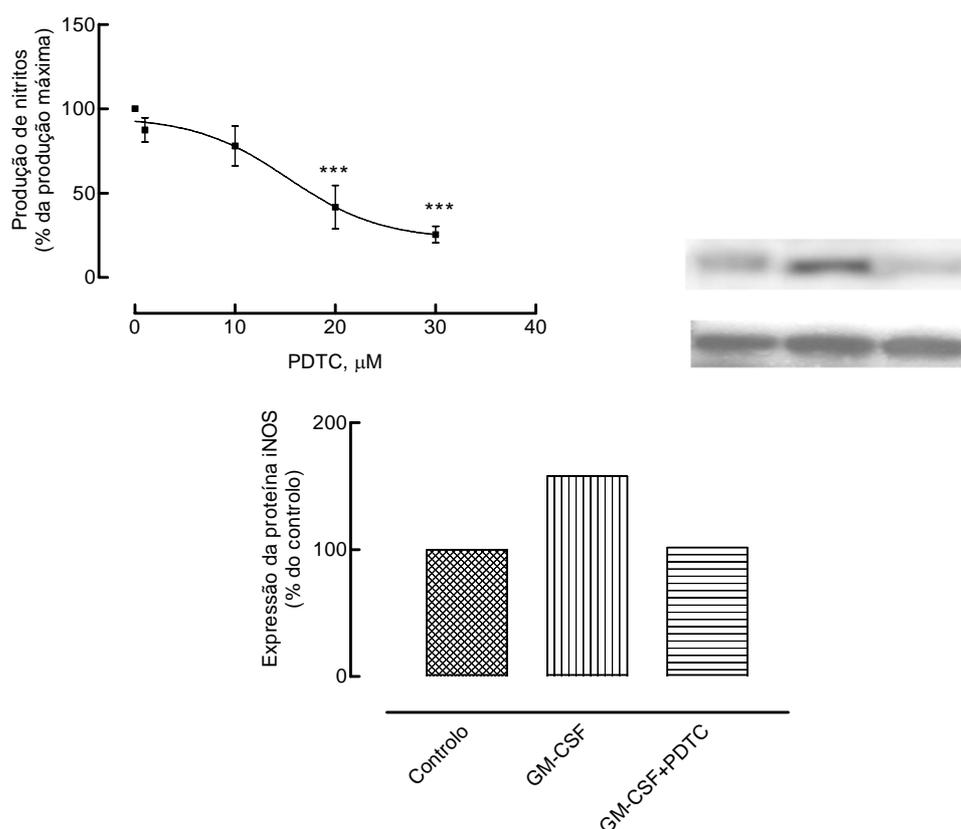


Figura 4.10- Efeito do PDTC na produção de nitritos e na expressão da proteína iNOS estimuladas por GM-CSF.

(A) As células FSDC foram incubadas com o PDTC nas concentrações indicadas no gráfico, na presença de GM-CSF (200 ng/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 GM-CSF e na ausência do inibidor (100 % = $8,0 \pm 1,2 \mu$ M de nitritos) e correspondem a médias \pm SEM de sete experiências, realizadas em duplicado. *** $p < 0,001$ quando comparados com as células cultivadas com GM-CSF e na ausência do inibidor. (B) As células FSDC foram incubadas com meio de cultura (controlo), ou com GM-CSF (200 ng/ml), ou com GM-CSF (200 ng/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 GM-CSF e cultivadas com GM-CSF na presença de PDTC, foi expressa em percentagem da densidade das bandas nas células controlo. Os resultados são médias de duas experiências.

4.4. DISCUSSÃO

O GM-CSF, a IL-3, e a IL-5 pertencem a uma família de citocinas que regulam a proliferação, diferenciação e sobrevivência das células progenitoras hematopoiéticas da série mielóide, bem como as funções das células mielóides diferenciadas (Guthridge *et al.*, 1998). Na pele, o GM-CSF é produzido essencialmente pelos queratinócitos (Schreiber *et al.*, 1992) e é uma citocina fundamental para a maturação funcional das células de *Langerhans* (Witmer-Pack *et al.*, 1987; Heufler *et al.*, 1988). Em culturas de monócitos e de células precursoras da medula óssea, o GM-CSF é uma citocina essencial ao desenvolvimento (Inaba *et al.*, 1992; Young *et al.*, 1995; Poggi *et al.*, 1998; Rosenzweig *et al.*, 2002), sobrevivência (Woltman *et al.*, 2003) e maturação (Lutz *et al.*, 2002) das células dendríticas. Esta citocina aumenta a expressão de moléculas envolvidas na apresentação de antígenos aos linfócitos, como B7-1, B7-2 e CD40 (Yokozeki *et al.*, 1998; Salgado *et al.*, 1999), e regula a apresentação de antígenos pelas DC aos linfócitos (Holt e Thomas, 1997).

Existe na literatura alguma controvérsia relativamente ao efeito do GM-CSF na expressão da iNOS. Em macrófagos alveolares o GM-CSF aumenta a produção de nitritos (Liu *et al.*, 1997 a), contrariamente ao observado em macrófagos peritoneais e em condrócitos da cartilagem em que o GM-CSF não induz a produção de monóxido de azoto (DiNapoli *et al.*, 1997; Stephan *et al.*, 1999). Este trabalho teve por objectivo o estudo do efeito desta citocina na produção de NO por células dendríticas da pele. Os resultados obtidos demonstraram que o GM-CSF aumentou a expressão da iNOS e a produção de NO em células dendríticas da epiderme de feto de murganho (figuras 4.1, 4.2 e 4.3) e sugerem que estes aumentos envolveram a activação da JAK2 (tabela 4.1 e figura 4.4) e do factor de transcrição NF- κ B (figuras 4.8 e 4.10).

Os mecanismos de sinalização intracelular que regulam a expressão da iNOS têm sido alvo de intensa investigação e parecem depender do estímulo e do tipo de célula em estudo (Alderton *et al.*, 2001). Diversos trabalhos de investigação referem o envolvimento de diferentes vias de sinalização intracelular, nomeadamente a PKC, as

MAPKs, a PKA, a JAK e de factores de transcrição, como o NF- κ B, AP-1 e STATs, na transcrição do gene *iNOS* (Bogdan, 2001). Células dendríticas derivadas da medula óssea expressam *iNOS* e produzem NO quando estimuladas por LPS e/ou IFN- γ (Lu *et al.*, 1996) e células dendríticas do timo expressam *iNOS* e produzem NO em resposta aos próprios constituintes que funcionam como antigénios (Aiello *et al.*, 2000).

O objectivo do trabalho incluído neste capítulo consistiu no estudo das vias de sinalização intracelular envolvidas na expressão da *iNOS*, em células dendríticas. Os resultados obtidos indicaram que a genisteína inibiu a produção de NO induzida por GM-CSF (tabela 4.1), sugerindo o envolvimento de cinases de resíduos tirosina na regulação da produção de monóxido de azoto nas células FSDC. Estes resultados estão de acordo com os obtidos por outros autores, que observaram, em hepatócitos e em células do músculo esquelético de rato, um efeito inibitório da genisteína na indução da *iNOS* e na produção de NO induzidas por citocinas (Miller *et al.*, 1997; Okuda *et al.*, 1997). O composto SB 203580, inibidor da p38 MAPK, também inibiu a produção de NO estimulada por GM-CSF, contrariamente ao observado com o inibidor da MEK, PD 098059, que demonstrou não exercer qualquer efeito inibitório na produção de NO, excluindo deste modo a participação desta cinase na regulação da *iNOS* pelo GM-CSF nas células FSDC (tabela 4.1). O inibidor da JAK2, tyrphostin B42, foi o composto mais potente na inibição da produção de NO induzida por GM-CSF (tabela 4.1), e os resultados obtidos neste trabalho demonstraram ainda que o efeito inibitório do tyrphostin B42 ocorre numa fase de sinalização intracelular que antecede a indução da expressão da *iNOS* (figura 4.4 B).

As acções biológicas do GM-CSF são mediadas por um receptor formado por uma subunidade α , específica do ligando, e uma subunidade β (β c), comum aos receptores das citocinas GM-CSF, IL-3, e IL-5, sendo as duas subunidades requeridas para uma ligação de alta afinidade do GM-CSF ao receptor (Lopez *et al.*, 1992; Woodcock *et al.*, 1996; Guthridge *et al.*, 1998; Ozaki e Leonard 2002). Apesar de este receptor não ter sido, ainda, estudado nas células FSDC, os nossos resultados revelam claramente que estas células possuem receptores funcionais para o GM-CSF.

A fosforilação de resíduos tirosina na subunidade βc do receptor do GM-CSF é responsável pelos eventos de sinalização intracelular iniciados após ligação desta citocina. Embora este receptor não possua actividade cinásica intrínseca, a ligação do GM-CSF induz a associação da JAK2 à subunidade βc do receptor com a consequente activação desta enzima (Zhao *et al.*, 1995; Paul *et al.*, 1997; Okuda *et al.*, 1999). A activação da JAK2 resulta na sua própria fosforilação e ainda na fosforilação, em resíduos tirosina, da subunidade βc do receptor. A auto-fosforilação da JAK2 e a fosforilação da subunidade βc do receptor resultam no recrutamento de moléculas sinalizadoras intracelulares contendo domínios SH2, nomeadamente os factores de transcrição que existem no citoplasma sob uma forma latente, denominados de transdutores do sinal e activadores da transcrição (STATs). Estas proteínas, nomeadamente o STAT5, são então fosforiladas, num resíduo tirosina, pela JAK2, sendo este evento essencial para a dimerização, migração para o núcleo e ligação ao ADN das STATs (Okuda *et al.*, 1999; Levy e Darnell, 2002). De acordo com este modelo, os nossos resultados mostraram que a JAK2 está envolvida na expressão da iNOS induzida pelo GM-CSF. Outros autores demonstraram também o envolvimento da via de sinalização JAK2/STAT1 na indução da iNOS em células da glia, em macrófagos, em células musculares cardíacas e em células endoteliais de murganho, bem como em células do fígado de murino, em células mesangiais de rato e em linhas celulares epiteliais humanas (Nishiya *et al.*, 1995; Kitamura *et al.*, 1996; Gao *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 1997; Nishiya *et al.*, 1997; Kleinert *et al.*, 1998; Cavicchi e Whittle, 1999; Nakashima *et al.*, 1999; Dell'Albani *et al.*, 2001; Ohmori e Hamilton, 2001; Chen *et al.*, 2002 a). Pelo contrário, em células do músculo liso de rato, a JAK2 inibe a expressão da iNOS estimulada por LPS e IFN- γ (Marrero *et al.*, 1999), e em células mesangiais de murino o STAT3 inibe a transcrição do gene *iNOS* por interacção directa com o factor de transcrição NF- κ B (Yu *et al.*, 2002)

Os resultados obtidos neste trabalho demonstraram que, apesar de a JAK2 ser crucial na expressão da iNOS, o composto SB 203580, inibidor da p38 MAPK, também inibiu a produção de NO estimulada por GM-CSF (tabela 4.1). De facto, além da JAK2

(Zhao *et al.*, 1995; Watanabe *et al.*, 1996; Liu *et al.*, 2000), foi descrito o envolvimento de outras cinases na sinalização intracelular em resposta ao GM-CSF, nomeadamente da p38 MAPK e ERK (Matsuguchi *et al.*, 1998; McLeish *et al.*, 1998; Zu *et al.*, 1998), da PI3K/PKB (Al-Shami *et al.*, 1999; Dijkers *et al.*, 1999) e da JNK (Liu *et al.*, 1997 b). É possível que nas FSDC as duas vias de sinalização, JAK2 e p38 MAPK, cooperem positivamente na produção de NO induzida por GM-CSF. Em macrófagos, a expressão da iNOS é regulada positivamente por uma combinação de factores de transcrição activados por LPS e IFN- β (Jacobs e Ignarro, 2001), e nas células A549 as cinases p38 MAPK e ERK estão envolvidas na activação da transcrição do gene *iNOS* (Kristof *et al.*, 2001).

Uma vez que a região promotora do gene que codifica a proteína iNOS contém 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), investigou-se a activação deste factor de transcrição pelo GM-CSF nas células FSDC. Em células não estimuladas, o NF- κ B é inactivo e localiza-se no citoplasma, onde é sequestrado por uma proteína inibitória, o I κ B. Vários estímulos extracelulares, como o TNF- α , IL-1, agentes mitogénicos e stresse, estimulam vias de sinalização intracelular que activam a cinase do I κ B, responsável pela fosforilação do I κ B. A proteína I κ B uma vez fosforilada é degradada pela via do proteassoma 26S e o NF- κ B livre migra para o núcleo onde inicia a transcrição de genes dependentes deste factor de transcrição, como o gene *iNOS* (Pahl, 1999). Os resultados obtidos neste trabalho demonstraram que o GM-CSF aumentou a fosforilação e degradação do I κ B- α (figura 4.9), promovendo a ligação do NF- κ B livre ao ADN das células FSDC (figura 4.8). Estes resultados sugerem o provável envolvimento do NF- κ B na expressão da iNOS e na produção de NO induzidas pelo GM-CSF nas células FSDC. De facto, o composto PDTC, que inibe a activação do NF- κ B por prevenir a sua dissociação do I κ B (Digicaylioglu e Lipton, 2001), inibiu a expressão da iNOS e a produção de NO estimuladas por GM-CSF (figura 4.10), o que permite concluir que, nas células FSDC,

o GM-CSF activa uma série de eventos intracelulares que culminam com a activação do NF- κ B e com a expressão da iNOS. Outros autores têm também descrito o envolvimento do NF- κ B na expressão da iNOS induzida por vários estímulos e em diversos 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).

A activação do factor de transcrição NF- κ B induzida pelo GM-CSF foi já demonstrada por outros autores. Assim, durante o processo de eritropoiese, o GM-CSF activa o NF- κ B (Zhang *et al.*, 1998), e a diferenciação de células dendríticas a partir de células progenitoras hematopoiéticas estimulada por GM-CSF é mediada pelo NF- κ B (Oyama *et al.*, 1998; Cheng *et al.*, 2001). Em células humanas da medula óssea CD34⁺, o GM-CSF activa o NF- κ B, sendo este factor de transcrição requerido para a funcionalidade e sobrevivência destas células (Pyatt *et al.*, 1999). Nas células FSDC observámos que o GM-CSF activou especificamente as subunidades do NF- κ B p50, p52, RelB, uma vez que apenas estas proteínas sofreram migração para o núcleo (figuras 4.5, 4.6, 4.7). Estudos recentes demonstram que o desenvolvimento e a sobrevivência das células dendríticas envolvem diferentes subunidades do NF- κ B (Ouaaz *et al.*, 2002), pelo que a regulação diferencial das subunidades deste factor de transcrição contribui para a especificidade e selectividade do seu efeito biológico. Estudos efectuados em macrófagos e células dendríticas demonstram claramente a capacidade de o NF- κ B participar na resposta celular mediada por diversas vias de sinalização intracelular, modulando a transcrição de genes alvos de uma forma diferencial (Baltathakis *et al.*, 2001).

O facto de o tyrphostin B42 ter inibido a activação do NF- κ B induzida por GM-CSF (figura 4.8), sugere que a JAK2 participa na via de sinalização do factor de transcrição NF- κ B e que, provavelmente, o tyrphostin B42 inibe a expressão da iNOS e produção de NO nas células FSDC por inibir a activação do NF- κ B. De acordo com estes resultados outros autores verificaram que, em células do fígado, o tyrphostin B42 inibe a transcrição do gene *iNOS* e a activação do NF- κ B induzidas por LPS e IFN- γ

(Lee et al., 1997). No entanto, não foi investigado neste trabalho a que nível ocorre a interacção destas duas vias de sinalização intracelular (JAK2/NF- κ B). Estas vias poderão ser activadas individualmente ou poderão ainda cooperar na regulação da expressão da proteína iNOS. Em neurónios, a activação da JAK2 mediada pelos receptores da eritropoietina induz a activação do NF- κ B (Digicaylioglu e Lipton, 2001) e em células Ba/F3 o GM-CSF activa o NF- κ B por um mecanismo dependente do STAT5 (Nakamura *et al.*, 2002). Em células dendríticas, a expressão do factor regulador do IFN (IRF)-1 é dependente da activação sequencial do NF- κ B e STAT1 (Remoli *et al.*, 2002), e em fibroblastos o NF- κ B e STAT1 cooperam sinergisticamente na activação da transcrição de vários genes (Ohmori et al., 1997). O estudo de Shen e Stavnezer demonstra claramente a cooperação entre as vias de sinalização JAK/STAT e NF- κ B, tendo sido observada a associação directa e sinérgica da proteína STAT6 e do NF- κ B na activação da transcrição induzida por IL-4 (Shen e Stavnezer, 1998).

O tyrphostin B42 inibe a fosforilação, em resíduos tirosina, da JAK2 e consequentemente a sua activação (Meydan *et al.*, 1996). A activação da JAK2 é crucial para a fosforilação de resíduos tirosina na cadeia β do receptor do GM-CSF e para o recrutamento, não só das proteínas STATs, mas de outras moléculas sinalizadoras intracelulares contendo domínios SH2, nomeadamente fosfatases de proteínas, cinases da família src, MAPKs e PI3K (Takaoka *et al.*, 1999; Rane e Reddy, 2000; Levy e Darnell, 2002; O'Shea *et al.*, 2002). Deste modo, nas células FSDC, o tyrphostin B42 poderá inibir o recrutamento das moléculas STAT para a cadeia β do receptor e inibir a sua fosforilação, essencial para a dimerização, migração para o núcleo e ligação ao ADN com a consequente transcrição do gene *iNOS*. Alternativamente, a inibição da activação da JAK2 pelo tyrphostin B42 nas células FSDC poderá impedir a activação de outras vias de sinalização intracelular, nomeadamente a via da Ras/Raf/MAPK e a via da PI3K (Guthridge *et al.*, 1998; Rane e Reddy, 2002), que poderão activar o NF- κ B (Carter *et al.*, 1999; Ozes *et al.*, 1999; Romashkova e Makarov, 1999; Korus *et al.*, 2002) e induzir a expressão da iNOS

(Chen e Wang, 1999; Kristof *et al.*, 2001; Bhat *et al.*, 2002; Hirafugi *et al.*, 2002; Tan *et al.*, 2002).

Em resumo, a citocina epidérmica GM-CSF, que se sabe estar envolvida na diferenciação e maturação das DC, aumentou a expressão da iNOS e a produção de NO nas células FSDC, por mecanismos de sinalização intracelular que envolveram a activação da JAK2 e do factor de transcrição NF- κ B.

O NO produzido pelas DC é parcialmente responsável pelas propriedades anti-tumorais destas células (Shimamura *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2002) e modula a apresentação de antigénios aos linfócitos T (Lu *et al.*, 1996; Aiello *et al.*, 2000; Paolucci *et al.*, 2000; Hoffman *et al.*, 2002). Estes estudos demonstram que as funções das células dendríticas poderão ser parcialmente afectadas pelo monóxido de azoto. Deste modo, o conhecimento dos mecanismos de sinalização intracelular activados pelo GM-CSF e envolvidos na expressão da iNOS poderá ser útil no delinear de estratégias terapêuticas que visam a utilização das DC como adjuvantes da imunização.