

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

Priscilla Coscia Severino

Influência da lipoproteína de baixa densidade e papel dos receptores de adenosina na modulação de ativação de monócitos/macrófagos por ácido lipoteicóico.

Porto Alegre 2009

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

Priscilla Coscia Severino

Influência da lipoproteína de baixa densidade e papel dos receptores de adenosina na modulação de ativação de monócitos/macrófagos por ácido lipotecóico.

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado à Universidade Federal do Rio Grande Do Sul, como requisito parcial para obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas – ênfase molecular, celular e funcional.

Orientadora: Professora Dra. Elena Aida Bernard

Porto Alegre, 2009

Priscilla Coscia Severino

Influência da lipoproteína de baixa densidade e papel dos receptores de adenosina na modulação de ativação de monócitos/macrófagos por ácido lipotecóico.

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado à Universidade Federal do Rio Grande Do Sul, como requisito parcial para obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas submetida à aprovação da banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Profa. Dra. Elena Aida Bernard

Dr. Luiz Fernando de Souza

Profa. Dra. Fátima Costa Rodrigues Guma

Porto Alegre, de de 2009

“O importante é como você procura realizar suas metas. Isto vai determinar sua qualidade de vida. Quando o indivíduo tem compromisso com sua essência, a vida não se torna um fardo pesado de carregar “.
(Shinyashiki)

INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS

Este trabalho desenvolveu-se no laboratório de resposta inflamatória e transdução de sinais, coordenado pela Prof.^a Dra. Elena Aida Bernard, no Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Ele contou com o apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora, que me acolheu no laboratório, por todo apoio e preocupação com o andamento do trabalho.

Agradeço ao Luiz, que me ajudou muito na realização desse trabalho, que pude contar para tudo, qualquer dúvida ou dificuldade.

Á toda minha família, e principalmente à minha mãe, minha eterna incentivadora, a quem dedico esse trabalho, por sempre acreditar em mim.

RESUMO

O ácido lipoteicóico (LTA) é o componente majoritário da parede celular de bactérias gram-positivas, e a ligação destas moléculas a receptores existentes nas células do sistema imune inato inicia as respostas imunológicas às infecções bacterianas, como produção de óxido nítrico (NO), espécies reativas de oxigênio (ROS) e citocinas. Aterosclerose é um processo inflamatório crônico, e sabe-se que a captação excessiva de LDL modificada, por macrófagos, causa a transformação destas células em células "espumosas", as quais participam na formação das placas ateroscleróticas. Em diversos estudos, é relatado a importância da adenosina como um potente agente imunomodulatório e é descrito que a ativação de A2aR promove um mecanismo de defesa contra a aterosclerose, inibindo a formação de células espumosas. Nosso laboratório demonstrou que em macrófagos RAW 264.7 pré-tratados com LDL a resposta ao LTA é reduzida, com diminuição da secreção de NO, TNF- α e MMP-9. Além disso, quando pré-tratados com um agonista não seletivo de receptores de adenosina, NECA, a produção de NO e ROS e MMP-9 é diminuída. Este trabalho teve como objetivo fazer um estudo comparativo da resposta ao LTA da linhagem de macrófagos RAW 264.7 com a da linhagem monocítica WEHI-3, investigando o efeito de LDL e NECA sobre a ação do LTA na produção de NO e ROS. Nossos resultados mostraram que as células WEHI-3 são menos sensíveis ao LTA que as RAW 264.7 considerando o estímulo na produção de NO, ademais não causa nenhum efeito na produção de ROS. Diferentemente do que ocorre nas células RAW 264.7, LDL potencializou o efeito de LTA na produção de NO nas células WEHI-3, sem modificar a produção de ROS. O agonista NECA não causou nenhum efeito na produção de NO, ROS, nem sobre o estímulo causado por LDL na ação do LTA. Isso sugere que LTA, LDL e adenosina podem utilizar outras vias de sinalização na linhagem WEHI-3.

ABSTRACT

Lipoteichoic acid (LTA) is the major component of gram-positive bacteria cell wall, and the binding of these molecules to receptors on the innate immune system cells initiates immune responses to bacterial infections, such as nitric oxide (NO), reactive oxygen species (ROS) and cytokines production. Atherosclerosis is a chronic inflammatory process, and it is known that uptake of modified LDL by macrophages, causes foam cells formation, which participate in the atherosclerotic plaques formation. In several studies is reported the importance of adenosine as a potent immunomodulatory agent and is described that activation of A₂aR promotes a defense mechanism against atherosclerosis by inhibiting the foam cells formation. Our laboratory found that in macrophages RAW 264.7 pretreated with LDL, the inflammatory response is reduced, with lower levels of NO, TNF- α and MMP-9 production. Moreover, when the cells were pre-treated with a nonselective agonist of adenosine receptors, NECA, the NO, ROS and MMP-9 production is decreased. This study aimed to do a comparative study of the immune response of the macrophage cell line RAW 264.7 with a monocytic cell line WEHI-3, investigating the effect of LDL and NECA on the action of LTA in NO and ROS production. Our results showed that WEHI-3 cells are less sensitive to LTA than RAW 264.7 on the stimulation of NO production, and there is no effect on ROS production. Contrary to what occurs in RAW 264.7, LDL enhanced the effect of LTA in NO production in WEHI-3 without alter ROS production. NECA also caused no effect on NO and ROS production, neither on the stimulus caused by LDL in the action of LTA. This suggests that LTA, LDL and adenosine can follow another signaling pathway in WEHI-3 cell line.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Produção de óxido nítrico em células WEHI-3 estimuladas com LTA.....	26
Figura 2. Influência de LDL na produção de óxido nítrico em células WEHI-3 estimuladas com LTA.....	27
Figura 3. Influência de LDL na produção de ROS em células WEHI-3 estimuladas com LTA.....	28
Figura 4 . Papel dos receptores de adenosina na produção de ROS em células WEHI-3 estimuladas com LTA.....	29
Figura 5. Papel dos receptores de adenosina na produção de óxido nítrico em células WEHI-3 estimuladas com LTA.	30
Figura 6. Papel dos receptores de adenosina na produção de óxido nítrico em células WEHI-3 estimuladas com LTA.e pré-tratadas com LDL	31

LISTA DE ABREVIATURAS

- ADP – Adenosina difosfato
- AMP – Adenosina monofosfato
- APO B100 - Apolipoproteína B100
- ATP – Adenosina trifosfato
- CD36 –Receptor *scavenger* de LDL
- CD39 - Ecto-nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase
- CD73 – Ecto-5'-nucleotidase
- DCFH-DA - 2',7'-diclorofluoresceína diacetato
- eNOS – Óxido nítrico sintase endotelial
- ERK – Quinases reguladas por sinais extracelulares
- HDL – Lipoproteína de alta densidade
- INF- γ – Interferon gama
- IL-6 – Interleucina 6
- IL-10 – Interleucina 10
- IL-8 – Interleucina 8
- IL-1 β – Interleucina 1beta
- iNOS- Óxido nítrico sintase induzível
- JNK - Jun N-terminal quinase
- LDL – Lipoproteína de baixa densidade
- LPS – Lipopolissacarídeo
- LTA – Ácido lipoteicóico
- MMP-9 –Metaloproteinase 9 de matriz extracelular
- MIP-2 - proteína inflamatória macrofágica 2

MCP-1 - Proteína quimiotática de monócitos-1

NADPH oxidase - nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato-oxidase

NECA - N-Etilcarboxamidoadenosina

NF-kB – Fator nuclear kappa-B

nNOS- Óxido nítrico sintase neuronal

NO – Óxido nítrico

NOS – Óxido nítrico sintase

P53 – Proteína 53

PEG – Peptideoglicano

PPAR- α – Receptor ativado por proliferadores de peroxissoma alfa

PRR – Receptores de reconhecimento de padrões

RCT – Transporte reverso do colesterol

ROS – Espécies reativas de oxigênio

RNOS – Espécies reativas de nitrogênio

TNF- α - Fator de necrose tumoral alfa

TNFR – Receptor de fator de necrose tumoral

TGF- β – Fator transformador de crescimento beta

TLR – Receptores Toll-like

SR-A – Receptores scavenger classe A

SUMÁRIO

1. Introdução	12
1.1 Macrófagos: papel no sistema imunológico	12
1.2 Lipoproteína de baixa densidade	14
1.3 Adenosina	16
1.4 Espécies reativas de oxigênio	18
1.5 Óxido nítrico	19
1.6 Citocinas	20
2. Objetivos	22
3. Materiais e métodos	24
3.1 Reagentes.....	24
3.2 Cultura celular.....	24
3.3 Número de amostras.....	24
3.4 Produção de ROS	25
3.5 Produção de óxido nítrico.....	25
3.6 Análise estatística.....	26
4. Resultados	27
5. Discussão	33
6. Referências bibliográficas	37

1 INTRODUÇÃO

1.1 Macrófagos: papel no sistema imunológico.

Macrófagos são células do sistema imune que desempenham um importante papel na defesa do hospedeiro contra substâncias nocivas e estão envolvidos em uma variedade de processos de doenças, incluindo doenças auto-imunes, infecções e perturbações inflamatórias (BAI et al., 2005).

A principal função dos macrófagos é a fagocitose e o combate a microorganismos invasores. (LANGERMANS et al., 1994) As células derivadas da linhagem de monócitos/macrófagos são, juntamente com os granulócitos, os tipos de leucócitos que mais rapidamente chegam aos tecidos invadidos por patógenos. Uma vez localizados no sítio de infecção, os macrófagos fagocitam os organismos infecciosos, atuando como células apresentadoras de antígenos, e secretando um grande número de produtos imunoregulatórios (VERDRENGH e TARKOWSKI, 2000).

A ativação dos macrófagos pode ocorrer por componentes de paredes bacterianas, sendo estes descritos como os principais antígenos responsáveis pela ativação da resposta imunológica. (VAN AMERSFOORT et al., 2003). Nas bactérias gram-negativas, o lipopolissacarídeo (LPS), componente majoritário da parede externa, é o principal antígeno, enquanto que nas bactérias gram-positivas, os principais antígenos são o ácido lipoteicóico (LTA) e peptídeoglicanos (PEG). A ligação destas moléculas a receptores de reconhecimento de padrões (*Pattern Recognition Receptors*, PRRs) existentes nas células do sistema imune inato inicia as respostas imunológicas às infecções bacterianas (TAKEUCHI e AKIRA, 2001; MEDZHITOV, 2007). Receptores na membrana das células, chamados Toll-like receptors (TLRs), são os principais receptores participantes

dessa resposta imune, sendo que no caso das bactérias gram-negativas, TLR4 é o principal receptor, e no caso das gram-positivas, é o TLR2 (SEO et al, 2008).

Sabe-se que LPS induz uma variedade de respostas a infecções severas, como inflamação local e choque séptico. Macrófagos respondem a LPS desempenhando um importante papel na defesa do organismo, mas quando estas defesas estão exacerbadas os macrófagos liberam quantidades elevadas de mediadores pró - inflamatórios como as interleucinas, TNF- α , superóxidos e óxido nítrico, perturbando a função celular normal. (ZHOU et al, 2006).

O choque séptico é, atualmente, a causa mais comum de morte nas unidades de cuidados intensivos, estando associado com inflamação sistêmica, falha circulatória e síndrome de disfunção múltipla de órgãos (PARILLO, 1993; ALTURA, 1983). A sepse bacteriana e o choque séptico resultam da superprodução de mediadores inflamatórios como consequência da interação do sistema imune com bactérias e constituintes da parede bacteriana no corpo. Nas últimas décadas, a contribuição das bactérias gram-positivas na sepse tem aumentado, sendo que na década de 90, contou com mais de 50% de casos de septicemia, com *S. aureus* e *S. epidermidis* como responsáveis dos casos de sepse com microorganismos gram-positivos (VAN AMERSFOORT et al, 2003).

O PEG e o LTA são descritos como responsáveis pela produção de óxido nítrico (NO), choque séptico e falência múltipla de órgãos provocados por infecções com *S. aureus* (DE KIMPE et al., 1995; KENGATHARAN et al., 1998). LTA também é descrito como o principal responsável pela produção de TNF- α por macrófagos expostos a bactérias gram-positivas (SEO et al., 2008), além de estimular a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) em monócitos humanos (LEVY et al., 1990).

1.2 Lipoproteína de baixa densidade e aterosclerose

A aterosclerose é uma das maiores causas de morte cardiovascular, e afeta aproximadamente 16.7 milhões de pessoas no mundo a cada ano. Essa doença é um processo inflamatório crônico caracterizado pela formação de placas na camada íntima da parede arterial, levando progressivamente à diminuição do diâmetro desses vasos, podendo chegar até a obstrução total dos mesmos. Essas placas estão formadas por células “espumosas” e células imunes, além de células endoteliais vasculares, células musculares lisas, plaquetas e matriz extracelular, evidenciando o envolvimento do sistema imune inato e adaptativo na aterosclerose. (ELENA e KLAUS, 2007)

Em relação com a aterosclerose, sabe-se que a captação excessiva de lipoproteínas de baixa densidade (LDLs) modificadas, por macrófagos, causa a transformação destas células em células "espumosas", as quais participam na formação das placas ateroscleróticas. A modificação oxidativa de LDL está assim implicada na aterogênese, já que esta conversão da LDL permite que seja reconhecida por receptores “scavengers” ou receptores de LDL oxidado.

O colesterol é captado pelas células a partir de receptores para lipoproteínas, presentes na superfície celular. O receptor de colesterol mais bem conhecido é o receptor de LDL (*LDL receptor*), que reconhece Apo B-100. Outros receptores de enorme importância em macrófagos são os receptores “*scavenger*”, como SR-A1 e CD36, responsáveis por ligar vários tipos de moléculas, incluindo partículas de LDL e de LDL oxidada. (ABRASS, 2004)

Sob condições de estresse oxidativo, os macrófagos podem gerar espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (RNOS), aumentando a produção e liberação de íons superóxido, levando assim a uma extensiva oxidação da LDL. Este processo de oxidação

pode ocorrer também pela ação da enzima mieloperoxidase (PODREZ et al. 1999), assim como por reação com metais como o Cu^{2+} . (HEINECKE, 1997).

A modificação oxidativa de LDL pode estar associada com alterações na produção de óxido nítrico vascular. Estudos mostram que LDL modificada é capaz de reduzir a produção de óxido nítrico em macrófagos, acompanhada pela inibição da expressão de iNOS, diminuindo assim a biodisponibilidade de NO e seus efeitos antiterogênicos (SCHMID et al, 2008).

Está descrito que em macrófagos, a indução da expressão e secreção de TNF- α e IL-6, por LPS, são aumentadas enquanto a expressão e secreção de IL-10 é diminuída por pré-incubação com LDL oxidada. (GROENEWEG et al, 2006). É descrito também que LDL minimamente modificada induz a expressão de citocinas pró-inflamatórias, como MIP-2, MCP-1, TNF- α e IL-6, através da ativação de vias de sinalização dependentes e independentes de TLR 4. (MILLER et al, 2005).

Incubações de macrófagos com baixas concentrações de LDL oxidada protegem as células de apoptose e induzem a proliferação celular. Em contraste, altas concentrações e longas incubações induzem a morte celular. É descrito que efeitos da LDL oxidada dependem da intensidade da oxidação do LDL e da quantidade de LDL oxidado aplicado nas células, baixas concentrações tendem a aumentar a resposta inflamatória dos macrófagos após ativação, enquanto que as concentrações mais elevadas podem reprimir a resposta inflamatória. (GROENEWEG et al, 2006)

Foi verificado em nosso laboratório que na linhagem de macrófagos RAW 264.7, o pré-tratamento com LDL reduz as respostas inflamatórias, resultando em menores níveis de produção de NO, secreção de TNF- α e MMP-9 (SAUTER et al. 2008).

1.3 Adenosina

A adenosina extracelular é um nucleosídeo de purina envolvido na regulação de diversos processos celulares. Diversos estudos mostram ações antiinflamatórias dos receptores de adenosina em macrófagos e monócitos, em modelos de infecção por bactérias gram-negativas. A classe de receptores de adenosina pode ser dividida em quatro subtipos de receptores que são encontrados em diferentes tipos de células e tecidos de mamíferos: A1, A2a, A2b e A3. Os receptores de adenosina fazem parte da família dos receptores metabotrópicos associados a proteínas G, sendo que os receptores A1 e A3 estão associados à proteínas G inibitórias, e os receptores A2a e A2b, à proteínas G estimulatórias (FREDHOLM et al. 2000).

Em diversos estudos, é relatada a importância da adenosina como um potente agente imunomodulatório e neuroprotetor, e agonistas e antagonistas destes receptores têm sido explorados como potenciais agentes terapêuticos para isquemia, doença de Parkinson, e inflamação (RIEGER et al. 2001).

A ativação de A2aR promove um mecanismo de defesa contra a aterosclerose, estimulando a expressão de proteínas envolvidas no transporte de colesterol modificado (RCT), um importante mecanismo de proteção contra a sobrecarga de colesterol, e inibindo a formação de células espumosas e a consequente formação de placas ateroscleróticas (REISS et al, 2004)

Em macrófagos, a adenosina suprime a produção de TNF- α estimulada por LPS, presumivelmente através da ativação de A2aR ou de A3R (HASKO et al., 1996). Agonistas seletivos do receptor A2a também inibem várias manifestações da ativação de células inflamatórias, incluindo geração de superóxidos, produção de citocinas e a expressão de moléculas de adesão (LAPPAS et al., 2005).

Em nosso laboratório foi estudada a produção de NO pela linhagem de macrófagos RAW 264.7 estimulada por LTA e se encontrou que está relacionada com a produção de ROS. Além disso, a pré-incubação com um agonista não seletivo de receptores de adenosina, NECA, reduziu a produção de NO e ROS.(DE SOUZA et al.2009)

A incubação dos macrófagos RAW 264.7 com LTA aumenta a secreção e a expressão da metaloproteinase da matriz extracelular MMP 9. A pré-incubação com antagonistas seletivos dos receptores A2a e A2b aumenta a atividade desta enzima em condições basais, e incrementa o estímulo causado por LTA. Já a adição de NECA diminuiu este estímulo. Estes resultados sugerem que o efeito estimulador do LTA sobre a MMP-9 é modulado pela ação dos receptores de adenosina. (DE SOUZA et al, 2009)

A adenosina extracelular aumenta em resposta ao estresse metabólico e dano celular, e este aumento ocorrem em condições de isquemia, hipóxia, inflamação e trauma. A adenosina extracelular pode ser gerada pela degradação de ATP, ADP, e AMP extracelulares, por uma cascata de ectonucleotidases, incluindo CD39 e CD73, assim como pela liberação de adenosina intracelular através de transportadores de nucleosídeos, quando os níveis intracelulares desta aumentam devido à degradação de ATP, em condições isquêmicas. A biodisponibilidade de adenosina é limitada pelo seu catabolismo a inosina, pela enzima adenosina deaminase (HASKO e PACHER, 2008).

Sabe-se que adenosina e o ATP, extracelulares, possuem papéis antagônicos na inflamação, de modo que o ATP apresenta efeitos pró-inflamatórios, enquanto a adenosina apresenta efeitos antiinflamatórios sendo que ambos são encontrados em níveis elevados nos locais de inflamação. Deste modo, o metabolismo extracelular das purinas pode atuar na modulação de efeitos pró e antiinflamatórios (BOURS et al., 2006).

1.4 Espécies reativas de oxigênio

A geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) em células inflamatórias como neutrófilos e macrófagos são essenciais para a defesa do organismo, porém sua produção excessiva está implicada em uma variedade de doenças, como Alzheimer, câncer e aterosclerose. (TEISSIER et.al, 2004)

ROS atuam como moléculas sinalizadoras intracelulares, regulando fatores de transcrição envolvidos na resposta inflamatória, como o NF-kB (FORMAN e TORRES, 2002). ROS também induzem alterações significativas nos perfis de expressão gênica, incluindo a estimulação da expressão de genes relacionados com o estresse, sobrevivência e apoptose e a inibição de genes que promovem o crescimento e ciclo celular. Assim, em macrófagos tratados com H₂O₂, muitas vias de sinalização envolvidas no processo de apoptose e sobrevivência são ativados, incluindo p53, Akt, NF-kB, ERK e JNK. (ZHANG et al, 2005)

A ativação do receptor P2X₇, para ATP, medeia a produção de ROS e conseqüente fosforilação de JNK (PFEIFFER et al, 2007). A produção de ROS também é aumentada pela ativação do receptor nuclear PPAR- α e em macrófagos estimulados com LPS, via complexo NADPH oxidase. (TEISSIER et al, 2004; BAI et al, 2005)

Em macrófagos expostos a LPS, a produção de ROS participa do controle da expressão e secreção de citocinas pró-inflamatórias como o TNF- α (KIMURA et al., 2008), IL- 8 (RYAN et al., 2004) e IL-1 β (HSU e WEN, 2002).

Assim, a produção de níveis elevados de ROS, em resposta a infecções bacterianas, contribui para as complicações associadas com a resposta inflamatória, incluindo o choque séptico e a falência múltipla de órgãos (ANDRADES et al., 2005; VICTOR et al., 2005)

1.5 Óxido nítrico

O óxido nítrico (NO) é um radical de nitrogênio altamente reativo e difusível, envolvido na regulação de diversos processos biológicos. Ele possui efeitos citotóxicos e citotásticos, que são benéficos na defesa contra organismos patogênicos. (PAUKKERI et al, 2007)

Os efeitos citotóxicos podem resultar de reações envolvendo NO e superóxido (O_2^-), tais como a peroxidação lipídica, através do peroxinitrito ($ONOO^-$), um intermediário na reação de NO com ROS. Muitas células, como macrófagos ativados, produzem NO, que possui vida meia muito curta, e é convertido a seu metabolito estável nitrito (NO_2^-), este por reações com superóxido ou grupo heme de proteínas forma nitrato (NO_3^-) (LEWIS et al, 1995)

Nos mamíferos, a formação de NO é regulada por uma família de enzimas, conhecidas como óxido nítrico sintases (NOS). Assim, o NO é sintetizado a partir da conversão da L-arginina a L-citrulina, utilizando NADPH e O_2 como co-substratos. Duas maiores classes de NOS tem sido descritas baseadas em sua expressão e regulação, as formas constitutivas presentes em neurônios (nNOS) e em células endoteliais (eNOS) e a forma induzível (iNOS), presente em macrófagos e outras células, e que é regulada por LPS ou por citocinas pró-inflamatórias (KAO et al, 2005).

Nas células do sistema imune, esta enzima é responsável pela produção de NO em resposta a estímulos pró-inflamatórios, participando de múltiplos processos biológicos, incluindo regulação do tônus vascular, adesão de plaquetas e leucócitos, vasodilatação, além da ação citotóxica dos macrófagos contra micróbios e células tumorais (VAN AMERSFOORT et al., 2003). Entretanto, a produção exagerada de NO pela iNOS está envolvida no choque hemodinâmico presente na sepse, além de participar de efeitos

deletérios oriundos de uma intensa resposta inflamatória (VINCENT et al., 2000; KORHONEN et al., 2005).

1.6 Citocinas

As citocinas que são produzidas durante processos inflamatórios, e que neles participam, são estimuladores da produção de proteínas presentes na fase aguda da inflamação. As citocinas pró-inflamatórias incluem IL-6, IL-1 β , TNF- α , interferon- γ , TGF- β e, possivelmente, IL-8 . Elas são produzidas por uma variedade de tipos de células, mas as fontes mais importantes são os macrófagos e monócitos nos locais de inflamação. (GABAY, 2006)

O fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) é uma citocina envolvida na regulação de diversos processos fisiológicos e patológicos. Esta citocina pode atuar através da ligação em dois receptores distintos, o TNFR 1 (ou p55) e o TNFR 2 (ou p75), os quais atuam como homotrímeros. A sinalização dos receptores do TNF- α ocorre através da interação com diferentes proteínas adaptadoras citosólicas. Estas, de acordo com o tipo celular, irão desencadear distintas cascatas de sinalização, relacionadas com o controle de processos celulares como ativação inflamatória, proliferação e morte (MAC EWAN, 2002).

O TNF- α possui grande importância durante a fase aguda da resposta inflamatória a agentes patogênicos, estimulando alterações fisiológicas que contribuem para: a eliminação dos agentes infecciosos, o controle do dano tecidual e a ativação de processos de reparação. No entanto, níveis elevados de TNF- α estão associados com efeitos deletérios presentes em infecções sistêmicas (sepse) e caquexia (HEHLGANS e PFEFFER, 2005).

A interleucina-6 (IL-6) é produzida no local da inflamação e desempenha um papel chave na resposta da fase aguda da inflamação, definida como uma variedade de características clínicas e biológicas. Além disso, IL-6 exerce efeitos estimulatórios sobre as células T e B, favorecendo a resposta inflamatória crônica. (GABAY, 2006)

A citocina antiinflamatória mais produzida por macrófagos é a IL-10. IL-10 pode ser considerado um agente importante na resolução da inflamação. Originalmente chamado "fator de inibição da síntese de citocinas" por sua capacidade de inibir a secreção de IFN- γ e IL-2 em células Th2, esta citocina é secretada por monócitos, macrófagos, mastócitos, linfócitos T e B e células dendríticas (DCs). IL-10 é conhecido também como um supressor da produção de óxido nítrico. (OGAWA et al, 2008)

É descrito que IL-10 inibe a ativação de macrófagos através de mecanismos autócrinos. Além disso, IL-10 tem se mostrado importante na aterosclerose, onde um modelo de rato "IL-10 knockout" mostra uma aterosclerose muito aumentada. (GROENEWEG et al, 2006)

2. OBJETIVOS

A maior parte dos estudos científicos tem focado a resposta das células imunes a infecções por bactérias gram-negativas ou ao seu principal antígeno, o LPS. Os estudos sobre a resposta de células imunes a infecções por bactérias gram-positivas e seus respectivos antígenos, LTA e PEG, existem em um número muito menor.

Encontramos poucos trabalhos científicos que utilizam a linhagem monocítica WEHI-3 em modelos de infecção por bactérias gram-negativas, e apenas um que utiliza esta linhagem para estudo de infecção por bactérias gram-positivas.

Considerando que a linhagem de monócitos WEHI-3 possui um fenótipo não diferenciado, o objetivo principal deste trabalho é fazer um estudo comparativo da resposta imune destas células, utilizando o principal antígeno de bactérias gram-positivas, LTA, com a da linhagem diferenciada em macrófagos, RAW 264.7, células estas, com as quais já trabalhamos há algum tempo em modelos de infecções por bactérias gram-positivas.

Sendo assim, este trabalho tem como objetivos específicos:

1. Estudar a produção de óxido nítrico na linhagem celular WEHI-3 estimuladas pelo antígeno de *S. aureus* ácido lipoteicóico (LTA), em condições livres de soro ou não.
2. Verificar a possível alteração nos níveis de NO produzidos pela linhagem celular WEHI-3 pré- incubadas com LDL e estimuladas com LTA.
3. Estudar a produção de ROS em células WEHI-3 estimuladas com LTA e pré- incubadas com LDL.
4. Verificar o papel dos receptores de adenosina na produção de óxido nítrico e ROS nas células WEHI-3 estimuladas com LTA

5. Verificar o papel dos receptores de adenosina na produção de óxido nítrico nas células WEHI-3 pré-incubadas com LDL e estimuladas com LTA.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Reagentes

O ácido lipoteicóico de *Staphylococcus aureus* foi adquirido de InvivoGen (San Diego, EUA). RPMI 1640 e fungizone, foram comprados de Gibco™ (Invitrogen, Carlsbad, EUA). O soro fetal bovino foi comprado de Cultilab (Campinas, Brasil). 5'-N-ethylcarboxamido adenosina (NECA) foi adquirido da Tocris Bioscience (Ellisville, E.U.A.) A lipoproteína de baixa densidade foi adquirida de Calbiochem. 7'-diacetato diclorofluoresceína foi adquirido da Sigma (Saint Louis, E.U.A.). Todos os outros reagentes foram de pureza pro-analisis.

3.2 Cultura celular

Foi utilizada a linhagem celular WEHI-3, uma linhagem leucêmica, monocítica de camundongo. As células foram mantidas em suspensão em meio RPMI 1640, 10% soro fetal bovino. Para os experimentos, as células foram plaqueadas com meio RPMI sem SFB e incubadas com ou sem LTA nos tempos indicados nas figuras. Nas pré-incubações com LDL ou agonista de receptores de adenosina, estes foram adicionados antes de LTA.

3.3 Número de amostras

Os experimentos foram realizados em quadruplicatas, com ao menos três repetições independentes, utilizando subculturas diferentes.

3.4 Produção de ROS

Espécies reativas de oxigênio foram analisadas medindo a oxidação de 2',7'-diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA). A linhagem monocítica WEHI-3 foi plaqueada em 8×10^4 células/poço em uma placa de 96 poços e incubada com DCFH-DA ($10 \mu\text{M}$) por 15 minutos a 37°C . No final da incubação, os tratamentos foram adicionados. Nos experimentos com LDL, houve uma pré-incubação com essa lipoproteína por 24 horas. A taxa de oxidação de DCFH-DA foi analisada em um fluorímetro de microplacas, a 37°C , com longitude de onda de excitação de 485nm e emissão de 535nm.

3.5 Produção de óxido nítrico

A produção do óxido nítrico (NO) foi determinada pela quantificação do produto estável da oxidação de NO – nitrito (NO_2^-). Resumidamente, as células foram plaqueadas com $0,5 \times 10^6$ células por poço em placas de 24 poços. Nos experimentos com LDL, as células foram incubadas por 36 horas com LDL, sendo que nas últimas 24 horas, se adicionou LTA. Nos experimentos com NECA, as células foram incubadas por 24 horas com NECA e LTA, sendo que NECA foi adicionado 15 minutos antes de LTA. Depois do término da incubação, o meio foi coletado e incubado na proporção de 1:1 com o reagente de Griess (1:1 0,1% naftil-etilenediamina e 1% sulfanilamida em 5% de ácido fosfórico) por 15 minutos. O conteúdo de nitrito foi medido em espectrofotômetro em uma absorbância de 540 nm. A concentração de nitrito nas amostras foi calculada usando uma curva padrão de NaNO_2 .

3.7 Análise estatística

Os resultados são expressos como média + SEM. As diferenças entre as médias foram analisadas por ANOVA com o Student-Newman-Keuls para comparações múltiplas.

A significância estatística foi definida como $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 Produção de óxido nítrico em células WEHI-3 estimuladas com LTA.

As células WEHI-3 foram incubadas com diferentes concentrações de LTA, em meio livre de soro ou em meio com 1% de SFB. Pudemos observar um aumento significativo na produção de óxido nítrico pelas células em meio livre de soro apenas em altas concentrações de LTA, como 20µg/ml, e de maneira dose dependente (fig. 1). Nas células tratadas em meio com SFB, as células se tornam ainda menos sensíveis, e podemos ver um pequeno aumento na produção de óxido nítrico apenas quando tratadas com LTA em uma concentração a partir de 50 µg/ml.(fig. 1)

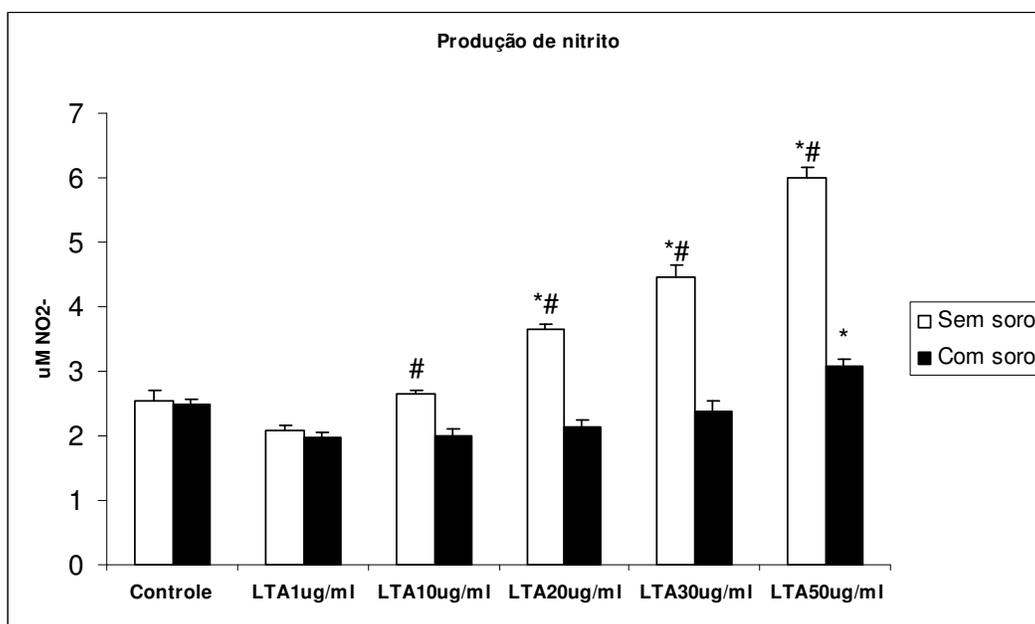


Figura 1: Produção de óxido nítrico em células WEHI-3 estimuladas com LTA. As células foram incubadas em meio livre de soro, ou em meio com 1%SFB com diferentes concentrações de LTA, por 24 horas. Os valores são expressos como concentração de NO₂⁻ (µM) e representam a média ± SEM (n=4). *p< 0,05 versus controle, #p<0,05 comparado com a resposta a LTA com soro. ANOVA/S.N.K.

4.2 Influência de LDL na produção de óxido nítrico em células WEHI-3 estimuladas com LTA.

As células foram incubadas por 36 horas com LDL em diferentes concentrações, e depois estimuladas com LTA nas últimas 24 horas. Os resultados mostraram que a adição de LDL, nas concentrações 10 ou 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, não altera a produção de óxido nítrico na linhagem células WEHI-3. A adição de LTA (30 $\mu\text{g}/\text{mL}$) estimulou a produção de NO e este efeito foi aumentado pela LDL (fig. 2). Assim, as células quando pré-incubadas com essa lipoproteína, em ambas as concentrações, aumentaram a ação do LTA na produção de NO, sendo este aumento de maneira dose dependente.

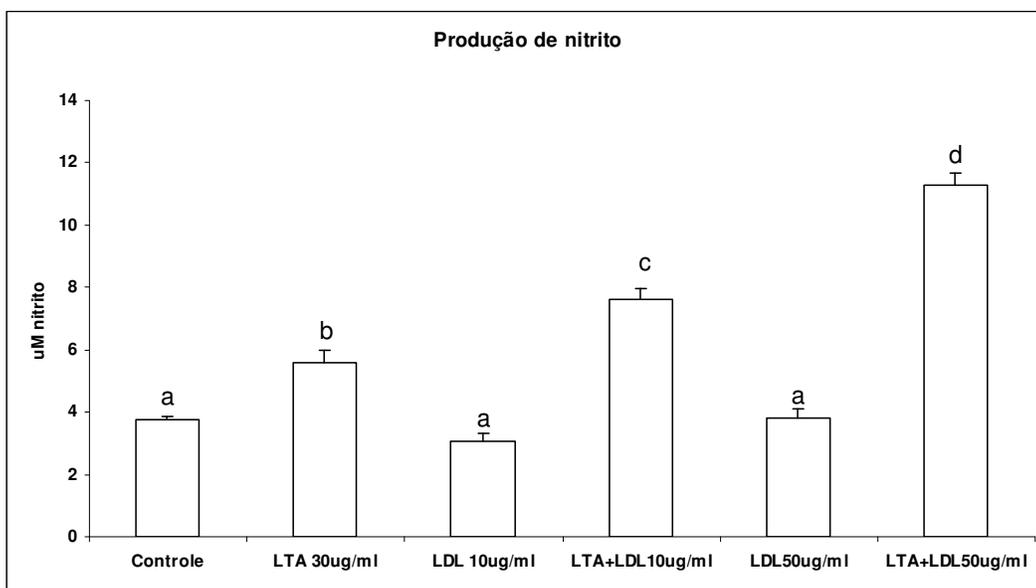


Figura 2. Influência de LDL na produção de óxido nítrico em células WEHI-3 estimuladas com LTA. As células foram incubadas com LDL (10 ou 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) por 36 horas e estimuladas nas últimas 24 horas com LTA (30 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Os valores são expressos como NO₂⁻ (μM) e representam a média \pm SEM (n=4). Letras diferentes significam grupos estatisticamente diferentes. ANOVA/ S.N.K , p>0,05.

4.3 Influência de LDL na produção de ROS em células WEHI-3 estimuladas com LTA.

As células foram pré-tratadas com LDL durante 24 horas, seguidos por 15 minutos de incubação com DCFH-DA. Ao final da incubação, LTA foi adicionado e a oxidação do DCFH-DA analisada por 1 hora em um fluorímetro de microplacas a 37°C. Os resultados mostram que nem LTA (30µg/ml) nem LDL (10 ou 50 µg/ml) modificaram a produção de ROS.(fig. 3)

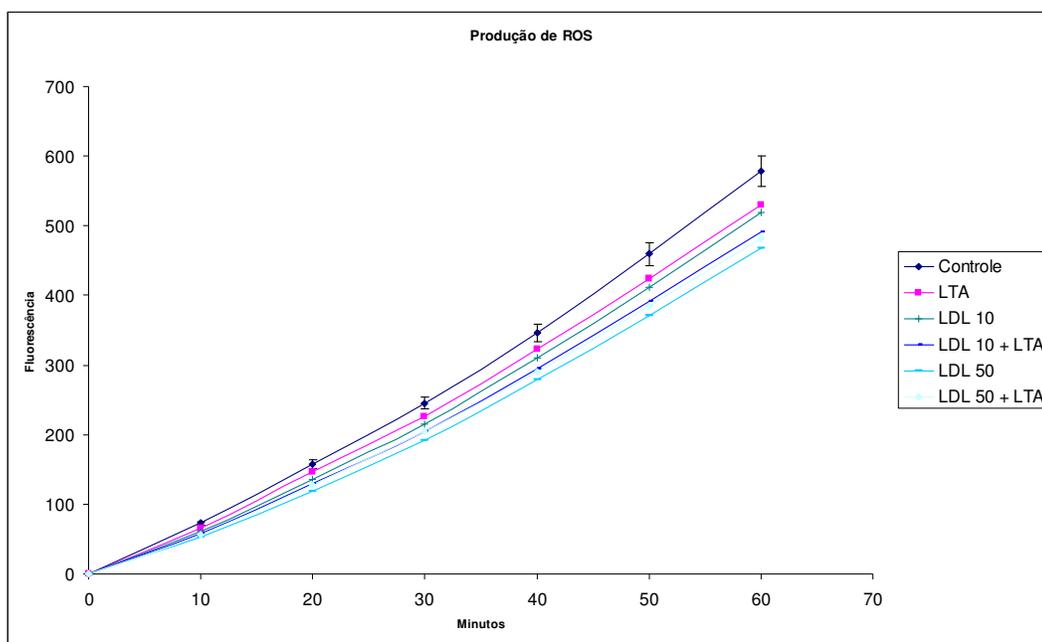


Figura 3. Influência de LDL na produção de ROS em células WEHI-3 estimuladas com LTA. As células foram pré-incubadas com LDL por 24 horas. Adicionou-se DCFH-DA por 15 minutos, e ao final da incubação, LTA foi adicionado e a oxidação do DCFH-DA analisada por 1 hora em um fluorímetro de microplacas a 37°C. ANOVA/ S.N.K , $p > 0,05$.

4.4 Papel dos receptores de adenosina na produção de ROS em células WEHI-3 estimuladas com LTA

Assim como a adição de LTA não modificou a produção de ROS pelas células WEHI 3, os resultados mostram que a produção de ROS tampouco foi alterada por NECA, um agonista não seletivo de receptores de adenosina (fig.4).

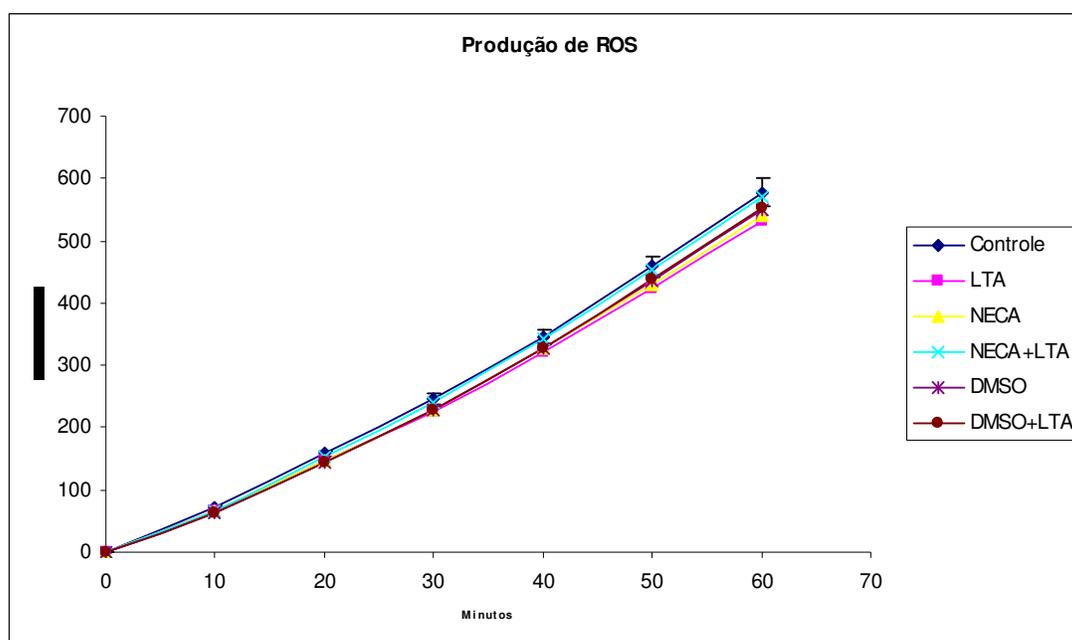


Figura 4 .Papel dos receptores de adenosina na produção de ROS em células WEHI-3 estimuladas com LTA. As células foram plaqueadas em meio sem soro por 24 horas. Incubou-se com DCFH-DA por 15 minutos e ao final da incubação, LTA 30µg/ml. e/ou NECA 10µM, foi adicionado e a oxidação do DCFH-DA analisada por 1 hora. ANOVA/ S.N.K , $p > 0,05$

4.5 .Papel dos receptores de adenosina na produção de óxido nítrico em células WEHI-3 estimuladas com LTA

Na figura 5 mostramos que NECA, um agonista não seletivo de receptores de adenosina, não modula a produção de óxido nítrico nas células WEHI-3, estimuladas ou não, com LTA.

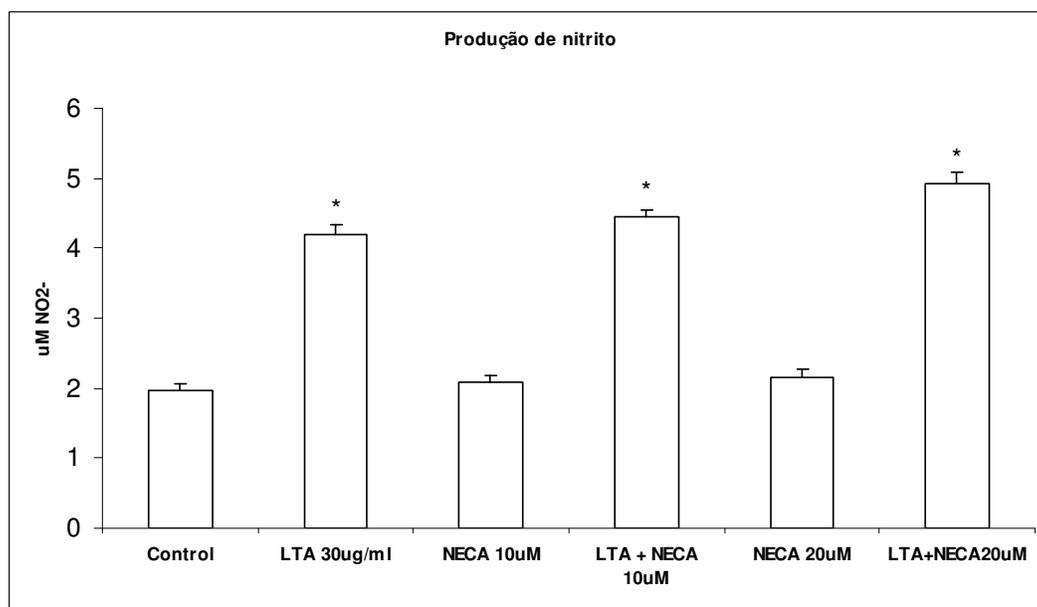


Figura 5. .Papel dos receptores de adenosina na produção de óxido nítrico em células WEHI-3 estimuladas ou não com LTA. As células foram tratadas com LTA (30 µg/ml) e/ ou NECA 10µM ou 20µM. Quando NECA foi utilizado, adicionou-se 15 minutos antes de LTA. Após 24 horas, foi feita a dosagem de nitrito. Os valores são expressos como concentração de nitrito (µM) e representam a média ± SEM (n=4). *p< 0,05 versus controle e NECA. ANOVA/ S.N.K .

4.6 .Papel dos receptores de adenosina na produção de óxido nítrico em células WEHI-3 estimuladas com LTA e pré tratadas com LDL

Como já observamos anteriormente, LDL causa um aumento muito expressivo na produção de NO nas células estimuladas com LTA. Adicionalmente, analisamos se os receptores de adenosina têm algum efeito sobre o estímulo do LDL na ação do LTA sobre a produção de NO. Assim como o agonista NECA não tem nenhum efeito na produção de NO nas células tratadas ou não com LTA, tampouco apresenta efeito algum sobre o estímulo causado por LDL na ação de LTA.(fig. 6)

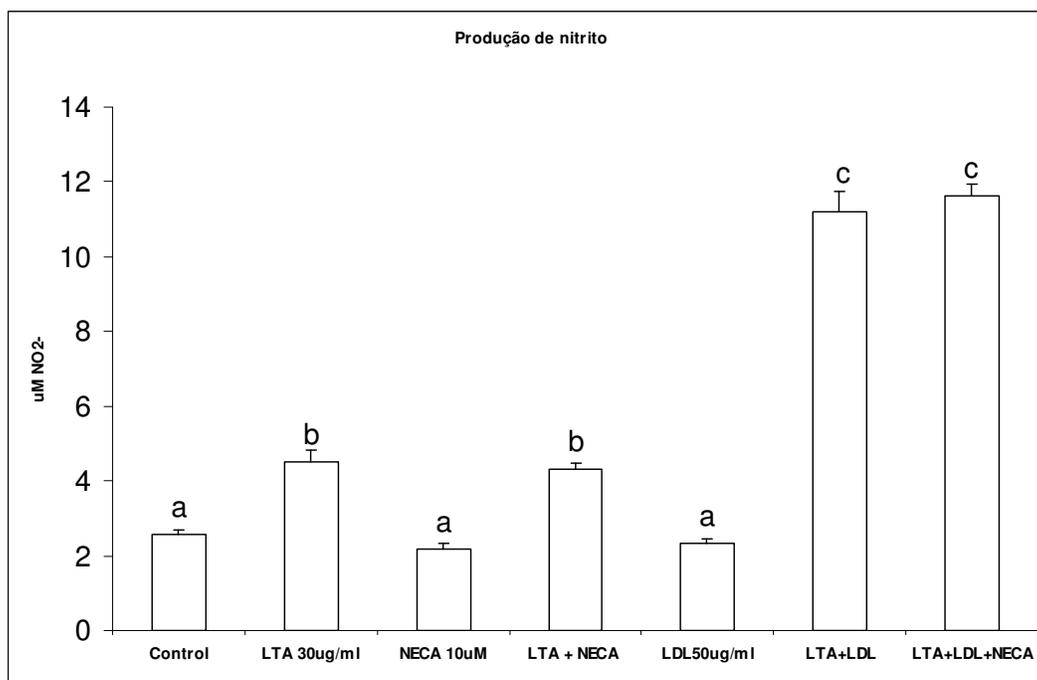


Figura 6..Papel dos receptores de adenosina na produção de óxido nítrico em células WEHI-3 estimuladas com LTA.e pré-tratadas com LDL As células foram incubadas com LDL (10 ou 50 µg/mL) por 36 horas e estimuladas nas últimas 24 horas com LTA (30 µg/mL). Quando NECA foi utilizado, adicionou-se 15 minutos antes de LTA. Os valores são expressos como NO₂- (µM) e representam a média ± SEM (n=4). Letras diferentes significam grupos estatisticamente diferentes. ANOVA/S.N.K, p>0,05.

5. DISCUSSÃO

Os macrófagos são células do sistema imune originadas a partir da diferenciação de monócitos. Essa diferenciação pode ocorrer quando os monócitos são ativados na presença de algum antígeno. Assim, eles migram da circulação sanguínea para os órgãos e tecidos, onde se diferenciam em macrófagos maduros, adquirindo diferentes características morfológicas e funcionais, dependendo do estímulo recebido (PAPADIMITRIOU e ASHMAN, 1989). Dessa forma, uma linhagem de macrófagos apresenta os componentes celulares necessários para causar uma resposta imune em maior grau que uma linhagem monocítica não diferenciada.

Com base nos resultados obtidos neste trabalho, podemos concluir que as células da linhagem monocítica WEHI-3 parecem ser menos sensíveis ao efeito do LTA, na produção de NO, quando comparadas a linhagem de macrófagos RAW 264.7, já que necessitam de doses muito maiores de LTA (30 μ g/ml versus 1 μ /ml), para produzir um aumento significativo nessa produção.

Mueller et. al (2006), mostraram em seu trabalho que a ativação de macrófagos humanos é fortemente diminuída pelo soro. Quando tratadas com LTA em um meio com 4% de soro, os níveis de secreção de TNF- α , IL-6 e IL-8 estão diminuídos, comparados com os dados obtidos em meio sem soro.

Em nosso trabalho, observamos que LTA aumenta a produção de óxido nítrico de maneira dose dependente em meio livre de soro nas células WEHI-3, e que esta produção é atenuada na presença de soro, indicando que o soro pode bloquear alguma vias de transdução de sinal induzida pelo LTA, ou impedir a ligação de LTA a algum receptor ou sitio de ligação. Os resultados de nosso trabalho são compatíveis com os obtidos por OHKI et al (1999), que mostraram que o soro suprime a ativação da linhagem WEHI-3 por LPS, e

que este efeito inibitório já é visto em uma concentração de soro de 0,1% e é dependente da estrutura química do LPS.

Quando avaliamos o efeito de LDL sobre a resposta inflamatória das células WEHI-3, observamos um aumento significativo na produção de óxido nítrico quando as células foram pré-incubadas com LDL e estimuladas com LTA, indicando que LDL aumenta os efeitos pró-inflamatórios de LTA nessas células. De maneira inversa ocorre com os macrófagos RAW 264.7, onde resultados anteriores de nosso laboratório mostraram que LDL diminui os efeitos pró-inflamatórios do LTA.

Quanto à produção de espécies reativas de oxigênio, LTA não causou um aumento significativo, mesmo nas doses de 30µg/ml, diferentemente do que ocorre nos macrófagos RAW 264.7 onde o LTA em uma concentração de 1µg/ml aumenta a produção de ROS em apenas 10 minutos de tratamento e este aumento está relacionado com o aumento da produção de NO. Nossos resultados sugerem que a produção de óxido nítrico pelas células WEHI-3 não está relacionada com a produção de ROS, e que esta linhagem deve utilizar alguma via de sinalização diferente da linhagem RAW 264.7 para produção de NO. A incubação com LDL tampouco causou alteração na produção de ROS, em nenhuma das concentrações utilizadas em nosso trabalho.

Modificações da LDL são conhecidas por ter um importante papel no desenvolvimento e evolução da aterosclerose e da aterogênese, e acredita-se estar associada com alterações na produção vascular de óxido nítrico (NO). (SCHMID et. al., 2008). Sabe-se que as lipoproteínas modificadas são mais aterogênicas, neste trabalho utilizamos LDL na sua forma nativa, ou seja, não oxidada. De maneira semelhante ao mostrado em nosso trabalho, NETEA et al. (2002) mostraram que pré-incubação de células mononucleares de sangue periférico com LDL nativo, não influenciou a produção de TNF-

α e IL-8, mas potencializam significativamente a ação de LPS na produção dessas citocinas.

A aterosclerose é um processo inflamatório crônico que perturba a regulação do tônus vascular pelo óxido nítrico formado pela enzima constitutiva óxido nítrico sintase endotelial. Essa disfunção endotelial é um evento precoce na aterogênese. Por outro lado, o ambiente inflamatório em placas ateroscleróticas pode resultar na expressão da óxido nítrico sintase induzível (iNOS). A maioria das evidências suporta a hipótese de que a liberação de NO endotelial protege contra a aterogênese, por exemplo, impedindo a proliferação das células musculares lisas e adesão de leucócitos. Óxido nítrico gerado pela isoenzima induzida pode ser benéfico, mas a liberação excessiva pode danificar as células da parede vascular, especialmente em combinação com os intermediários de oxigênio reativo. (MATTHYS e BULT, 1997)

É conhecido que receptores de adenosina medeiam as ações antiinflamatórias da adenosina em uma variedade de tipos celulares. MURPHREE et al (2005) descrevem que LPS induz um aumento na expressão de mRNA de receptores de adenosina A2b, e principalmente na expressão do receptor A2a, e uma redução de expressão dos receptores de A1 e A3, em macrófagos de camundongos. A expressão de mRNA de A2aR, é muito maior nas células IPM Φ (macrófagos intraperitoniais), WEHI-3 e macrófagos humanos do que em monócitos humanos (THP-1) e células endoteliais de camundongos.

Anteriormente, vimos que na linhagem de macrófagos RAW 264.7 a adenosina diminui o efeito do LTA na produção de NO e ROS. No presente trabalho, vimos que nos monócitos não diferenciados WEHI-3, a adenosina parece não ter a mesma função, apesar de dados na literatura mostrarem que essa linhagem possui receptores para adenosina. Além disso, adenosina parece não ter nenhum efeito sobre o aumento de capacidade pró-

inflamatória destas células causadas por LDL quando estimuladas por LTA. Isso sugere que o LTA pode seguir alguma outra via de sinalização na linhagem WEHI-3.

É descrito que após a exposição de células IPM Φ , WEHI-3 ou macrófagos humanos à LPS, ao longo do tempo ocorre um aumento na densidade dos receptores A2a. A ativação de A2aR inibe a agregação das plaquetas, inibe a adesão e estresse oxidativo dos neutrófilos, e diminui a produção de citocinas pró-inflamatórias em monócitos e macrófagos. (MURPHREE et al 2005). Com base no nosso trabalho podemos sugerir que os receptores de adenosina não participam de alguns processos inflamatórios em infecções causadas por bactérias gram-positivas.

Do presente trabalho pode-se concluir que LTA, LDL e adenosina diferem ou na união aos receptores de reconhecimento de padrão dos dois tipos celulares estudados, ou na ação de co-receptores ou na utilização dos caminhos de transdução de sinais. No entanto, mais estudos ainda são necessários acerca dos mecanismos que essas moléculas podem estar utilizando para provocar estas respostas.

BIBLIOGRAFIA

ABRASS CK: Celular do Metabolismo Lipídico e o papel dos lipídios na Progressive Renal Disease. Cellular Lipid Metabolism and the Role of Lipids in Progressive Renal Disease. *Am J Nephrol* (2004); 24:46-53

ALTURA BM.- Handbook of Shock and Trauma (*Raven, New York*) (1983).

ANDRADES, M., RITTER, C., MOREIRA, J.C. e DAL-PIZZOL, F .– Oxidative parameters differences during non-lethal and lethal sepsis development. *J.Surg.Res.*,(2005) 125 n 1 pp 68-72

BAI, S.K., LEE, S.J., NA, H.J., HA, K.S., HAN, J.A., LEE, H., KWON, Y.G., CHUNG, C.K., e KIM, Y.M.- B-carotene inhibits inflammatory gene expression in lipopolysaccharide-stimulated macrophages by suppressing redox-based NF-kB activation: *experimental and molecular medicine* (2005), vol 37, 4: 323-334

BOURS, M.J., SWENNEN, E.L., DI, V.F., CRONSTEIN, B.N., e DAGNELIE, P.C. – adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. *Pharmacol. Ther* (2006) v 112 n2 pp 358-404

DE KIMPE, S.J., KENGATHARAN, M., THIEMERMANN, C., e VANE, J.R. – The cell wall components peptidoglycan and lipoteicoic acid from *Staphylococcus aureus* act synergy to cause shock and multiple organ failure. *Proc.Natl.Acad. Sci.U.S.A*, (1995) v.125, n 1, pp.68-72

DE SOUZA, L.F., JARDIM, F.R., SAUTER, I.P., SOUZA, M.M., BARRETO, F., e BERNARD, E.A.- Reactive oxygen species participates in lipoteichoic acid induced nitric oxide production in RAW 264.7 macrophages: modulation by adenosine receptors. *Submetido para publicação(2009)*.

DE SOUZA, L.F., JARDIM, F.R., SAUTER, I.P., SOUZA, M.M., BARRETO, F., MARGIS, R., e BERNARD, E.A- Lipoteichoic acid from *Staphylococcus aureus* increases matrix metalloproteinase 9 expression in RAW 264.7 macrophages: Modulation by A2a and A2b adenosine receptors. *Molecular Immunology (2009) v 46, n 5, pp 937-942*.

ELENA, G., KLAUS, L.- Vascular Adhesion Molecules in Atherosclerosis-*Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology: (2007) Volume 27(11) pp 2292-2301*

FREDHOLM, B.B., ARSLAN, G., HALLDNER, L., KULL, B., SCHULTE, G., e WASSERMAN, W. – Structure and function of adenosine receptors and their genes. *Naunyn-schmiedeberg's arch pharmacol (2000) 362 pp 364-374*

FORMAN, H.J. e TORRES, M. – Reactive oxygen species and cell signaling: respiratory burst in macrophage signaling. *Am. J. Resp. Crit. Care Med.(2002), v166, n2 pp s4-s8*

GABAY C. - Interleukin-6 and chronic inflammation. *Arthritis Res Ther.(2006); 8 Suppl 2:S3*.

GROENEWEG, M., KANTERS, E., VERGOUWE, M., DUERINK, H., KRAAL, G., HOFKER, M., e DE WINTHER, M. Lipopolysaccharide-induced gene expression in murine macrophages is enhanced by prior exposure to oxLDL. *Journal of Lipid Research*, (2006) 47: 2259 - 2267

HASKO, G., SZABO, C., NEMETH, Z.H., KVETAN, V., PASTORES, S.M., e VIZI, E.S.. – Adenosine receptor agonists differentially regulate IL-10, TNF-alpha, and nitric oxide production in RAW 264.7 macrophages and in endotoxemic mice. *J Immunol.* (1996), 157 pp 4634-40.

HASKÓ, G., e PACHER, P. - A2a receptors in inflammation and injury: lessons learned from transgenic animals. *Journal of leukocyte biology.* (2008) v 83 pp447-455

HEINECKE, J. W. Mechanism of oxidative damage of low density lipoprotein in human atherosclerosis. *Current opinion in lipidology.* (1997), n 8. pp-268-274

HEHLGANS, T., e PFEFFER, K. – The intriguing biology of the tumour necrosis factor/ tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. *Immunology* (2005) v 115 n 1 pp 1-20

HSU, H.Y. e WEN, M.H. – Lipopolysaccharide-mediated reactive oxygen species and signal transduction in the regulation of interleukin -1 gene expression. *J.Biol.Chem.*, (2002) V 277, n 25, pp 22131-22139

KAO, S.J., LEI, H.C., KUO, C.T., CHANG, M.S., CHEN, B.C., CHANG, Y.C., CHIU, W.T., e LIN, C.H.- Lipoteichoic acid induces nuclear factor-kappaB activation and nitric oxide synthase expression via phosphatidylinositol 3-kinase, Akt, and p38 MAPK in RAW 264.7 macrophages. *Immunology*.(2005), 115:366-74.

KENGATHARAN, K.M., DE, K.S., ROBSON, C., FOSTES, S.J., e THIEMERMANN, C. – Mechanism of gram-positive shock: identification of peptidoglycan and lipoteichoic acid moieties essential in induction of nitric oxide synthase, shock, and multiple organ failure. *J.Exp.Med.* (1998) v.188, n2, pp305-315

KIMURA, K., ITO, S., NAGINO, M., e ISOBE, K. – Inhibition of reactive oxygen species down-regulates protein synthesis in RAW 264.7 *Biochem.Biophys.Res.Commun.* (2008) n 372,v 1, pp272-275

KORHONEN, R., LAHTI, A., KANKAANRANTA, H., e MOILANEN, E. – Nitric oxide production and signaling in inflammation. *Curr.Drug Target.Inflamm.Allergy*, (2005) v 4 n 4 pp 471-479

LANGERMANS, J. A. M., HAZENBOS, W. L. W., e VAN FURTH, R.; Antimicrobial functions of mononuclear phagocytes. *Journal of Immunological Methods*.(1994). 174 pp-185-194

LAPPAS, C.M., SULLIVAN, G.W., e LINDEN, J. - Adenosine A2a agonists in development for the treatment of inflammation. *Expert Opin Investig Drugs*. (2005), 14:797-806

LEVY, R., KOTB, M., NAGAUKER, O., MAJUMDAR, G., ALKAN, M., OFEK, I., e BEACHEY, E.H. - Stimulation of oxidative burst in human monocytes by lipoteichoic acids. *Infect.Immun* (1990) v58, n2, pp566-568

LEWIS, R.S., TAMIR, S., TANNENBAUM, S.R., e DEEN, W.M. - Kinetic analysis of the fate of nitric oxide synthesized by macrophages in vitro. *The journal of biological chemistry* (1995) v 270, n. 49, pp. 29350–29355

MAC EWAW, D.J.- TNF receptor subtype signaling: differences and cellular consequences. *Cell signal*, (2002) v 14 n 6 pp 477-492

MATTHYS, K.E. e BULT, H.- Nitric oxide function in atherosclerosis. *Mediators Inflamm.* 1997;6(1):3-21.

MEDZHITOV, R. - Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature* (2007) v. 4, n. 7164, pp. 819-826

MILLER YI, VIRIYAKOSOL S, WORRALL DS, BOULLIER A, BUTLER S, WITZTUM JL.- Toll-like receptor 4-dependent and -independent cytokine secretion induced by minimally oxidized low-density lipoprotein in macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* (2005) 25(6):1213-9

MUELLER M, STAMME C, DRAING C, HARTUNG T, SEYDEL U, SCHROMM AB. - Cell activation of human macrophages by lipoteichoic acid is strongly attenuated by

lipopolysaccharide-binding protein. *The journal of biological chemistry*(2006) vol. 281, NO. 42, pp. 31448–31456

MURPHREE, L., SULLIVAN, G., MARSHALL, M., e LINDEN, J. - Lipopolysaccharide rapidly modifies adenosine receptor transcripts in murine and human macrophages: role of NF- κ B in A2a adenosine receptor induction. *Biochem. J.* (2005) 391, 575–580

NETEA MG, KULLBERG BJ, DEMACKER PN, JACOBS LE, VERVER-JANSEN TJ, HIJMANS A, VAN TITS LH, HOENDEROP JG, WILLEMS PH, VAN DER MEER JW, STALENHOF AF. - Native LDL potentiate TNF alpha and IL-8 production by human mononuclear cells. *J Lipid Res.* (2002);43(7):1065-71.

OGAWA Y, DURU EA, AMEREDES BT.- Role of IL-10 in the resolution of airway inflammation. *Curr Mol Med.* (2008); 8(5):437-45.

OHKI, K., AMANO, F., YAMAMOTO, S., KOHASHI, O. – Supressive effects of serum on LPS-induced production of nitric oxide and TNF- α by macrophage-like cell line, WEHI-3, are dependent on the structure of polysaccharide chain in LPS. *Immunology and cell biology*(1999)77, 143-152

PFEIFFER, Z.A., GUERRA, A.N., HILL, L.M., GAVALA, M.L., PRABHU, U., AGA, M., HALL, D.J., e BERTICS, P.J. – nucleotide receptor signaling in murine macrophages is linked to reactive oxygen species generation. *Free radical biology and medicine* (2007) 42; 1506-1516

PAPADIMITRIOU JM, ASHMAN RB. Macrophages: current views on their differentiation, structure, and function. *Ultrastruct Pathol.* (1989) 13(4):343-72.

PARRILLO JE. - Pathogenetic mechanisms of septic shock. *N Engl J Med.* (1993) 328:1471-7.

PODREZ, E.A., SCHIMITT, D., HOFF, H.F., e HAZEN, S.L. – Myeloperoxidase-generated reactive nitrogen species convert LDL into an atherogenic form in vitro. *The journal of clinical invest.* (1999) v 103, n 11, pp 1547-1560

REISS, A.B., RAHMAN, M.M., CHAN, E.S.L., MONTESINOS, M.C., AWADALLAH, N.W., e CRONSTEIN, B.N. – Adenosine A2a receptor occupancy stimulates expression of proteins involved in reverse cholesterol transport and inhibits foam cell formation in macrophages. *Journal of leukocyte biology* (2004) v 76 pp 727-734

RIEGER, J.M., BROWN, M.L., SULLIVAN, W.G., LINDEN, J., e MACDONALD, T.L.- Design, synthesis, and evaluation of novel A2a adenosine receptor agonists. *J. med. Chem.* (2001) v 44, pp 531-539

RYAN, K.A., SMITH, M.F., JR., SANDERS, M.K., e ERNST, P.B. – Reactive oxygen and nitrogen species differentially regulate Toll-like receptor 4-mediated activation of NF-kappa B and interleukin-8 expression. *Infect.Immun.*,(2004) v 72, n 4, pp2123-2130.

SAUTER, I.P., SOUZA, L.F., SOUZA, M.M., e BERNARD, E.A.- Action of LDL and high glucose over MMP activity and NO production by lipoteichoic acid stimulated macrophages. *XXXVIII reunião SBBq (2008)-I-031*

SCHMID, W. LEE, A., SON, J., KOLLER, E., e VOLF, I., - Hypochlorite-oxidized low density lipoproteins reduce production and bioavailability of nitric oxide in RAW 264.7 macrophages by distinct mechanisms. *Life Sciences(2008) 83; 50-58*

SEO, H.S., MICHALEK, S.M., e NAHM, M.H.-Lipoteichoic acid is important in innate immune responses to gram-positive bacteria. *Infect.Immun.,(2008) v76, n1, pp 206-2133*

TAKEUCHI, O e AKIRA, S. - Toll-like receptors; their physiological role and signal transduction system. *Int.Immunopharmacol(2001), v.1, n. 4, pp.625-635*

TEISSIER, E., NOHARA, A., CHINETTI, G., PAUMELLE, R., CARIOU, B., FRUCHART, J.C., BRANDES R.P., SHAH, A., e STAELS, B. – Peroxisome proliferator-activated receptor alfa induces NADPH oxidase activity in macrophages, leading to the generation of LDL with PPAR- alfa activation properties. *Circulation research (2004), 95; 1174-1182*

VAN AMERSFOORT, E.S., VAN BERKEL, T.J., e KUIPER, J. - Receptors, mediators, and mechanisms involved in bacterial sepsis and septic shock. : *Clin Microbiol Rev. (2003), 16:379-414*

VERDRENGH, M., e TARKOWSKI, A.; Role of macrophages in *Staphylococcus aureus*-induced arthritis e sepsis. *Arthritis & Rheumatism*. (2000) v. 43, n 10 pp 2276–2282

VINCENT, J.L., ZHANG, H., SZABO, C., e PREISER, J.C. – Effects of nitric oxide in septic shock. *Am.J.Respir.Crit Care Med*, 9 (2000) v 161, n6, pp 1781-1785

VICTOR, V.M., ROCHA, M., ESPLUGUES, J.V., e DE LA, F.M. – Role of free radicals in sepsis: antioxidant therapy. *Curr.Pharm.Des*, (2005) v 11, n24, pp 3141-3158

ZHANG, Y., FONG, C.C., WONG, M.S., TZANG, C.H., LAI, W.P., FONG W.F., SUI, S.F., e YANG, M. – molecular mechanisms of survival and apoptosis in raw 264.7 macrophages under oxidative stress. *Apoptosis* (2005) v 10 n 3, pp 545-556

ZHOU, X., YANG, W., e LI, J. – Ca²⁺ and protein kinase C-dependent signaling pathway for nuclear factor-kB activation, inducible nitric-oxide syntase expression, and tumor necrosis factor-alfa production in lipopolysaccharide-stimulated rat peritoneal macrophages. *The journal of biological chemistry* (2006) v 281, n 42, pp 31337-31347