**Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Departamento de Imunologia**

**Participação da via PI3K γ /AKT na produção de
óxido nítrico por macrófagos peritoneais**

Andressa Duarte

**Ribeirão Preto
2013**

Andressa Duarte

**Participação da via PI3K γ /AKT na produção de
óxido nítrico por macrófagos peritoneais**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo para a
obtenção do título de Mestre em
Ciências.

Área de Concentração: Imunologia

Orientador: Prof. Dr. Thiago Mattar
Cunha

Ribeirão Preto

2013

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por quaisquer meios convencionais ou eletrônicos, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica

Duarte, Andressa

Participação da via PI3K γ /AKT na produção de óxido nítrico por macrófagos peritoneais

Ribeirão Preto, 2013.

97p.

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de concentração: Imunologia - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Orientador: Prof. Dr. Thiago Mattar Cunha

Palavras-chave: Macrófago;

PI3K γ ; NO; iNOS; NF-kB.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Andressa Duarte

Participação da via PI3K γ /AKT na produção de óxido nítrico por macrófagos peritoneais

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências.
Área de Concentração: Imunologia

Aprovado em: 06 de setembro de 2013

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Thiago Mattar Cunha
Instituição: FMRP – USP Assinatura:

Profa. Dra. Vânia Luiza Deperon Bonato
Instituição: FMRP – USP Assinatura:

Profa. Dra. Vanessa Pinho da Silva
Instituição: UFMG Assinatura:

Trabalho realizado no Laboratório de Inflamação e Dor do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo com auxílio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Dedicatória

Aos meus pais, pois sem vocês, nada disto teria sido possível. Muito obrigada pelo apoio incondicional, carinho e amor.

Agradecimentos

Agradeço...

A Deus, pela força superior que me deu nos momentos difíceis;

Aos meus pais, pelo apoio e amor;

Ao Profº Thiago Mattar Cunha, pela oportunidade;

Aos demais professores do grupo;

Às Professoras Vânia Luiza Deperon Bonato e Vanessa Pinho da Silva, pela atenção e disponibilidade para compor minha banca examinadora;

Aos amigos e colegas do LID, pela convivência e amizade;

Aos técnicos, sendo eles de grande importância para realização do nosso trabalho e pela boa convivência;

Agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para realização desse trabalho. São tantas pessoas a agradecer que não citei nomes para não esquecer ninguém, mas todos sabem o quanto foram importantes nesta fase.

Ao CNPq, pelo auxílio financeiro para a realização deste trabalho.

Muito obrigada.

*“A mente que se abre a uma nova ideia jamais
voltará ao seu tamanho original.”*

Albert Einstein

Resumo

Resumo

DUARTE, A. **Participação da via PI3K γ /AKT na produção de óxido nítrico por macrófagos peritoneais.** Dissertação de Mestrado – Departamento de Imunologia Básica e Aplicada da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP.

A imunidade inata é responsável pela resposta inicial aos microrganismos, uma vez que impede, controla ou elimina a infecção. Esse sistema consiste em barreiras epiteliais, proteínas plasmáticas e células circulantes e teciduais. Dentre esses componentes, os macrófagos possuem grande importância, sendo capazes de controlar e eliminar agentes patogênicos através da fagocitose e produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. A ativação de PRRs por constituintes oriundos dos patógenos em macrófagos desencadeia eventos da resposta imune inata, ativados por diversas vias de sinalização intracelular. A via das PI3Ks é conhecida por regular várias funções nas células, como a regulação do ciclo celular, migração e produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. O NO é um mediador central na imunidade inata que, após estímulos inflamatórios, é produzido em altas quantidades através da iNOS. Macrófagos deficientes em PI3K γ produzem menos NO e apresentam prejudicado controle da infecção quando infectados por *T. cruzi*. O objetivo do presente trabalho foi investigar o papel da via PI3K γ na produção de NO por macrófagos peritoneais estimulados com LPS. Os macrófagos empregados no estudo, WT e PI3K $\gamma^{-/-}$, possuem o mesmo fenótipo. Observamos que macrófagos PI3K $\gamma^{-/-}$ possuem uma menor produção de NO e expressam menos iNOS. A reduzida expressão de iNOS, após estímulo com LPS, é também observada quando macrófagos WT são tratados com inibidores seletivos da PI3K γ e AKT. Além disso, demonstramos que, concomitantemente à menor expressão da iNOS, ocorre deficiência na fosforilação da AKT e diminuição da ativação do fator de transcrição NF-kB, sugerindo que a PI3K γ participa da ativação do NF-kB. Foi observado ainda que o tratamento com PTX também diminui a expressão da iNOS. No entanto, macrófagos PAFR $^{-/-}$ expostos ao LPS apresentam maior expressão da iNOS, enquanto os macrófagos CCR2 $^{-/-}$ apresentam menor expressão dessa enzima nessas condições. Para investigar a implicação da via PI3K γ “*in vivo*” foi administrado LPS i.v., como modelo de choque endotoxêmico, no qual observamos maior sobrevivência em animais PI3K $\gamma^{-/-}$ comparado aos animais WT e menores níveis de nitrito no soro. Nossos dados sugerem que a enzima PI3K γ é crítica para expressão de iNOS e produção de NO pelos macrófagos, possivelmente através da ativação do receptor CCR2, estando envolvida na fisiopatologia do choque induzido por LPS.

Palavras-chave: PI3K γ ; NO; iNOS; NF-kB.

Abstract

Abstract

Duarte, A. **The participation of PI3K γ /AKT signaling on the production of nitric oxide by peritoneal macrophages.** Thesis (Master) – Department of Basic and Applied Immunology of the School of Medicine of Ribeirao Preto – University of Sao Paulo, Ribeirao Preto, SP.

Innate immunity is the initial response to microorganisms, since it prevents, controls and eliminates infection. This system consists in epithelial barriers, plasma proteins and circulating and tissue cells. Among these components, macrophages have great importance, being capable of control and eliminate pathogen agents through phagocytosis and production of reactive oxygen and nitrogen species. Activation of PRRs by pathogens constituents in macrophages triggers events of the innate immune response, activated by various intracellular signaling pathways. PI3Ks' pathway is known to regulate several functions in the cell, such as regulation of the cell cycle, migration and production of reactive oxygen and nitrogen species. NO is a central mediator in innate immunity, which after inflammatory stimuli, is produced in high levels by iNOS. PI3K γ -deficient macrophages produce less NO and exhibit impaired control of infection when infected by *T. cruzi*. The aim of the present study is to investigate the role of PI3K γ pathway in NO production by LPS-estimated peritoneal macrophages. The macrophages used in this study, WT and PI3K γ ^{-/-}, have the same phenotype. We observed that PI3K γ ^{-/-} macrophages have a lower NO production and express less iNOS. The low expression of iNOS after stimulation with LPS was also observed in WT macrophages treated with selective inhibitors of PI3K γ and AKT. Furthermore, we demonstrate that, along to lower iNOS expression, there is deficiency in AKT phosphorylation and decreased activation of the transcription factor NF-kB, suggesting that PI3K γ participates of the NF-kB activation. It was also observed that PTX treatment has decreased iNOS expression. However, LPS-exposed PFAR^{-/-} macrophages present greater expression of iNOS, while CCR2^{-/-} macrophage exhibit lower expression of this enzyme under these conditions. To investigate involvement of the PI3K γ pathway has "in vivo", LPS was administered i.v., as an endotoxic model, in which we observed a higher survival in PI3K γ ^{-/-} animals compared to WT animals and lower nitrite levels in serum. Our data suggest that PI3K γ enzyme is critical to iNOS expression and NO production by macrophages, possibly through activation of the CCR2 receptor, being involved in the LPS-induced shock pathophysiology.

Keywords: PI3K γ ; NO; iNOS; NF-kB.

Sumário

Sumário

1.Introdução	17
1.1 Macrófagos	21
1.2 Sinalização via fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K)	23
1.3 Fator de transcrição nuclear κ B (NF- κ B)	25
2.Objetivos	29
2.1 Objetivo geral	30
2.2 Objetivos específicos	30
3.Material e Métodos	31
3.1 Animais	32
3.2 Isolamento e cultura de macrófagos	32
3.3 Dosagem de nitrito	35
3.4 Dosagem de Ureia	35
3.5 Quantificação de citocina	36
3.6 Análises da expressão proteica por Western Blotting	37
3.6.1 Preparação das Amostras das Culturas de macrófagos: Extração das Proteínas.....	37
3.6.2 Eletroforese e ImunoBlotting	37
3.7 Análises por citometria de fluxo	39
3.8 Indução do quadro de endotoxemia	40
3.9 Análises estatísticas.....	40

4.Resultados	41
4.1 A via da PI3K γ participa da produção de NO, mas não de TNF- α , em macrófagos estimulados com LPS	42
4.4 A PI3K γ não influencia na expressão da arginase 1 e produção de ureia em macrófagos estimulados com LPS	51
4.10 Macrófagos de camundongos deficientes de receptor de PAF (PAFR) possuem maior produção de NO e expressão de iNOS mas não diferem na expressão de arginase 1 após estímulo com LPS	64
4.12 O grupo de animais PI3K γ ^{-/-} apresenta maior sobrevida em quadro de endotoxemia induzida por LPS	70
5. Discussão	73
6. Conclusão	83
7. Referências Bibliográficas	85
8. Anexo	96

1.Introdução

1. Introdução

A imunidade inata é a resposta inicial aos microrganismos, a qual impede, controla ou elimina infecções. Esse sistema é composto por barreiras epiteliais, proteínas plasmáticas, células circulantes e residentes em tecidos. Dentre os componentes da imunidade inata, os macrófagos possuem grande importância, pois são capazes de controlar e eliminar agentes patogênicos através da fagocitose e produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, que lhes conferem capacidade microbicida (Revisado por Akira, Uematsu, & Takeuchi, 2006). Durante infecções, padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs, do inglês *pathogen-associated molecular patterns*) são reconhecidos por receptores de reconhecimento padrão (PRRs, do inglês *pattern recognition receptors*) expressos em células da imunidade inata dando início a uma cascata de sinalização, que leva à ativação de fatores de transcrição, como o fator nuclear kappa B (NF- κ B, do inglês *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) (Revisado por Oeckinghaus, Hayden, & Ghosh, 2011). Os fatores de transcrição, juntamente com moléculas pré-formadas, controlam a produção de citocinas e quimiocinas, moléculas de adesão, substâncias relacionadas com a regulação do ciclo de vida das células e proteínas de fase aguda (Revisado por Medzhitov, 2008; Zanoni & Granucci, 2012).

Em infecções bacterianas, dentre os principais receptores envolvidos no reconhecimento de PAMPs está a família dos receptores *toll-like* (TLRs, do inglês *toll-like receptors*) (Martinon & Tschopp, 2005). Além disso, entre os PAMPs bacterianos, destacam-se o ácido lipoteicóico (LTA, do inglês

lipoteichoic acid) e peptidoglicanas, os quais são derivados de bactérias gram-positivas (exotoxinas); e o lipopolissacarídeo (LPS), derivado de bactérias gram-negativas (endotoxinas) (Revisado por Opal, 2007). Nesse sentido, considerando o grande espectro de doenças causadas por bactérias, estudos relativos às vias de sinalização desencadeadas por PAMPs derivados das mesmas são de fundamental importância para a compreensão dos mecanismos envolvidos no processo inflamatório por elas desencadeado.

Estruturalmente, o LPS, principal componente da membrana externa de bactérias gram-negativas, é um lipídeo conjugado a carboidratos que pode induzir uma potente resposta imune contra a infecção bacteriana. Contudo, este efeito defensivo pode levar à resposta inflamatória sistêmica, como o choque séptico. Semelhante a outros PAMPs, o LPS também é reconhecido por um PRR altamente expresso na membrana plasmática de células fagocíticas, o TLR4.

A ativação do NF- κ B desencadeada pela ligação ao TLR4 (Revisado por Carmody & Chen, 2007; Kawai & Akira, 2006), induz a transcrição de inúmeros genes inflamatórios e consequente produção de mediadores, como o fator de necrose tumoral (TNF, do inglês *tumoral necrosis factor*), interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6), fator de ativação plaquetária (PAF, do inglês *platelet-activating factor*), entre outros (Jean-Baptiste, 2007; Sherwood & Toliver-Kinsky, 2004). Além disso, a ativação de NF- κ B leva à transcrição da isoforma induzida da enzima óxido nítrico sintase (NOS, do inglês *nitric oxide synthase*), a iNOS, potente indutora da produção do gás microbicida, o óxido nítrico (NO, do inglês *nitric oxide*) (Kleinert, Euchenhofer, Ihrig-Biedert, & Forstermann, 1996).

A geração de NO é uma característica de muitas células do sistema imunológico tais como células dendríticas, células natural *killer*, mastócitos, monócitos, macrófagos, células micrótglias, células de Kupffer, eosinófilos e neutrófilos, bem como células pertencentes a outros sistemas (Bogdan, 2001). A enzima NOS catalisa a produção NO através do precursor L-arginina, consumindo também nicotinamida adenina dinucleotideo fosfato (NADPH, do inglês *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*) e gás oxigênio (O_2) (Palmer & Moncada, 1989). Três isoformas de NOS foram descritas, a endotelial (eNOS, do inglês *endothelial NOS*) e a neuronal (nNOS, do inglês *neuronal NOS*), as quais são constitutivas e ativadas pelo aumento de íons cálcio (Ca^{2+}) intracelular, e a iNOS, cuja ativação é independente do Ca^{2+} intracelular e pouco sensível à auto-inibição pelo NO (Revisado por Hobbs, Higgs, & Moncada, 1999). O NO atua principalmente através da ativação da guanilato ciclase (GC) solúvel, que produz monofosfato cíclico de guanosina (cGMP, do inglês *cyclic guanosine monophosphate*) (Revisado por Alderton, Cooper, & Knowles, 2001).

A produção de NO é importante e desejável durante o processo inflamatório, uma vez que promove vasodilatação e é essencial para atividade microbicida dos fagócitos. No entanto sua produção demasiada pode levar a danos teciduais locais e, em situações mais graves, sistêmicos. A indução da iNOS é observada em vários modelos de doenças inflamatórias como sepse, choque séptico, artrite reumatoide, doença inflamatória intestinal entre outras (Grabowski et al., 1996; Kubes & McCafferty, 2000; Reade & Young, 2003). Na endotoxemia a iNOS é induzida em uma variedade de tecidos como mecanismo de defesa do hospedeiro, dirigido para limitar a lesão tecidual e a

infecção. Nessa situação existe uma intensa expressão da iNOS, o que leva a produção de altas concentrações de NO por longos períodos, resultando em danos sistêmicos (Revisado por Titheradge, 1999a).

A iNOS é regulada positivamente ou negativamente pelo contato célula-célula (via moléculas de co-estimulação), citocinas, complexos imune, produtos microbianos e virais (MacMicking, Xie, & Nathan, 1997). Durante processos inflamatórios, as primeiras células que detectam as alterações na homeostase tecidual e produzem NO através de iNOS são os macrófagos (Revisado por Xaus et al., 2001).

1.1 Macrófagos

Os macrófagos são células pertencentes ao sistema fagocítico mononuclear, originados a partir de um progenitor mielóide, compartilhado também por granulócitos. Ao deixarem a medula óssea, são liberados no sangue periférico, onde circulam por vários dias como monócitos e posteriormente migrarão para os tecidos e se diferenciarão em macrófagos (van Furth, 1985; Volkman & Gowans, 1965). Tais células são essenciais para as funções efetoras do sistema imune e destacam-se por sua importância na fagocitose e destruição de microrganismos, apresentação de antígenos para linfócitos T, remoção de células apoptóticas, resolução de processos inflamatórios, angiogênese, reparo e remodelamento tissular (Revisado por Biswas & Mantovani, 2010).

Os macrófagos compreendem uma população heterogênea de células com características morfofuncionais distintas (Liu, Xia, Gong, & Zhao, 2006)

importantes para a diversidade e flexibilidade de respostas imune inata e adaptativa a todos os tipos de estímulos. O microambiente de desenvolvimento do macrófago influencia nessa heterogeneidade (Biswas & Mantovani, 2010; Gordon, 2003; Gordon & Martinez, 2010; Gordon & Taylor, 2005). Estas células podem ser fenotipicamente, polarizadas em dois estágios distintos: o macrófago M1 (ou ativados classicamente) e o macrófago M2 (ou tipo II, ativados alternativamente) (Gordon & Taylor, 2005; Mantovani et al., 2004).

Os macrófagos ativados classicamente na presença de IFN- γ , produzido por células Th1 e células NK, e lipopolissacarídeo (LPS) são classificados M1. Estas células são caracterizadas por sua capacidade de produzir níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias, como IL-12, IL-6 e TNF- α ; espécies reativas de oxigênio e nitrogênio; NO, pela elevada expressão de iNOS; MHC de classe II; e moléculas co-estimulatórias, eficientes na apresentação de antígenos e atividade microbicida ou tumoricida (Biswas & Mantovani, 2010). Essas células também são capazes de induzir o recrutamento e/ou polarização de uma resposta Th1 através da produção de IL-12, CXCL9 e CXCL10 (Mantovani et al., 2004). Por outro lado, citocinas como IL-4 e IL-13 podem ativar alternativamente os macrófagos para o perfil M2 (Stein, Keshav, Harris, & Gordon, 1992), levando-os a produzir IL-10 e TGF- β ; expressar grandes quantidades de arginase 1, receptor de manose (CD206), fator de transcrição C/EBP β ; e participar no remodelamento tecidual (Biswas & Mantovani, 2010; Martinez-Pomares, 2012; Ruffell et al., 2009).

A ativação de macrófagos via receptores tipos TLR leva à ativação de distintas vias de sinalização, incluindo as iniciadas por fosfatidilinositol 3-

quinase (PI3K, do inglês *phosphatidylinositol 3-kinase*) (Brown, Wang, Hajishengallis, & Martin, 2011)

1.2 Sinalização via fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K)

As PI3Ks são enzimas de grande importância na resposta imune ativadas por estímulos extracelulares, tais enzimas foram inicialmente identificadas por sua atividade associada a várias oncoproteínas, receptores de fatores de crescimento e eventos associados ao ciclo de vida celular (Utermark et al., 2012; Wymann & Pirola, 1998).

As enzimas PI3Ks catalisam a transferência do grupo γ -fosfato do ATP para a posição D-3 do anel inositol de fosfatidilinositóis, que são constituintes das membranas celulares (Revisado por Hazeki, Nigorioka, & Hazeki, 2007). Como produto principal dessa fosforilação tem-se o fosfatidilinositol 3,4,5 trifosfato (PIP3) (Revisado por Koyasu, 2003), que é utilizado como plataforma para o recrutamento seletivo de proteínas que apresentam um domínio homólogo à pleckstrina (PH), que ao se ligarem ao PIP3 tornam-se ativadas (Revisado por Burgering & Coffey, 1995; Cantley, 2002). Essas interações levam a sinalizações intracelulares subsequentes, sendo uma das mais importantes a interação a outra quinase, a proteína quinase B (PKB, do inglês *protein kinase B*), também denominada AKT, a sua ativação ocorre mediante fosforilações em resíduos de treonina (Thr³⁰⁸) pela enzima PDK1 (*Phosphoinositide-dependent kinase-1*) e nos resíduos de serina (Ser⁴⁷³) pelo alvo da rapamicina em mamíferos (mTORC2, do inglês *mamalian target of rapamicin complex*) (Alessi et al., 1996).

A primeira proteína descrita como alvo para a proteína quinase AKT foi a glicogênio sintase quinase 3 (GSK-3, do inglês *glycogen synthase kinase 3*), uma importante enzima envolvida no metabolismo do glicogênio (Cross, Alessi, Cohen, Andjelkovich, & Hemmings, 1995). Atualmente, várias outras proteínas foram descritas como alvos de fosforilação e ativação pela AKT, entre elas eNOS (Fulton et al., 1999) e IKK (Ozes et al., 1999).

Existem múltiplas isoformas de PI3K, porém o alvo do presente estudo é a classe IB, composta por uma única isoforma, a PI3K γ (p110 γ), que pode estar ligada à proteína adaptadora p101 ou p84/p87 (Suire et al., 2005). As PI3K γ são geralmente ativadas por receptores acoplados a proteínas G (GPCRs, do inglês *G protein coupled receptors*), como receptores de quimiocinas (figura 1) (Stephens et al., 1994).

Figura 1: Ativação da PI3K γ . A PI3K γ , ativada pelas subunidades $\beta\gamma$ de GPCRs, fosforila o lipídio de membrana PIP2 dando origem ao PIP3 que exerce a função de plataforma para recrutar AKT, ativando vias de sinalização subsequentes. Desse modo PI3K exerce seus efeitos celulares. Figura adaptada de Rommel, Camps ET AL. (2007).

Inibidores da PI3K têm sido sugeridos como novos anti-inflamatórios, pois essa via de sinalização apresenta múltiplas funções nas células imunes (Cantley, 2002; Hirsch, Ciraolo, Ghigo, & Costa, 2008; Rommel, Camps, & Ji, 2007). Após indução de endotoxemia, camundongos deficientes de PI3K γ apresentam menor lesão, edema pulmonar, recrutamento de neutrófilos e concentrações de moléculas inflamatórias (Yum et al., 2001). Similarmente, foi demonstrado que além de menor lesão pulmonar, a deficiência da via da PI3K γ também reduz a fosforilação da subunidade inibitória do NF- κ B (I κ B, do inglês *inhibitory subunit κ B*), e translocação de NF- κ B para o núcleo em extratos pulmonares (Kim et al., 2012), o que sugere o envolvimento da via PI3K γ /I κ B/NF κ B em resposta ao LPS.

1.3 Fator de transcrição nuclear κ B (NF- κ B)

O fator de transcrição NF- κ B é descrito principalmente por sua capacidade de regular a transcrição gênica de enzimas, citocinas, moléculas de adesão e outras moléculas em diversas células e sistemas (Revisado por Li & Verma, 2002). Em células em repouso, encontra-se no citoplasma ligado à I κ B (Revisado por Li & Verma, 2002). Essa ligação forma um complexo que impede que o NF- κ B dirija-se para o núcleo, e se ligue a regiões específicas dos genes-alvo e promova a transcrição gênica e tradução de proteínas (Revisado por Li & Verma, 2002).

A ativação do NF- κ B ocorre geralmente por duas vias, uma denominada clássica e outra denominada alternativa (Revisado por Karin & Greten, 2005) (figura 2). A via clássica envolve a ativação do complexo formado pelas

subunidades p65 (que possui o domínio de ativação da transcrição), p50 (que possui o domínio de ligação ao DNA) e I κ B (que mantém o complexo inativado). Os principais ativadores desta via são citocinas pró-inflamatórias e componentes da parede bacteriana que, ao agirem sobre seus receptores específicos, ativam a quinase do I κ B (IKK, do inglês *I κ B kinase*), que por sua vez fosforila o I κ B, resultando na sua dissociação do complexo p65/p50 e subsequente ubiquitinação e degradação proteossomal. A partir deste momento, o dímero p65/p50 está livre para sofrer translocação para o núcleo da célula, se ligar em regiões específicas do DNA e induzir a transcrição gênica (Revisado por Karin & Greten, 2005). A via alternativa envolve o complexo formado pelas subunidades RelB (que possui o domínio de ativação da transcrição) e p100. Esta via é ativada pelo conjunto de receptores da família do TNF, que incluem receptores de linfotóxina β (LT β R, do inglês *Lymphotoxin β Receptor*), fator ativador de células B (BAFF, do inglês *B cell-activating factor receptor*), receptor ativador do NF- κ B (RANK, do inglês *receptor activator of NF- κ B*) e ligante de CD40, quando ativos, induzem à ativação da IKK que, por sua vez, fosforila a subunidade p100. Este é o sinal para a fosforilação de p100 a p52, que passa a exibir seu domínio de ligação ao DNA, permitindo a translocação nuclear e atividade transcrricional do heterodímero RelB-p52 (Karin & Greten, 2005).

Figura 2: Vias clássica e alternativa de ativação do NFκB. A ativação do fator de transcrição NFκB pela via clássica é induzida por citocinas e produtos da parede microbiana que ativam IKK, esse fosforila IκB o que culminam na translocação do dímero p50-p65 para o núcleo. A via alternativa é ativada por linfotoxinas as quais agem no complexo p100-RelB, fosforilando p100 e tornando o dímero apto a translocando-o para o núcleo. Figura adaptada de Luo, Kamata ET AL.(2005).

A cascata de sinalização do NF-κB interage com várias vias paralelas, incluindo as iniciadas por PI3K. Recentemente, foi descrito que a ativação de AKT pela PI3K ativa diretamente IKK, que consequentemente leva à translocação de NF-κB para o núcleo. (Bai, Ueno, & Vogt, 2009b). Sendo o NF-κB essencial para a expressão do gene da iNOS e produção de óxido nítrico, a PI3K pode estar envolvida na produção de NO por macrófagos. Em um estudo prévio de nosso laboratório, foi demonstrado que macrófagos derivados de células da medula óssea de animais deficientes em PI3Kγ produzem menos NO quando infectados por *Trypanosoma cruzi* e, consequentemente, controlam menos a infecção. Estes resultados sugerem um papel importante da via PI3Kγ

para a função microbicida de macrófagos. No entanto, os mecanismos envolvidos nesta atividade da PI3K γ ainda não foram elucidados. Diante do exposto, o presente trabalho investiga a participação da via da PI3K γ na produção de NO por macrófagos, focando nos mecanismos moleculares envolvidos nesse efeito.

2.Objetivos

2.1 Objetivo geral

O objetivo do presente trabalho foi investigar o papel da via PI3K γ /AKT na produção de óxido nítrico por macrófagos peritoneais.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a produção de óxido nítrico e expressão da iNOS em macrófagos peritoneais derivados de animais WT e deficientes para PI3K γ estimulados com LPS
- Avaliar os mecanismos moleculares envolvidos na participação da PI3K γ /AKT na produção de óxido nítrico por macrófagos peritoneais focando na análise da via do NF-kB.
- Avaliar a participação da PI3K γ no desenvolvimento do choque endotóxico.

3.Material e Métodos

3.1 Animais

Foram utilizados camundongos machos C57/BL6 selvagens (WT, do inglês *wild type*) (20–30 g) e camundongos machos Balb C WT (20–30 g), provenientes do Biotério Central da Universidade de São Paulo, Campus de Ribeirão Preto (USP-RP). Ainda foram utilizados camundongos machos (20–30 g) geneticamente modificados, deficientes para a enzima PI3K γ (PI3K $\gamma^{-/-}$, linhagem C57/BL6), deficientes de receptor de PAF (PAFR $^{-/-}$, linhagem Balb C) e deficientes de CCR2 (CCR2 $^{-/-}$, linhagem C57/BL6), provenientes do Centro de Criação de Camundongos Especiais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP-RP).

Os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com as normas estabelecidas pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (Processo n 090/2012).

3.2 Isolamento e cultura de macrófagos

Para isolamento dos macrófagos, os camundongos PI3K $\gamma^{-/-}$, PAFR $^{-/-}$, CCR2 $^{-/-}$ e WT receberam uma injeção intraperitoneal contendo 3 mL de tioglicolato a 3%. Após três dias, as células foram coletadas por meio de lavagem da cavidade peritoneal com 3 mL de RPMI estéril. Em seguida o lavado foi centrifugado a 4°C 1000 g por 5 minutos e resuspendido em meio RPMI suplementado com 10% de soro bovino fetal, glutamina, hepes e penicilina G.

As células coletadas foram então quantificadas em contador automático (*Coulter® Ac T; Coulter Corporation, Miami, Florida, USA*) e o número expresso em 10^6 células por mL.

As células foram cultivadas em placas de 96 poços 3×10^5 células/poço em 200 μ L de RPMI suplementado, para quantificação de ureia e nitrito e para a realização da técnica de western blotting e ELISA as células foram cultivadas em placas de 12 poços 1×10^7 células/poço em 2000 μ L RPMI e mantidas em atmosfera de 5% CO₂ à 37 °C. 12 horas após o cultivo foi adicionado ou não LPS (especificações ver tabela abaixo) (1, 3, 10, 30, 100 ou 300 ng/mL) por 6, 12, 24 ou 48 horas de cultura, sendo que as células dos animais WT foram também tratadas com inibidor de AKT (inibidor de AKT IV), inibidor da PI3K γ (AS605240) e toxina pertussis (PTX) (especificações ver tabela abaixo).

Droga	Fabricante	Veiculo	Concentração
AS605240 (inibidor da PI3Kγ)	Calbiochem	DMSO 2%	100 nM
Inibidor de AKT IV	Calbiochem	DMSO 2%	100 nM
LPS	Sigma	Salina	1, 3, 10, 30, 100 ou 300 ng/mL em cultura. 5, 10 ou 15 mg/Kg indução endotoxemia.
Toxina Pertussis	Sigma	Salina	500ng/mL

3.3 Dosagem de nitrito

Para mensurar a produção de nitrito *in vitro* foi utilizado sobrenadante de cultura de macrófagos peritoneais WT e PI3K $\gamma^{-/-}$ estimulado com LPS por 48 horas, já para análise *in vivo* foi utilizado amostra de plasma de camundongos WT e PI3K $\gamma^{-/-}$ obtidas a partir do sangue coletado 10 horas após administração de LPS (i.v.), 50 μ L de plasma foi incubado a 37°C por 18 horas com 50 μ L de coquetel contendo a enzima nitrato redutase. Para estimar a produção de NO do plasma previamente tratado e do sobrenadante de cultura foi utilizada a reação de Griess. Resumidamente, 50 μ L da amostra (sobrenadante de cultura ou plasma pós-tratamento) foram adicionados a 50 μ L de reagente de Griess. Em seguida a absorbância foi determinada em leitor de microplacas (*Spectra Max-250, Molecular Devices*) a 540 nm. Os resultados expressos em μ M foram determinados por comparação com uma curva-padrão feita com nitrito de sódio (NaNO₂) com concentração variando de 200 a 0,78 μ M.

3.4 Dosagem de Ureia

A quantificação da produção de ureia foi realizada a partir do sobrenadante de cultura através do uso de kits analíticos (Labtest,) conforme recomendações do fabricante. As absorbâncias foram determinadas em leitor de ELISA (*Spectra Max-250, Molecular Devices*), no comprimento de onda de 600 nm.

3.5 Quantificação de citocina

A dosagem de TNF- α e MCP1 no sobrenadante de cultura foi realizada pelo método imunoenzimático (ELISA). Em resumo, placas de 96 poços foram cobertas com 50 μ L/poço do anticorpo específico para TNF- α e MCP1 (Pharmigen, San Diego, CA, USA.). Este anticorpo foi diluído em solução de ligação pH 9,0 e incubados por 18 - 24 horas, a 4 °C. As placas então foram lavadas por três vezes com PBS/Tween-20 (0,05% Sigma). As ligações não específicas foram bloqueadas com 100 μ L de PBS/BSA 1% por (120 min) em temperatura ambiente. As amostras e o padrão (curva padrão) contendo as concentrações para a citocina foram colocados nas placas (50 μ L) e incubados por 18 - 24 horas a 4°C. Após esse período, as placas foram lavadas com PBS/Tween e 50 μ L dos anticorpos biotinilados específicos contra a citocina de interesse foram adicionados. Após uma hora, as placas foram lavadas com PBS/Tween e o conjugado avidina-peroxidase, na diluição de 1:5000, adicionado a cada poço. Após 30 minutos de incubação, as placas foram lavadas com PBS/Tween e 100 μ L do substrato OPD (o-fenilenediaminadihidroclorato; Sigma). As placas então foram incubadas por (15 a 20 min) em temperatura ambiente. A reação foi interrompida com 50 μ L de H₂SO₄ (1 M) e a densidade óptica medida a 490 nm em espectrofotômetro (*Spectra Max-250, Molecular Devices*). Os resultados foram expressos em picogramas/mL.

3.6 Análises da expressão proteica por Western Blotting

3.6.1 Preparação das Amostras das Culturas de macrófagos: Extração das Proteínas.

Após as diferentes estimulações, os macrófagos foram lisados em tampão de lise constituído de RIPA Buffer® (sigma Aldrich) e inibidores de protease. O lisado foi centrifugado a 13000 g durante 15 minutos a 4 °C. Uma alíquota do sobrenadante foi separado para dosagem de proteínas pelo método colorimétrico Coomassie (Bradford) Protein Assay Kit (Pierce, Rockford, IL,USA).

3.6.2 Eletroforese e ImunoBlotting

Amostras foram desnaturadas a 100 °C durante 4 minutos. Em seguida, as amostras foram aplicadas (50 µg por grupo) em gel de poliacrilamida (1,5 mm de espessura) na presença de SDS (SDS-PAGE) para separação por eletroforese, utilizando-se o sistema Mini-Protean II Electrophoresis Cell (Bio-Rad Laboratories, Hercules CA, USA). Inicialmente, pelo período de 30 minutos a corrida foi realizada sob voltagem de 80V, após esse período, a voltagem foi alterada para 100V. Para esse processo foi utilizado o tampão Tris-HCl 25 mM, pH 8,3, glicina 192 mM e SDS 0,1%. As proteínas separadas por SDS-PAGE foram transferidas para membranas de nitrocelulose 0,2 µm (*Bio Rad-Transfer Pack*), utilizando-se o sistema de

transferência Trans-Blot turbo-Tranfer System. Após a transferência as membranas foram coradas com Ponceau 0,5% em ácido tricloroacético 3% para certificação de que houve transferência das proteínas. Em seguida, as membranas foram lavadas em água deionizada e o bloqueio dos sítios antigênicos inespecíficos foi realizado pela incubação das membranas por 2 horas à temperatura ambiente em solução tampão salina tris e Tween 20 (TBS-T) contendo 5% de leite desnatado (molico) e 0,1% sob agitação contínua. Após o bloqueio, as membranas foram lavadas três vezes com TBS-T por cinco minutos. Em seguida foram incubadas “overnight” em solução TBS-T contendo 5% de leite, onde foram adicionado os anticorpos de interesse. Após a incubação com o anticorpo primário, as membranas foram lavadas 3 vezes por 5 minutos com TBS-T e em seguida incubadas com anticorpo conjugado à peroxidase, por uma hora, a temperatura ambiente. Após esta incubação, as membranas foram novamente lavadas três vezes com TBS-T por cinco minutos. Para a revelação as membranas foram incubadas com uma mistura de reagentes do kit de quimioluminescência (*ECL Western Blotting Systems, GE Healthcare*) como descrito no manual de instruções. As membranas foram reveladas no aparelho (*Molecular Imager® ChemiDoc™ XRS+ Bio Rad*).

Após a revelação, as membranas foram recuperadas pela incubação das mesmas por 30 minutos a 50 °C em tampão Tris-HCl 62,5 mM pH 6,7 contendo 2% de SDS e mercaptoetanol 100 mM. O procedimento de blot foi repetido, agora utilizando anticorpo anti- β -actina (1:10000).

Anticorpos utilizados

Ac específico para:	Fabricante	Concentração	Ac secundário
AKT	Cell signaling	1:200	Rabbit
AKT-F	Cell signaling	1:500	Rabbit
Arg 1	RD	0,25 µg/mL	Sheep
C/EBP-β	Santa Cruz	1:10000	Rabbit
IκBα	Santa Cruz	1:1000	Rabbit
iNOS	Sigma	1:10000	Rabbit
NF-kB (p65)	Santa Cruz	1:250	Rabbit

3.7 Análises por citometria de fluxo

A análise de citometria de fluxo (FACS, do inglês *Fluorescence activated cell sorting*) foi feita com macrófagos peritoneais, o volume de células foi ajustada à 1×10^6 células e adicionado 2mL de tampão de FACS (PBS 1x, 20 mM de Glicose e 0,5% de BSA), as amostras foram centrifugadas a 400g por 10 minutos á 4 °C, desprezado o sobrenadante. Em seguida, foram adicionados às amostras 1µl dos anticorpos monoclonais de interesse, sendo incubadas por 30 minutos a 4° C. Posteriormente, as células foram lavadas com 2 ml do tampão de FACS e ressuspensas em 80 µl de PBS-Formol a 1%. A fluorescência foi analisada no aparelho FACSCanto II .

Ac específico para:	Fabricante	Concentração
CD11b	eBioscience	0,5 mg/mL
CD206	AbDSerotec	0,25 mg/mL
F4/80	eBioscience	0,5 mg/mL

3.8 Indução do quadro de endotoxemia

O choque endotoxêmico foi induzido através da injeção intravenosa de LPS de membrana de *Escherichia coli* (sorotipo 026:B6, Sigma Chemical Co., St Louis, EUA), dissolvido em solução salina estéril, na doses de 5, 10 e 15 mg/kg de peso corpóreo. Para a obtenção das curvas de sobrevida, os animais foram observados durante três dias após injeção de LPS, o número de camundongos sobreviventes foi anotado a cada 6 horas e expresso em porcentagem.

3.9 Análises estatísticas

Resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (E.P.M.) de 4-6 amostras por grupo. Para análise estatística das curvas de sobrevida foi utilizado o teste Mantel-Cox logrank. A análise dos resultados dos demais resultados foi feita pelo teste de análise de variância (ANOVA ONE-WAY) seguido de Teste Bonferroni com o auxílio do programa GraphPad Prism (GraphPad Software). O nível de significância foi de $P < 0.05$.

4.Resultados

4.1 Resultados

4.1 A via da PI3K γ participa da produção de NO, mas não de TNF- α , em macrófagos estimulados com LPS

O primeiro passo deste trabalho foi avaliar a participação da via da PI3K γ na produção de NO por macrófagos peritoneais ativados com LPS. Para isso, macrófagos peritoneais em cultura derivados de animais WT e PI3K γ ^{-/-} foram incubados com diferentes concentrações (1, 3, 10, 30, 100 e 300 ng/mL) do estímulo. Após 48 horas, a quantidade de nitrito foi determinada no sobrenadante da cultura pela reação de Griess (Green et al., 1981). De maneira interessante, a produção de nitrito por macrófagos PI3K γ ^{-/-} foi significativamente menor após ativação com 30, 100 e 300 ng/mL de LPS quando comparados aos macrófagos WT (Figura 3). A partir desse resultado a concentração de 100 ng/mL de LPS foi selecionada para os próximos experimentos. Ao contrário do que observado para a produção de NO, a produção de TNF- α por estes macrófagos não diferiu entre os grupos WT e PI3K γ ^{-/-} (Figura 4).

Figura 3: Participação da via PI3K γ na produção de óxido nítrico por macrófagos peritoneais estimulados com LPS. Macrófagos (5×10^5 células/poço) obtidos da cavidade peritoneal de camundongos WT e PI3K $\gamma^{-/-}$, foram colocados em placas de 96 poços. Os macrófagos foram estimulados com LPS em diferentes concentrações. A concentração de nitrito foi avaliada no sobrenadante após 48 horas de estímulo por meio da reação de Griess. Os resultados foram analisados por ANOVA seguido de Bonferrone e estão expressos pela média $\pm$ E.P.M. (**P<0,001; n=4, representativo de 3 experimentos)

Figura 4: A via da PI3K γ não influencia a produção de TNF- α por macrófagos peritoneais estimulados com LPS. Macrófagos (5×10^5 células/poço) obtidos da cavidade peritoneal de camundongos WT e PI3K $\gamma^{-/-}$, foram colocados em placas de 96 poços. Os macrófagos foram estimulados ou não com 100 ng/mL LPS por 6, 12 e 24 horas. A concentração de TNF- α no sobrenadante foi realizada pelo método de ELISA. Os resultados foram analisados por ANOVA seguido de Bonferroni e estão expressos pela média $\pm$ E.P.M (n=6, representativo de 3 experimentos)

4.2 Macrófagos peritoneais de animais WT e deficientes da PI3K γ possuem características fenotípicas similares

Com o intuito de verificar se os macrófagos peritoneais derivados de animais WT e PI3K γ ^{-/-} possuem características quantitativas e fenotípicas similares, foi feita a caracterização dessas células através da avaliação da expressão dos marcadores superficiais de macrófagos F4/80, CD11b e o marcadores específico de macrófagos M2, o CD206. Também foi analisada a expressão de proteínas normalmente expressas em macrófagos M2, C/EBP β , arginase; e iNOS, que é marcador para macrófagos M1. A expressão dos marcadores celulares foi determinada por FACS e a expressão de proteínas pela técnica de *western blotting*. Através da marcação para F4/80 e CD11b, encontramos que dentre as células totais extraídas da cavidade peritoneal de camundongos WT e PI3K γ ^{-/-} a proporção de células CD11b⁺/F4/80⁺ é similar em ambos os grupos (figura 5), mostrando assim que a PI3K γ não influencia na porcentagem de macrófagos peritoneais. Sabendo que a proporção de macrófagos não se altera nos dois grupos, investigamos se esses macrófagos poderiam apresentar características fenotípicas diferentes. Neste sentido, foi observado que a porcentagem de macrófagos expressando CD206 foi semelhante em ambos os grupos (figura 6). Além disso, a expressão de arginase 1 e C/EBP β não difere entre os grupos e ambos não apresentam expressão de iNOS (Figura 7). Estes resultados sugerem a grosso modo que os macrófagos derivados de animais WT e PI3K γ ^{-/-} apresentam características quantitativas e qualitativas semelhantes, não sendo estes fatores responsáveis pela diminuição da produção de NO.

Figura 5: Quantificação das células peritoneais de camundongos WT e PI3K^γ^{-/-}. Macrófagos obtidos da cavidade peritoneal de camundongos WT e PI3K^γ^{-/-}, foram marcados com anticorpos específicos e foi analisada a fluorescência por citometria de fluxo comparando a porcentagem de células F4/80, CD11b em macrófagos de camundongos WT e PI3K^γ^{-/-}. Os resultados foram analisados por ANOVA seguido de Bonferroni e estão expressos pela média ± E.P.M (n=4)

Figura 6: Fenotipagem das células peritoneais de camundongos WT e PI3K γ ^{-/-} induzidas pelo tioglicolato. Macrófagos obtidos da cavidade peritoneal de camundongos WT e PI3K γ ^{-/-}, foram marcados com anticorpos específicos e foi analisada a fluorescência por citometria de fluxo comparando porcentagem de células CD206 dentro da população de F4/80, CD11b em macrófagos de camundongos WT e PI3K γ ^{-/-}. Os resultados foram analisados por ANOVA seguido de Bonferroni e estão expressos pela média $\pm$ E.P.M (n=4)

Figura 7: A expressão de iNOS, ARG 1, C/EBPβ não diferem em macrófagos peritoneais de camundongos WT e PI3K γ . Macrófagos obtidos da cavidade peritoneal de camundongos WT e PI3K γ ^{-/-}. A partir das proteínas extraídas realizou-se *western blot* para quantificação da iNOS, ARG 1 e C/EBPβ. **A:** bandas representativas do *western blotting* **B:** gráficos referentes às imagens acima. Os resultados foram analisados por ANOVA seguido de Bonferroni e estão expressos pela média $\pm$ E.P.M (n=4)

4.3 A via PI3K γ participa da indução de expressão de iNOS em macrófagos estimulados com LPS

Nosso próximo passo foi determinar se a falha na produção de nitrito nos macrófagos PI3K γ ^{-/-} estimulados com LPS seria devido a redução na expressão da enzima iNOS. Para isso determinamos inicialmente o tempo em que ocorre a maior expressão da enzima em macrófagos WT estimulados com 100 ng/mL de LPS. Foi observado que o melhor período seria o de 24 horas após a estimulação (Figura 8A). Quando comparada a expressão de iNOS entre macrófagos WT e PI3K γ ^{-/-}, foi observado uma diminuição significativa na expressão de iNOS em macrófagos PI3K γ ^{-/-} estimulados com LPS quando comparado ao grupo WT (Figura 8B).

Figura 8: A $PI3K\gamma$ influencia na expressão de iNOS em macrófagos estimulados com LPS. Macrófagos (1×10^7 células/poço) obtidos da cavidade peritoneal de camundongos WT e $PI3K\gamma^{-/-}$, foram colocados em placas de 12 poços. Os macrófagos foram estimulados ou não com 100 ng/mL LPS por 6, 12 e 24 horas. A célula aderente foi coletada com tampão específico. A partir das proteínas extraídas realizou-se *western blotting* para quantificação da iNOS. **A:** obtenção do tempo de maior expressão de iNOS. **B:** comparando a expressão de iNOS em macrófagos de camundongos WT e $PI3K\gamma^{-/-}$, 24 horas após estímulo ou não com LPS. Os resultados foram analisados por ANOVA seguido de bonferroni e estão expressos pela média $\pm$ E.P.M (***) $P < 0,001$; $n=3$).

4.4 A PI3K γ não influencia na expressão da arginase 1 e produção de ureia em macrófagos estimulados com LPS

A arginase e a iNOS são enzimas que compartilham o mesmo substrato a L-arginina. Quando a arginase é ativada o produto final é ureia e ornitina enquanto a ativação da iNOS resulta na produção de NO e L-citrulina (MacMicking et al., 1997). Desse modo, avaliamos se macrófagos provenientes do peritônio de animais PI3K $\gamma^{-/-}$ produzem menos NO por apresentarem maior expressão de arginase. Para isso, inicialmente pela técnica de *western blotting*, determinamos o tempo em que ocorre a maior expressão de arginase 1 em macrófagos WT estimulados com 100ng/mL de LPS e não foi observado diferença nos distintos tempos de estímulo (Figura 9A). Estipulamos então o período o de 24 horas, para análise da expressão de arginase 1 e não observamos diferença na expressão de arginase 1 em macrófagos PI3K $\gamma^{-/-}$ após estímulo quando comparado ao WT (figura 9B).

Apesar de não diferir na expressão, a arginase, poderia estar mais ativa em macrófagos PI3K γ , e sendo assim foi feita a dosagem da ureia, onde podemos observar que a atividade em ambos os grupos era semelhante (Figura 10).

Figura 9: A PI3K γ não influencia na expressão de ARG 1 em macrófagos estimulados com LPS. Macrófagos obtidos da cavidade peritoneal de camundongos WT e PI3K $\gamma^{-/-}$, foram colocados em placas de 12 poços (1×10^7 células/poço). Os macrófagos foram estimulados ou não com 100 ng/mL LPS por 6, 12 e 24 horas. A célula aderente foi coletada com tampão específico. A partir das proteínas extraídas realizou-se *western blot* para quantificação da ARG 1. **A:** obtenção do tempo de maior expressão de ARG 1. **B:** comparando a expressão de ARG 1 em macrófagos de camundongos WT e PI3K $\gamma^{-/-}$, 24 horas após estímulo ou não com LPS. Os resultados foram analisados por ANOVA seguido de bonferroni e estão expressos pela média $\pm$ E.P.M (n=3).

Figura 10: A via PI3K γ não influencia na produção de ureia em macrófagos estimulados com LPS. Macrófagos obtidos da cavidade peritoneal de camundongos WT e PI3K $\gamma^{-/-}$, foram colocados em placas de 96 poços (5×10^5 células/poço). Os macrófagos foram estimulados com LPS em diferentes concentrações. A concentração de ureia foi avaliada no sobrenadante após 48 horas de estímulo através do kit para dosagem de ureia (labtest). Os resultados foram analisados por ANOVA seguido de bonferrone e estão expressos pela média $\pm$ E.P.M (n=4, representativo de 3 experimentos).

4.5 O bloqueio farmacológico da PI3K γ e AKT diminui a expressão de iNOS em macrófagos estimulados com LPS

Visto que observamos uma redução da expressão da iNOS nos macrófagos peritoneais provenientes de camundongos PI3K $\gamma^{-/-}$, avaliamos se o bloqueio farmacológico da via poderia produzir o mesmo efeito em macrófagos WT. Para isso a expressão da iNOS foi quantificada por *western blotting*, em macrófagos de camundongos WT tratados com um inibidor seletivo da PI3K γ (AS605240) ou da AKT (AKT IV) e posteriormente estimulados com 100 ng/ml de LPS. Observamos que assim como acontece nos animais deficientes da PI3K γ , a inibição farmacológica da via PI3K γ /AKT reduz a expressão de iNOS em macrófagos WT, reforçando uma possível dependência da via para expressão da enzima (figura 11).

Figura 11: O bloqueio farmacológico da PI3K γ e AKT diminui a expressão de iNOS em macrófagos estimulados com LPS. Macrófagos (1×10^7 células/poço) obtidos da cavidade peritoneal de camundongos WT, foram colocados em placas de 12 poços. Os macrófagos foram estimulados ou não com 100 ng/mL LPS por 24 horas na presença de inibidor da PI3K γ (AS605240) ou inibidor da AKT (inibidor de AKT IV) (10 μ M). A célula aderente foi coletada com tampão específico. A partir das proteínas extraídas realizou-se *western blotting* para quantificação da iNOS. Os resultados foram analisados por ANOVA seguido de Bonferroni e estão expressos pela média $\pm$ E.P.M (*** $P < 0,001$; $n = 3$).

4.6 A fosforilação de AKT após estímulo com LPS é um evento dependente da PI3K γ

Partimos então para a investigação dos mecanismos pelos quais a ausência da PI3K γ estaria afetando a produção de NO. Tendo descartado a participação da arginase 1 nesse processo, avaliamos então a expressão/fosforilação de moléculas *downstream* à ativação de PI3K γ , utilizando a técnica *western blotting*, iniciando pelo principal alvo dessa enzima, AKT. Inicialmente determinamos o tempo em que ocorre a maior fosforilação da AKT em macrófagos WT estimulados com 100 ng/mL de LPS e foi observado o melhor período como sendo o de 12 horas (Figura 12A). A seguir foi analisada a fosforilação de AKT em macrófagos WT e PI3K $\gamma^{-/-}$, onde observamos uma diminuição significativa na fosforilação de AKT em macrófagos PI3K $\gamma^{-/-}$ após estímulo quando comparado ao WT (Figura 12B). Foi observado que a presença ou não da PI3K γ não influencia na quantidade de AKT total, porém, a fosforilação da proteína após estímulo com LPS parece ser um evento dependente da PI3K γ e só ocorre na presença de tal enzima.

Figura 12: A fosforilação de AKT após estímulo com LPS é um evento dependente da PI3K γ . Macrófagos (1×10^7 células/poço) obtidos da cavidade peritoneal de camundongos WT e PI3K $\gamma^{-/-}$, foram colocados em placas de 12 poços. Os macrófagos foram estimulados ou não com 100 ng/mL LPS por 6, 12 e 24 horas. A célula aderente foi coletada com tampão específico. A partir das proteínas extraídas realizou-se *western blotting* para quantificação da AKT. **A:** obtenção do tempo de maior fosforilação da AKT. **B:** comparando a expressão de AKT fosforilada em macrófagos de camundongos WT e PI3K $\gamma^{-/-}$, 12 horas após estímulo ou não com LPS. Os resultados foram analisados por ANOVA seguido de Bonferroni e estão expressos pela média $\pm$ E.P.M (* $P < 0,05$; ** $p < 0,1$; $n = 3$)

4.7 A PI3K γ influencia na expressão de I κ B α em macrófagos estimulados com LPS

Sendo o NF- κ B uma importante via de indução da expressão de iNOS, que tem como forma de ativação a via da PI3K γ , verificamos se a deficiência da via PI3K γ estaria influenciando a via do NF- κ B através da expressão da proteína I κ B α , proteína inibidora da atividade do NF- κ B. Analisamos a expressão de I κ B α no lisado de cultura de macrófagos peritoneais de camundongos WT e PI3K $\gamma^{-/-}$ na presença de estímulo com LPS. Notamos uma redução na expressão de I κ B α nos macrófagos de camundongos PI3K $\gamma^{-/-}$ estimulados com LPS (figura 13).

Figura 13: A PI3K γ influencia a expressão de IκBα em macrófagos peritoneais estimulados com LPS. Macrófagos (1×10^7 células/poço) obtidos da cavidade peritoneal de camundongos WT e PI3K $\gamma^{-/-}$, foram colocados em placas de 12 poços. Os macrófagos foram estimulados ou não com 100 ng/mL LPS por 12 horas. A célula aderente foi coletada com tampão específico. A partir das proteínas extraídas realizou-se *western blotting* para quantificação da IκBα. Comparando a expressão de IκBα em macrófagos de camundongos WT e PI3K $\gamma^{-/-}$, 12 horas após estímulo ou não com LPS. Os resultados foram analisados por ANOVA seguido de Bonferroni e estão expressos pela média $\pm$ E.P.M (** $p < 0,1$; $n = 3$).

4.8 A via da PI3K γ participa da ativação da via clássica do NF- κ B

Para avaliarmos a ativação do NF- κ B, a expressão da subunidade p65 foi quantificada no núcleo dos macrófagos após estímulo com LPS, a partir da técnica de *western blotting*. Primeiramente foi feita uma curva temporal, apenas com macrófagos provenientes de camundongos WT, onde determinamos o tempo de maior expressão de p65 nuclear após estímulo com LPS 100ng/mL. Observamos maior expressão após 12 horas de estímulo (figura 14A). Esse período foi utilizado para avaliar a expressão de p65 nuclear em macrófagos de animais WT e PI3K γ ^{-/-}, e verificamos que os macrófagos de camundongos PI3K γ ^{-/-} apresentam menor expressão de p65 nuclear (Figura 14B), sugerindo que PI3K γ ^{-/-} modula a expressão de iNOS por modular a via de NF- κ B.

Figura 14: A via da PI3K γ participa da ativação da via clássica do NF- κ B.

Macrófagos obtidos da cavidade peritoneal de camundongos WT e PI3K $\gamma^{-/-}$, foram colocados em placas de 12 poços (1×10^7 células/poço). Os macrófagos foram estimulados ou não com 100 ng/mL LPS por 6, 12 e 24 horas. A célula aderente foi coletada com tampão específico, foi obtido o extrato celular. A partir das proteínas nucleares realizou-se *western blotting* para quantificação da p65. **A:** obtenção do tempo de maior expressão nuclear de p65. **B:** comparando a expressão de p65 nuclear em macrófagos de camundongos WT e PI3K $\gamma^{-/-}$, 12 horas após estímulo ou não com LPS. Os resultados foram analisados por ANOVA seguido de Bonferroni e estão expressos pela média $\pm$ E.P.M (** $p < 0,1$; $n=3$).

4.9 A toxina pertussis diminui a expressão da iNOS em macrófagos peritoneais estimulados com LPS

Com intuito de verificar de que forma o LPS esta ativando a via $PI3K\gamma$, e sabendo que sua ativação ocorre via GPCRs, utilizamos a PTX para verificar a consequência da inibição dos GPCRs ($G_i\alpha$ e $G_o\alpha$) na expressão de iNOS por macrófagos estimulados com LPS. A PTX foi adicionada a cultura de macrófagos peritoneais na concentração de 500 ng/mL e 10 minutos após foi adicionado o LPS (100 ng/mL), após 24 horas as células foram coletadas e foi analisada a expressão de iNOS por *western blotting*. Observamos que os macrófagos incubados com PTX tem diminuição na expressão de iNOS quando comparados com os macrófagos que receberam somente estímulo com LPS (Figura 15), sugerindo que a ativação da $PI3K\gamma$ via GPCRs esteja envolvida na modulação da expressão da iNOS.

Figura 15: A toxina pertussis diminui a expressão da iNOS em macrófagos peritoneais estimulados com LPS. Macrófagos (1×10^7 células/poço) obtidos da cavidade peritoneal de camundongos WT, foram colocados em placas de 12 poços. Os macrófagos foram estimulados ou não com 100 ng/mL LPS por 24 horas na presença de 500 ng/mL de PTX. A célula aderente foi coletada com tampão específico. A partir das proteínas extraídas realizou-se *western blotting* para quantificação da iNOS. Comparando a expressão da iNOS em macrófagos de camundongos WT na presença ou não de TPX, 12 horas após estímulo ou não com LPS. Os resultados foram analisados por ANOVA seguido de Bonferroni e estão expressos pela média $\pm$ E.P.M (** $P < 0,001$; $n=3$).

4.10 Macrófagos de camundongos deficientes de receptor de PAF (PAFR) possuem maior produção de NO e expressão de iNOS mas não diferem na expressão de arginase 1 após estímulo com LPS

Com a finalidade de verificar se a ausência de sinalização de GPCRs específicos afeta a sinalização via PI3K γ e consequente expressão de iNOS, investigamos a produção de NO (Figura 16) expressão dessa enzima em macrófagos provenientes de camundongos deficientes em PAFR (PAFR^{-/-}) após estímulo com LPS. Foram utilizados macrófagos provenientes de camundongos WT e PAFR^{-/-} para a análise da expressão de iNOS. Foi adicionado a cultura de macrófagos peritoneais 100 ng/mL LPS, e após 24 horas, a expressão de iNOS foi analisada por *western blotting*. Surpreendentemente, os macrófagos provenientes de PAFR^{-/-} apresentaram maior expressão de iNOS quando comparado aos macrófagos dos camundongos WT (Figura 17A). Já a expressão de arginase 1 não difere entre os grupo (Figura 17B).

Figura 16: O PAFR influencia na produção de óxido nítrico por macrófagos peritoneais estimulados com LPS. Macrófagos (1×10^7 células/poço) obtidos da cavidade peritoneal de camundongos WT e PAFR^{-/-} foram colocados em placas de 12poços. Os macrófagos foram estimulados com 100 ng/mL de LPS. A concentração de nitrito foi avaliada no sobrenadante após 24 horas de estímulo por meio da reação de Griess. Os resultados foram analisados por ANOVA seguido de Bonferrone e estão expressos pela média $\pm$ E.P.M (**P<0,001; n=3)

Figura 17: O PAFR influencia a expressão de iNOS, mas não de arginase 1 em macrófagos peritoneais estimulados com LPS. Macrófagos (1×10^7 células/poço) obtidos da cavidade peritoneal de camundongos WT e PAFR^{-/-}, foram colocados em placas de 12 poços. Os macrófagos foram estimulados ou não com 100 ng/mL LPS por 24 horas. A célula aderente foi coletada com tampão específico. A partir das proteínas extraídas realizou-se *western blotting* para quantificação da iNOS e arginase 1. **A:** Comparando a expressão de iNOS em macrófagos de camundongos WT e PAFR^{-/-}, 24 horas após estímulo ou não com LPS. **B:** Comparando a expressão de iNOS em macrófagos de camundongos WT e PAFR^{-/-}, 24 horas após estímulo ou não com. Os resultados foram analisados por ANOVA seguido de Bonferroni e estão expressos pela média $\pm$ E.P.M. (***) $P < 0,001$; $n = 3$).

4.11 Macrófagos de camundongos deficientes de CCR2 possuem menor expressão de iNOS após estímulo com LPS

Assim como o PAFR, o CCR2 também é um GPCR e então investigamos a expressão da iNOS em macrófagos provenientes de camundongos deficientes em CCR2 (CCR2^{-/-}) após estímulo com LPS. Foi adicionado a cultura de macrófagos peritoneais 100 ng/mL de LPS, e após 24 horas, foi analisada expressão de iNOS por *western blotting*. Os macrófagos provenientes de camundongos CCR2^{-/-} apresentaram menor expressão de iNOS quando comparado aos macrófagos dos camundongos WT, sugerindo que esse possa ser um dos receptores que esteja envolvido na ativação da via PI3K γ (Figura 18). Foi quantificada a produção de MCP1 quimiocina ligante de CCR2, na qual não foi observada diminuição na sua da quimiocina na ausência da PI3K γ e do CCR2 (Figura 19).

Figura 18: Macrófagos peritoneais de camundongos CCR2^{-/-} possuem menor expressão de iNOS após estímulo com LPS. . Macrófagos (1×10^7 células/poço) obtidos da cavidade peritoneal de camundongos WT e CCR2^{-/-}, foram colocados em placas de 12 poços. Os macrófagos foram estimulados ou não com 100 ng/mL LPS por 24 horas. A célula aderente foi coletada com tampão específico. A partir das proteínas extraídas realizou-se *western blotting* para quantificação da iNOS. Comparando a expressão de iNOS em macrófagos de camundongos WT e CCR2^{-/-}. 24 horas após estímulo ou não com LPS. Os resultados foram analisados por ANOVA seguido de Bonferroni e estão expressos pela média $\pm$ E.P.M (***) $P < 0,001$; $n=3$).

Figura 19: A ausência via da PI3K_γ ou CCR2 não influencia a produção de MCP1 por macrófagos peritoneais estimulados com LPS. Macrófagos (1×10^7 células/poço) obtidos da cavidade peritoneal de camundongos WT, CCR2 e PI3K_γ^{-/-}, foram colocados em placas de 12 poços. Os macrófagos foram estimulados com 100 ng/mL LPS por 24 horas. A concentração de MCP1 no sobrenadante foi realizada pelo método de ELISA. Os resultados foram analisados por ANOVA seguido de Bonferrone e estão expressos pela média $\pm$ E.P.M (**P<0,001; n=3).

4.12 O grupo de animais PI3K γ ^{-/-} apresenta maior sobrevida em quadro de endotoxemia induzida por LPS

Uma vez que a expressão da iNOS e consequente produção de NO tem um importante papel na fisiopatologia do choque endotóxico, avaliamos se nossos achados *in vitro* poderiam ter alguma relevância em um modelo *in vivo* dessa doença (Revisado por Titheradge, 1999a). Para avaliar a participação da PI3K γ na evolução do choque endotóxico submetemos animais PI3K γ ^{-/-} a dose letal de LPS (i.v.). Avaliamos a dose de LPS que resultaria na mortalidade de 100% (dose letal) dos animais WT, e foi realizada uma curva de sobrevida utilizando 5, 10, 15 mg/Kg de LPS por animal. Foi observado que a dose de 15 mg/Kg i.v. seria mais adequada para indução de choque endotóxico letal (Figura 17A). O próximo passo foi submeter os animais PI3K γ ^{-/-} e WT a dose letal de LPS e proceder a análise de sobrevida. Foi observado maior sobrevida em animais PI3K γ ^{-/-} (Figura 20B).

Figura 20: Camundongos deficientes em PI3K γ são mais resistentes do que animais WT em modelo de choque endotóxico. **A:** Foi administrado 5, 10 ou 15 mg/Kg de LPS i.v. em camundongos WT. Nas próximas 30 h após o estímulo, o número de animais sobreviventes foi registrado a cada 12 horas. **B:** Foi administrado 15 mg/Kg de LPS i.v. em camundongos WT e PI3K γ . Observado durante 2 dias após estímulo o número de animais sobreviventes foi registrado a cada 6 horas. Os resultados foram expressos como porcentagem de sobrevivência (grupo de 7 a 10 animais). Os resultados foram analisados por Mantel-Cox logrank. e estão expressos pela média $\pm$ E.P.M (* $P < 0,05$).

4.13 Animais $PI3K\gamma^{-/-}$ produzem menos NO em quadro de endotoxemia induzida por LPS

Para analisar a participação da $PI3K\gamma$ na produção de NO *in vivo*, LPS foi administrado na dose 15mg/Kg i.v, em camundongos WT e $PI3K\gamma^{-/-}$ e dez horas após foi feita a coleta de sangue para processamento e obtenção do plasma. Observamos que a produção de nitrito é significativamente menor em animais $PI3K\gamma^{-/-}$ (figura 21)

Figura 21: Animais $PI3K\gamma^{-/-}$ produzem menos NO em quadro de endotoxemia induzida por LPS. LPS 15 mg/kg foi administrado i.v. em animais WT e $PI3K\gamma^{-/-}$. A concentração de nitrito foi avaliada no plasma, após 10 horas da administração de LPS através da reação de Griess. Os resultados foram analisados por ANOVA seguido de Bonferrone e estão expressos pela média $\pm$ E.P.M (**P<0,001; n=6).

5. Discussão

5 Discussão

Os macrófagos são células pertencentes à imunidade inata que participam da defesa contra infecções através da fagocitose e *killing* dos micro-organismos, além disso, são essenciais para o reparo tecidual após respostas inflamatórias. A ativação de receptores nas células da imunidade inata desencadeia eventos dependentes de distintas vias de sinalização intracelular, dentre as quais, destacam-se as dependentes da PI3K. Dados do nosso grupo demonstram a participação da PI3K γ na produção de NO em macrófagos infectados com *T. cruzi* (estudo não publicado). No entanto, os mecanismos através dos quais a PI3K γ poderia influenciar a produção de NO não foram elucidados. No presente trabalho, demonstramos que a via da PI3K γ possui grande importância na produção de NO e expressão da iNOS em macrófagos estimulados com LPS, o que pode ser resultante da participação da PI3K γ na ativação do NF-kB. Ainda, demonstramos que a ativação da AKT deve depender da estimulação do receptor CCR2 por um de seus ligantes, o MCP-1.

O NO é um dos principais mediadores da imunidade inata e sua produção através da iNOS é desencadeada por diversos estímulos (Revisado por Bogdan, Rollinghoff, & Diefenbach, 2000). Embora a função da PI3K na síntese do NO e expressão de iNOS tenha sido extensivamente estudada através do uso de drogas que inibem esse grupo de enzimas, os estudos apresentam resultados conflitantes (Chen, Fisher, & Wang, 1998; Diaz-Guerra, Castrillo, Martin-Sanz, & Bosca, 1999; Park, Lee, Hong, & Kim, 2002; Park, Lee, Kang, Chung, & Kim, 1997). O primeiro estudo mostrou que macrófagos

peritoneais estimulados com LPS, na presença do inibidor da PI3K wortmannin, apresentam aumento na expressão de iNOS e produção de NO (Park et al., 1997). Posteriormente, foi demonstrado que a produção de NO e expressão da iNOS foi reduzida pela adição de um outro inibidor da PI3K, o LY294002, em cultura de macrófagos RAW2647 estimulados com IFN γ e LPS (Park et al., 2002). Outro estudo sugere que a PI3K regula negativamente a síntese de NO, pois utilizando elevadas concentrações de wortmanin em macrófagos RAW2647 ocorre aumento da produção de NO e expressão de iNOS por essas células (Diaz-Guerra, Castrillo et al. 1999). Embora as drogas wortmannin e LY294002 sejam conhecidas pela inibição das PI3Ks, as mesmas podem inibir, também, outras quinases dependentes de ATP (Vlahos, Matter, Hui, & Brown, 1994; Wyman et al., 1996). Além disto, elas não apresentam seletividade frente as diferentes isoformas de PI3Ks. De acordo com essas discrepâncias, a utilização de camundongos deficientes para as distintas isoformas da família PI3K é crítica para a determinação do papel dessas enzimas na síntese de NO.

No presente estudo avaliamos a produção de NO por macrófagos peritoneais PI3K $\gamma^{-/-}$ e WT em resposta ao estímulo com LPS. Observamos que macrófagos isolados de animais PI3K $\gamma^{-/-}$ apresentam menor produção de NO. Concomitante às alterações na síntese de NO esperávamos alterações nos níveis de TNF- α , uma vez que vias intracelulares comuns são responsáveis pelo desencadeamento da produção de ambos os mediadores. Além disso, é descrito na literatura a possível participação da PI3K na produção de TNF- α (Xu et al., 2013). Biswas e Sodhi (2002) demonstraram que macrófagos peritoneais tratados com wortmannin estimulados com MCP-1 produzem menos TNF- α , o que sugere o envolvimento da PI3K na produção dessa

citocina. Posteriormente, foi demonstrado que o tratamento com o PIK-75, inibidor das isoformas PI3K α e γ , em camundongos submetidos à colite experimental, resulta na diminuição dos níveis de TNF- α (Dagia et al., 2010). No presente estudo demonstramos que macrófagos peritoneais deficientes em PI3K γ e estimulados com LPS não diferem dos selvagens em relação à produção de TNF- α . Essas aparentes contradições podem ser atribuídas, em parte, aos diferentes modelos e estímulos empregados e, também, ao fato de os inibidores da PI3K não serem específicos para a PI3K γ , podendo agir nas outras isoformas desse grupo de enzimas, e até mesmo sobre outras quinases.

A ausência da PI3K γ não modifica a migração e a polarização dos macrófagos após estímulo com tioglicolato, uma vez que a quantidade de macrófagos que migram para a cavidade peritoneal e a polarização dos mesmos são similares entre os camundongos WT e PI3K $\gamma^{-/-}$. Além disso, observamos que após o estímulo com tioglicolato, macrófagos provenientes de ambos os camundongos apresentam uma tendência a M2, com alta expressão de arginase e CD206. Esses resultados sugerem que a administração de tioglicolato é favorável para a polarização de macrófagos do perfil M2. O fato de não haver diferenças tanto na migração dos macrófagos quanto em suas características fenotípicas reforça a hipótese do envolvimento direto da PI3K γ na expressão da iNOS e produção de NO. Nossos dados corroboram com os estudos que defendem a relação positiva entre a ativação da PI3K e expressão da iNOS no contexto inflamatório (Salh, Wagey, Marotta, Tao, & Pelech, 1998; Xia et al., 2012).

A produção de NO tem como principal substrato a L-arginina. A arginase é uma enzima essencial ao ciclo da ureia, cuja reação também requer a arginina. Desse modo, em condições de desequilíbrio do metabolismo celular, pode haver a competição entre a arginase e a iNOS pela arginina (Mori & Gotoh, 2004). Uma possível maior expressão da arginase na ausência de PI3K γ poderia justificar o motivo pelo qual ocorre menor produção de NO. Avaliamos a expressão de arginase nos macrófagos e níveis de ureia no sobrenadante da cultura. Verificamos que tanto a expressão da enzima quanto a quantidade de seu produto foram similares entre os macrófagos isolados de animais PI3K $\gamma^{-/-}$ e WT. Portanto, pode-se sugerir que, no nosso modelo, o declínio na produção de NO não seja por motivos indiretos como o possível efeito competitivo pela arginina entre as enzimas arginase e iNOS.

Demonstramos que o estímulo com LPS resulta na ativação da AKT em macrófagos WT, o que ocorre com intensidade significativamente menor nos macrófagos PI3K $\gamma^{-/-}$, indicando que a isoforma γ das enzimas PI3Ks, é essencial para a fosforilação de AKT, pelo menos nos tempos avaliados. Dados da literatura descrevem a importância das PI3Ks na ativação da AKT, mas estudos isolados com cada isoforma desse grupo de enzimas ainda não foram apresentados (Burgering & Coffey, 1995).

A AKT é sugerida como reguladora da atividade do fator de transcrição NF- κ B através do aumento da atividade da IKK, que por sua vez fosforila a subunidade inibitória do NF- κ B, I κ B, o que resulta na sua subsequente degradação, possibilitando a migração do NF- κ B ativo para o núcleo (Bai, Ueno, & Vogt, 2009a). O NF- κ B é um fator de transcrição crítico para a

expressão da iNOS e produção de NO (Xie, Kashiwabara, & Nathan, 1994). A quantificação de I κ B correlaciona-se com a atividade nuclear do NF- κ B, uma vez que após degradação dessa proteína, o próprio NF- κ B induz expressão do gene responsável pela sua produção, restabelecendo os níveis citoplasmáticos de I κ B (Brown, Park, Kanno, Franzoso, & Siebenlist, 1993). Nesse sentido, com a finalidade de investigar a dinâmica de ativação do NF- κ B no nosso modelo, avaliamos a expressão de I κ B nos macrófagos WT e PI3K γ ^{-/-}. De fato, a expressão de I κ B nos macrófagos PI3K γ ^{-/-} mostrou-se reduzida, sugerindo que a diminuição na expressão de I κ B seja resultante da deficiência na ativação do NF- κ B nessas células. Esses resultados corroboram com os trabalhos que descrevem a interação da cascata de sinalização do NF- κ B com as vias PI3K/AKT (Kane, Shapiro, Stokoe, & Weiss, 1999). No entanto, a participação específica da PI3K γ na ativação do NF- κ B ainda não foi descrita. Sugerimos, com esses resultados, que a PI3K γ participa da regulação da produção de NO através da iNOS por contribuir para a ativação do NF- κ B.

É descrito na literatura que o LPS não ativa, diretamente, a PI3K γ . O LPS é principalmente reconhecido via CD14 e TLR4, por outro lado, as vias que resultam na ativação da PI3K γ são iniciadas após estímulo de GPCRs (Peri, Piazza, Calabrese, Damore, & Cighetti, 2010; Stoyanov et al., 1995). Não sendo a ativação de TLR uma via ativadora da PI3K γ , avaliamos se produtos resultantes dessa via estariam promovendo a ativação da PI3K γ via GPCRs. Utilizamos a PTX para promover o bloqueio dos GPCRs dos tipos G_i e G₀ em macrófagos WT e observamos que essa toxina é capaz de inibir a expressão de iNOS nessas células, confirmando que os GPCRs, e não TLR estão

envolvidos na ativação da PI3K γ , e nos eventos subsequentes. Para complementar esses dados, analisamos a expressão da iNOS e produção de NO em macrófagos isolados de animais deficientes no receptor para PAF (PAFR) que podem ser acoplados a proteína G do tipo G_i, G_s e G_q. Surpreendentemente, macrófagos derivados de animais deficientes do receptor de PAF apresentam maior expressão de iNOS e produção de NO, excluindo assim o papel deste receptor na ativação da via PI3K γ em nosso modelo. Pelo fato de o PAFR ser também do tipo acoplado à G_q, uma vez que essa via resulta na ativação da fosfolipase C (PLC, do inglês *phospholipase C*), que consome PIP2 clivando-o em diacilglicerol (DAG, do inglês *diacylglycerol*) e inositol trifosfato (IP3, do inglês *inositol triphosphate*) (Revisado por Szumilo & Rahden-Staron, 2008), pode ser que a mesma seja desfavorável à ativação da PI3K γ , pelo fato de o PIP2 ser também um substrato para PI3K γ . Portanto, com a ausência do PAFR a via da PI3K γ pode estar mais ativa, pela maior disponibilidade de PIP2, com consequente aumento da expressão de iNOS e produção de NO. De fato, foi demonstrado que o PAF regula negativamente a produção de NO em macrófagos peritoneais de animais submetidos à peritonite (Steil, Garcia Rodriguez, Alonso, Crespo, & Bosca, 1995). No entanto, contrários aos nossos dados estão os achados de Szabo et al (1993), que demonstram que o PAF resulta na maior indução de NOS após administração de LPS; e achados de Casals-Stenzel (1987), que mostram atenuação da expressão da iNOS após administração de LPS com a utilização de antagonista de PAFR. É válido ressaltar que esses resultados contraditórios possam ter sido obtidos devido à utilização de distintos modelos. Podemos afirmar ainda que em macrófagos isolados de animais PAFR^{-/-}, o aumento da

expressão de iNOS e produção de NO não ocorrem por desequilíbrio na expressão de arginase, pois essa enzima, após estímulo com LPS, encontra-se similarmente expressa em macrófagos WT e PAFR^{-/-}. Estudos estão sendo realizados em nosso laboratório para analisar o papel do PAFR na modulação da expressão da iNOS.

Desse modo, MCP1 produzida em resposta ao LPS poderiam estar ativando PI3K γ via seus receptores. Para investigar essa hipótese, avaliamos a expressão da iNOS em macrófagos isolados de camundongos CCR2^{-/-}, um receptor altamente expresso na superfície de macrófagos (Kurihara, Warr, Loy, & Bravo, 1997). Observamos uma diminuição na expressão de iNOS, indicando que a ativação da PI3K γ possa ser resultante da ativação do CCR2. De fato, foi demonstrado que macrófagos peritoneais CCR2^{-/-} são deficientes na expressão da iNOS após estímulo com LPS e INF γ (Gomes et al., 2013). Dados contraditórios aos nossos resultados sugerem MCP1/CCR2 como protetores na lesão pulmonar através da supressão da iNOS (Okuma et al., 2006). Sendo a MCP1 uma quimiocina ligante para CCR2, avaliamos a produção da mesma por macrófagos estimulados com LPS. Os macrófagos WT, CCR2^{-/-} e PI3K γ ^{-/-} possuem aumento similar na produção dessa quimiocina em resposta ao LPS. Nossos resultados sugerem que o MCP1 possa estar ativando o CCR2, o que leva à ativação da PI3K γ , que por sua vez favorece a ativação do NF- κ B, levando às alterações na produção de NO.

O NO é um mediador importante na resposta inflamatória a infecções, pois tem papel central na capacidade microbicida dos fagócitos; promove vasodilatação local; previne a adesão plaquetária e leucocitária; e aumenta do

fluxo sanguíneo na microcirculação. No entanto, em uma resposta inflamatória sistêmica, a produção exagerada de NO pela ativação da iNOS contribui para as características fisiopatológicas da sepse e do choque séptico. Embora seja essencial para a atividade microbicida de células fagocíticas, o NO apresenta papel deletério na migração dos neutrófilos ao foco infeccioso. Além disso, a produção demasiada de NO é associada com as alterações hemodinâmicas e disfunção miocárdica observadas durante a sepse (Fernandes & Assreuy, 2008; Titheradge, 1999b).

As infecções bacterianas possuem considerável relevância epidemiológica na sepse. A resposta inflamatória sistêmica às bactérias Gram-negativas ocorre predominantemente em resposta ao LPS. Devido a isso, uma boa ferramenta para o estudo dessa resposta é a administração de LPS em animais. Foi descrito, em modelo de sepse polimicrobiana, que o grupo de animais deficientes em PI3K γ apresenta maior sobrevida, o que demonstra a importância dessa enzima na fisiopatologia da sepse (Martin et al., 2010; Titheradge, 1999a). No entanto, a participação dessa via na produção de NO em modelo de sepse polimicrobiana não foi demonstrada pelos autores. Para investigar o efeito da PI3K γ na produção de NO *in vivo*, submetemos os animais PI3K $\gamma^{-/-}$ ao modelo de endotoxemia induzida pela administração de LPS. Primeiramente, fizemos a análise de sobrevida. Observamos que o grupo de animais PI3K $\gamma^{-/-}$ apresenta maior sobrevida ao choque endotóxico, o que pode estar relacionada com a menor produção de NO. No entanto, foi demonstrado que o grupo de animais deficientes para outra isoforma da enzima, a PI3K δ , teve menor sobrevida após a administração de LPS (Aksoy et al., 2012; Aksoy et al., 2012). Essa aparente divergência de resultados pode ser

explicada pela utilização de distintas isoformas da PI3K nos trabalhos citados e, ainda, reforça a hipótese da função da PI3K γ na produção de NO. Para confirmar o envolvimento do NO nesse fenômeno, avaliamos a produção de NO nos animais PI3K $\gamma^{-/-}$ submetidos à endotoxemia. Observamos que, na condição de deficiência em PI3K γ , não ocorre aumento nos níveis de NO como observado no grupo WT. Acrescentamos que, devido ao fato de a produção de NO durante a sepse e o choque séptico ocorrer sistemicamente por distintas células e sistemas e, no nosso estudo, ter sido praticamente abolida pela deficiência da PI3K γ após indução da endotoxemia, podemos sugerir que a influência da PI3K γ na produção de NO ocorra em diversos tipos celulares, não apenas em macrófagos.

6. Conclusão

6 Conclusão

Com base nos resultados apresentados, pode-se sugerir que a ativação da via da PI3K γ /AKT esta envolvida na expressão de iNOS e produção de NO por estimular a ativação da via do NF- κ B em macrófagos peritoneais. Estes resultados demonstram também que a participação da PI3K γ nesse processo parece depender da ativação autocrina do receptor CCR2 por seu ligante MCP-1 (Figura 22). Por fim, os resultados indicam que o bloqueio da via PI3K γ /AKT possa ser um alvo interessante para o controle dos eventos fisiopatológicos inflamatórios, como por exemplo, o choque séptico.

Figura 22: Esquema ilustrativo da ativação da via da PI3K γ em macrófagos peritoneais estimulados por LPS. A ativação dos receptores TLR4 leva a produção precoce de MCP-1 (--- $\rightarrow$ via precoce), que agindo de forma autocrina sobre seu receptor CCR2, leva a estimulação da via PI3K γ /AKT que por sua vez pode ativar a via NF- κ B resultando na síntese de iNOS e produção de NO (— $\rightarrow$ via tardia).

7. Referências Bibliográficas

7 Referências bibliográficas

- Akira, S., Uematsu, S., & Takeuchi, O. 2006. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, 124(4): 783-801.
- Aksoy, E., Taboubi, S., Torres, D., Delbauve, S., Hachani, A., Whitehead, M. A., Pearce, W. P., Berenjeno-Martin, I., Nock, G., Filloux, A., Beyaert, R., Flamand, V., & Vanhaesebroeck, B. 2012. The p110delta isoform of the kinase PI(3)K controls the subcellular compartmentalization of TLR4 signaling and protects from endotoxic shock. *Nat Immunol*, 13(11): 1045-1054.
- Alderton, W. K., Cooper, C. E., & Knowles, R. G. 2001. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *The Biochemical journal*, 357(Pt 3): 593-615.
- Alessi, D. R., Andjelkovic, M., Caudwell, B., Cron, P., Morrice, N., Cohen, P., & Hemmings, B. A. 1996. Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *The EMBO journal*, 15(23): 6541-6551.
- Bai, D., Ueno, L., & Vogt, P. K. 2009a. Akt-mediated regulation of NFkappaB and the essentialness of NFkappaB for the oncogenicity of PI3K and Akt. *Int J Cancer*, 125(12): 2863-2870.
- Biswas, S. K., & Mantovani, A. 2010. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nat Immunol*, 11(10): 889-896.
- Bogdan, C. 2001. Nitric oxide and the immune response. *Nature immunology*, 2(10): 907-916.
- Bogdan, C., Rollinghoff, M., & Diefenbach, A. 2000. The role of nitric oxide in innate immunity. *Immunol Rev*, 173: 17-26.

- Brown, J., Wang, H., Hajishengallis, G. N., & Martin, M. 2011. TLR-signaling networks: an integration of adaptor molecules, kinases, and cross-talk. *J Dent Res*, 90(4): 417-427.
- Brown, K., Park, S., Kanno, T., Franzoso, G., & Siebenlist, U. 1993. Mutual regulation of the transcriptional activator NF-kappa B and its inhibitor, I kappa B-alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90(6): 2532-2536.
- Burgering, B. M., & Coffey, P. J. 1995. Protein kinase B (c-Akt) in phosphatidylinositol-3-OH kinase signal transduction. *Nature*, 376(6541): 599-602.
- Cantley, L. C. 2002. The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science*, 296(5573): 1655-1657.
- Carmody, R. J., & Chen, Y. H. 2007. Nuclear factor-kappaB: activation and regulation during toll-like receptor signaling. *Cellular & molecular immunology*, 4(1): 31-41.
- Chen, Y. Q., Fisher, J. H., & Wang, M. H. 1998. Activation of the RON receptor tyrosine kinase inhibits inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression by murine peritoneal exudate macrophages: phosphatidylinositol-3 kinase is required for RON-mediated inhibition of iNOS expression. *J Immunol*, 161(9): 4950-4959.
- Cross, D. A., Alessi, D. R., Cohen, P., Andjelkovich, M., & Hemmings, B. A. 1995. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature*, 378(6559): 785-789.
- Dagia, N. M., Agarwal, G., Kamath, D. V., Chetrapal-Kunwar, A., Gupte, R. D., Jadhav, M. G., Dadarkar, S. S., Trivedi, J., Kulkarni-Almeida, A. A., Kharas, F., Fonseca, L. C., Kumar, S., & Bhonde, M. R. 2010. A preferential p110alpha/gamma PI3K inhibitor attenuates experimental inflammation by suppressing the production of proinflammatory mediators in a NF-kappaB-dependent manner. *Am J Physiol Cell Physiol*, 298(4): C929-941.

- Diaz-Guerra, M. J., Castrillo, A., Martin-Sanz, P., & Bosca, L. 1999. Negative regulation by phosphatidylinositol 3-kinase of inducible nitric oxide synthase expression in macrophages. *J Immunol*, 162(10): 6184-6190.
- Fernandes, D., & Assreuy, J. 2008. Nitric oxide and vascular reactivity in sepsis. *Shock*, 30 Suppl 1: 10-13.
- Fulton, D., Gratton, J. P., McCabe, T. J., Fontana, J., Fujio, Y., Walsh, K., Franke, T. F., Papapetropoulos, A., & Sessa, W. C. 1999. Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature*, 399(6736): 597-601.
- Gomes, R. N., Teixeira-Cunha, M. G., Figueiredo, R. T., Almeida, P. E., Alves, S. C., Bozza, P. T., Bozza, F. A., Bozza, M. T., Zimmerman, G. A., & Castro-Faria-Neto, H. C. 2013. Bacterial clearance in septic mice is modulated by MCP-1/CCL2 and nitric oxide. *Shock*, 39(1): 63-69.
- Gordon, S. 2003. Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol*, 3(1): 23-35.
- Gordon, S., & Martinez, F. O. 2010. Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. *Immunity*, 32(5): 593-604.
- Gordon, S., & Taylor, P. R. 2005. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol*, 5(12): 953-964.
- Grabowski, P. S., England, A. J., Dykhuizen, R., Copland, M., Benjamin, N., Reid, D. M., & Ralston, S. H. 1996. Elevated nitric oxide production in rheumatoid arthritis. Detection using the fasting urinary nitrate:creatinine ratio. *Arthritis and rheumatism*, 39(4): 643-647.
- Green, L. C., Ruiz de Luzuriaga, K., Wagner, D. A., Rand, W., Istfan, N., Young, V. R., & Tannenbaum, S. R. 1981. Nitrate biosynthesis in man. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 78(12): 7764-7768.

- Hazeki, K., Nigorikawa, K., & Hazeki, O. 2007. Role of phosphoinositide 3-kinase in innate immunity. *Biological & pharmaceutical bulletin*, 30(9): 1617-1623.
- Hirsch, E., Ciruolo, E., Ghigo, A., & Costa, C. 2008. Taming the PI3K team to hold inflammation and cancer at bay. *Pharmacol Ther*, 118(2): 192-205.
- Hobbs, A. J., Higgs, A., & Moncada, S. 1999. Inhibition of nitric oxide synthase as a potential therapeutic target. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 39: 191-220.
- Jean-Baptiste, E. 2007. Cellular mechanisms in sepsis. *Journal of intensive care medicine*, 22(2): 63-72.
- Kane, L. P., Shapiro, V. S., Stokoe, D., & Weiss, A. 1999. Induction of NF-kappaB by the Akt/PKB kinase. *Curr Biol*, 9(11): 601-604.
- Karin, M., & Greten, F. R. 2005. NF-kappaB: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. *Nature reviews. Immunology*, 5(10): 749-759.
- Kawai, T., & Akira, S. 2006. TLR signaling. *Cell death and differentiation*, 13(5): 816-825.
- Kim, D. I., Kim, S. R., Kim, H. J., Lee, S. J., Lee, H. B., Park, S. J., Im, M. J., & Lee, Y. C. 2012. PI3K-gamma inhibition ameliorates acute lung injury through regulation of IkappaBalpha/NF-kappaB pathway and innate immune responses. *Journal of clinical immunology*, 32(2): 340-351.
- Kleinert, H., Euchenhofer, C., Ihrig-Biedert, I., & Forstermann, U. 1996. In murine 3T3 fibroblasts, different second messenger pathways resulting in the induction of NO synthase II (iNOS) converge in the activation of transcription factor NF-kappaB. *The Journal of biological chemistry*, 271(11): 6039-6044.
- Koyasu, S. 2003. The role of PI3K in immune cells. *Nature immunology*, 4(4): 313-319.

- Kubes, P., & McCafferty, D. M. 2000. Nitric oxide and intestinal inflammation. *The American journal of medicine*, 109(2): 150-158.
- Kurihara, T., Warr, G., Loy, J., & Bravo, R. 1997. Defects in macrophage recruitment and host defense in mice lacking the CCR2 chemokine receptor. *J Exp Med*, 186(10): 1757-1762.
- Li, Q., & Verma, I. M. 2002. NF-kappaB regulation in the immune system. *Nature reviews. Immunology*, 2(10): 725-734.
- Liu, G., Xia, X. P., Gong, S. L., & Zhao, Y. 2006. The macrophage heterogeneity: difference between mouse peritoneal exudate and splenic F4/80+ macrophages. *J Cell Physiol*, 209(2): 341-352.
- MacMicking, J., Xie, Q. W., & Nathan, C. 1997. Nitric oxide and macrophage function. *Annual review of immunology*, 15: 323-350.
- Mantovani, A., Sica, A., Sozzani, S., Allavena, P., Vecchi, A., & Locati, M. 2004. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol*, 25(12): 677-686.
- Martin, E. L., Souza, D. G., Fagundes, C. T., Amaral, F. A., Assenzio, B., Puntorieri, V., Del Sorbo, L., Fanelli, V., Bosco, M., Delsedime, L., Pinho, J. F., Lemos, V. S., Souto, F. O., Alves-Filho, J. C., Cunha, F. Q., Slutsky, A. S., Ruckle, T., Hirsch, E., Teixeira, M. M., & Ranieri, V. M. 2010. Phosphoinositide-3 kinase gamma activity contributes to sepsis and organ damage by altering neutrophil recruitment. *Am J Respir Crit Care Med*, 182(6): 762-773.
- Martinez-Pomares, L. 2012. The mannose receptor. *Journal of leukocyte biology*, 92(6): 1177-1186.
- Martinon, F., & Tschopp, J. 2005. NLRs join TLRs as innate sensors of pathogens. *Trends in immunology*, 26(8): 447-454.
- Medzhitov, R. 2008. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*, 454(7203): 428-435.

- Mori, M., & Gotoh, T. 2004. Arginine metabolic enzymes, nitric oxide and infection. *J Nutr*, 134(10 Suppl): 2820S-2825S; discussion 2853S.
- Oeckinghaus, A., Hayden, M. S., & Ghosh, S. 2011. Crosstalk in NF-kappaB signaling pathways. *Nature immunology*, 12(8): 695-708.
- Okuma, T., Terasaki, Y., Sakashita, N., Kaikita, K., Kobayashi, H., Hayasaki, T., Kuziel, W. A., Baba, H., & Takeya, M. 2006. MCP-1/CCR2 signalling pathway regulates hyperoxia-induced acute lung injury via nitric oxide production. *Int J Exp Pathol*, 87(6): 475-483.
- Opal, S. M. 2007. The host response to endotoxin, antilipopolysaccharide strategies, and the management of severe sepsis. *International journal of medical microbiology : IJMM*, 297(5): 365-377.
- Ozes, O. N., Mayo, L. D., Gustin, J. A., Pfeffer, S. R., Pfeffer, L. M., & Donner, D. B. 1999. NF-kappaB activation by tumour necrosis factor requires the Akt serine-threonine kinase. *Nature*, 401(6748): 82-85.
- Palmer, R. M., & Moncada, S. 1989. A novel citrulline-forming enzyme implicated in the formation of nitric oxide by vascular endothelial cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 158(1): 348-352.
- Park, S. J., Lee, S. C., Hong, S. H., & Kim, H. M. 2002. Degradation of IkappaBalpha in activated RAW264.7 cells is blocked by the phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor LY294002. *Cell Biol Toxicol*, 18(2): 121-130.
- Park, Y. C., Lee, C. H., Kang, H. S., Chung, H. T., & Kim, H. D. 1997. Wortmannin, a specific inhibitor of phosphatidylinositol-3-kinase, enhances LPS-induced NO production from murine peritoneal macrophages. *Biochem Biophys Res Commun*, 240(3): 692-696.
- Peri, F., Piazza, M., Calabrese, V., Damore, G., & Cignetti, R. 2010. Exploring the LPS/TLR4 signal pathway with small molecules. *Biochem Soc Trans*, 38(5): 1390-1395.

- Reade, M. C., & Young, J. D. 2003. Of mice and men (and rats): implications of species and stimulus differences for the interpretation of studies of nitric oxide in sepsis. *British journal of anaesthesia*, 90(2): 115-118.
- Rommel, C., Camps, M., & Ji, H. 2007. PI3K delta and PI3K gamma: partners in crime in inflammation in rheumatoid arthritis and beyond? *Nat Rev Immunol*, 7(3): 191-201.
- Ruffell, D., Mourkioti, F., Gambardella, A., Kirstetter, P., Lopez, R. G., Rosenthal, N., & Nerlov, C. 2009. A CREB-C/EBPbeta cascade induces M2 macrophage-specific gene expression and promotes muscle injury repair. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(41): 17475-17480.
- Salh, B., Wagey, R., Marotta, A., Tao, J. S., & Pelech, S. 1998. Activation of phosphatidylinositol 3-kinase, protein kinase B, and p70 S6 kinases in lipopolysaccharide-stimulated Raw 264.7 cells: differential effects of rapamycin, Ly294002, and wortmannin on nitric oxide production. *J Immunol*, 161(12): 6947-6954.
- Sherwood, E. R., & Toliver-Kinsky, T. 2004. Mechanisms of the inflammatory response. *Best practice & research. Clinical anaesthesiology*, 18(3): 385-405.
- Steil, A. A., Garcia Rodriguez, M. C., Alonso, A., Crespo, M. S., & Bosca, L. 1995. Platelet-activating factor: the effector of protein-rich plasma extravasation and nitric oxide synthase induction in rat immune complex peritonitis. *Br J Pharmacol*, 114(4): 895-901.
- Stein, M., Keshav, S., Harris, N., & Gordon, S. 1992. Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. *The Journal of experimental medicine*, 176(1): 287-292.
- Stephens, L., Smrcka, A., Cooke, F. T., Jackson, T. R., Sternweis, P. C., & Hawkins, P. T. 1994. A novel phosphoinositide 3 kinase activity in

myeloid-derived cells is activated by G protein beta gamma subunits. *Cell*, 77(1): 83-93.

Stoyanov, B., Volinia, S., Hanck, T., Rubio, I., Loubtchenkov, M., Malek, D., Stoyanova, S., Vanhaesebroeck, B., Dhand, R., Nurnberg, B., & et al. 1995. Cloning and characterization of a G protein-activated human phosphoinositide-3 kinase. *Science*, 269(5224): 690-693.

Suire, S., Coadwell, J., Ferguson, G. J., Davidson, K., Hawkins, P., & Stephens, L. 2005. p84, a new Gbetagamma-activated regulatory subunit of the type IB phosphoinositide 3-kinase p110gamma. *Curr Biol*, 15(6): 566-570.

Szumilo, M., & Rahden-Staron, I. 2008. [Phosphoinositide-specific phospholipase C in mammalian cells: structure, properties, and function]. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*, 62: 47-54.

Titheradge, M. A. 1999a. Nitric oxide in septic shock. *Biochim Biophys Acta*, 1411(2-3): 437-455.

Utermark, T., Rao, T., Cheng, H., Wang, Q., Lee, S. H., Wang, Z. C., Iglehart, J. D., Roberts, T. M., Muller, W. J., & Zhao, J. J. 2012. The p110alpha and p110beta isoforms of PI3K play divergent roles in mammary gland development and tumorigenesis. *Genes & development*, 26(14): 1573-1586.

van Furth, R. 1985. Monocyte production during inflammation. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 8(2): 205-211.

Vlahos, C. J., Matter, W. F., Hui, K. Y., & Brown, R. F. 1994. A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002). *J Biol Chem*, 269(7): 5241-5248.

Volkman, A., & Gowans, J. L. 1965. The Origin of Macrophages from Bone Marrow in the Rat. *Br J Exp Pathol*, 46: 62-70.

- Wymann, M. P., Bulgarelli-Leva, G., Zvelebil, M. J., Pirola, L., Vanhaesebroeck, B., Waterfield, M. D., & Panayotou, G. 1996. Wortmannin inactivates phosphoinositide 3-kinase by covalent modification of Lys-802, a residue involved in the phosphate transfer reaction. *Mol Cell Biol*, 16(4): 1722-1733.
- Wymann, M. P., & Pirola, L. 1998. Structure and function of phosphoinositide 3-kinases. *Biochimica et biophysica acta*, 1436(1-2): 127-150.
- Xaus, J., Comalada, M., Valledor, A. F., Cardo, M., Herrero, C., Soler, C., Lloberas, J., & Celada, A. 2001. Molecular mechanisms involved in macrophage survival, proliferation, activation or apoptosis. *Immunobiology*, 204(5): 543-550.
- Xia, X., Hu, X., Xu, H., Wu, L., Dai, Y., Yang, L., & Xu, Z. 2012. Phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor suppresses inducible nitric oxide synthase expression in bronchiole epithelial cells in asthmatic rats. *Mol Cell Biochem*, 359(1-2): 293-299.
- Xie, Q. W., Kashiwabara, Y., & Nathan, C. 1994. Role of transcription factor NF-kappa B/Rel in induction of nitric oxide synthase. *J Biol Chem*, 269(7): 4705-4708.
- Xu, N., Yuan, H., Liu, W., Li, S., Liu, Y., Wan, J., Li, X., Zhang, R., & Chang, Y. 2013. Activation of RAW264.7 mouse macrophage cells in vitro through treatment with recombinant ricin toxin-binding subunit B: Involvement of protein tyrosine, NF-kappaB and JAK-STAT kinase signaling pathways. *Int J Mol Med*, 32(3): 729-735.
- Yum, H. K., Arcaroli, J., Kupfner, J., Shenkar, R., Penninger, J. M., Sasaki, T., Yang, K. Y., Park, J. S., & Abraham, E. 2001. Involvement of phosphoinositide 3-kinases in neutrophil activation and the development of acute lung injury. *Journal of immunology*, 167(11): 6601-6608.

Zanoni, I., & Granucci, F. 2012. Regulation and dysregulation of innate immunity by NFAT signaling downstream of pattern recognition receptors (PRRs). *European journal of immunology*, 42(8): 1924-1931.

8. Anexo

Anexo A: Certificado do Comitê de Ética para Experimentação Animal

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

Comissão de Ética em Experimentação Animal

3602-3301

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo para Uso de Animais em Experimentação nº 090/2012, sobre o projeto intitulado “*Papel da via da Fosfatidilinositol 3-quinase gama (PI3ky) na ativação de macrófagos.*”, sob a responsabilidade do **Professor Doutor Thiago Mattar Cunha** está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi **APROVADO** em reunião de 27 de agosto de 2012.

(We certify that the protocol nº 090/2012, about “*The role of phosphatidylinositol 3-kinase gamma pathway in macrophage activation*”, agrees with the ETHICAL PRINCIPLES IN ANIMAL RESEARCH adopted by Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and was approved by the College of Medicine of Ribeirão Preto of the University of São Paulo – Ethical Commission of Ethics in Animal Research (CETEA) in 08/27/2012.

Ribeirão Preto, 25 de junho de 2012.

Prof. Dr. Omero Benedicto Poli-Neto
Presidente da Comissão de Ética em
Experimentação Animal