EDSON KIYOTAKA ISHIZUKA

**MODULAÇÃO DA RESPOSTA DOS RECEPTORES DO TIPO TOLL
PELA ATIVAÇÃO DO PAF-R EM MACRÓFAGOS MURINOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós- Graduação
em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas
da Universidade de São Paulo, para obtenção do
Título de Doutor em Ciências.

São Paulo
2016

EDSON KIYOTAKA ISHIZUKA

**MODULAÇÃO DA RESPOSTA DOS RECEPTORES DO TIPO TOLL
PELA ATIVAÇÃO DO PAF-R EM MACRÓFAGOS MURINOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós- Graduação
em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas
da Universidade de São Paulo, para obtenção do
Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Imunologia

Orientadora: Profa Dra Sonia Jancar

Co-orientador: Prof. Dr Carlos Henrique Serezani

Versão original

São Paulo
2016

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Ishizuka, Edson Kiyotaka.

Modulação da resposta dos receptores do tipo Toll pela ativação do PAF-R em macrófagos murinos / Edson Kiyotaka Ishizuka. – São Paulo, 2016.

Orientador: Profa. Dra. Sonia Jancar Negro.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Imunologia. Área de concentração: Imunologia. Linha de pesquisa: Imunofarmacologia dos mediadores lipídicos.

Versão do título para o inglês: Modulation of Toll-like receptors responses by PAF-R activation in murine macrophages.

1. Macrófagos 2. Receptores do tipo Toll 3. Fator ativador de plaquetas 4. Fator nuclear Kappa B 5. Citocinas 6. Mediadores lipídicos I. Negro, Profa. Dra. Sonia Jancar II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Imunologia III. Título.

ICB/SBIB039/2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Edson Kiyotaka Ishizuka.

Título da Tese: Modulação da resposta dos receptores do tipo Toll pela ativação do PAF-R em macrófagos murinos.

Orientador(a): Profa. Dra. Sonia Jancar Negro.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou

☐ **Aprovado(a)**

☐ **Reprovado(a)**

Examinador(a):   Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a):   Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a):   Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a):   Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **067** nas fls. **129** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) **Sonia Jancar**, Coordenador (a) da Linha de pesquisa "*Influência de receptores acoplados a proteína G na ativação de macrófagos induzido por receptores do tipo Toll*" do qual participam o(s) **Edson Kiyotaka Ishizuka**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)** em **08.05.2012**, com validade de **4 anos**.

São Paulo, 09 de maio de 2012.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEUA - ICB/USP

Prof. Dr. ARIEL MARIANO SILBER
Secretário
CEUA - ICB/USP

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Imunofarmacologia do Departamento de Imunologia, do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB/USP), São Paulo – SP, Brasil, e recebeu apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo 2012/07662-6, do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Aos meus pais
Kiyokazu e Michiko
pelo incentivo, conselhos
e apoio incondicional

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora Dra. Sonia Jancar por ter me recebido em seu laboratório e aceitado me orientar. A sua sabedoria, calma, simplicidade, generosidade e principalmente, a sua paixão pela pesquisa são características que certamente terei como exemplo e serão essenciais para o meu futuro. Foi um prazer tê-la como a minha orientadora e serei eternamente grato pelos conhecimentos adquiridos.

Ao meu co-orientador Carlos Henrique Serezani, por ter idealizado este projeto, e pela ajuda na elaboração dos experimentos, interpretação dos dados e discussões dos resultados.

Ao meu irmão Elcio e a minha cunhada Aline, que nos momentos de aperto sempre se dispuseram a me ajudar. Obrigado pelas dicas, incentivo e pelas caronas.

A minha irmã Eliana pelos momentos de alegria e descontração.

A toda minha família, em especial aos meus primos pelos inúmeros almoços especiais e momentos de risadas.

Ao meu psicólogo Diego Isquardo, pela paciência em me ouvir nos momentos mais difíceis e pelos inúmeros conselhos.

Aos professores da minha banca de qualificação: Profa Nancy Starobinas, Prof Alexandre Steiner e Prof Sandro Almeida. Obrigado pelas dicas e críticas, que serviram para enriquecer o trabalho.

Ao pessoal do Laboratório de Imunofarmacologia, em especial ao Luciano, por sua enorme contribuição no andamento do projeto, principalmente com idéias, na análise dos dados e nas discussões dos resultados; ao Junior, pela companhia nos congressos e cursos, e com quem me diverti muito durante o Doutorado; a Rachel, por toda sua disposição em me ajudar, me ouvir e pelos momentos de alegria no laboratório e nas horas de almoço no bandeirão com o Junior. Vou sentir falta do sorvete depois do almoço; ao Marco, um cara sensacional e um grande amigo que fiz na reta final do Doutorado. Valeu por tudo, véio!; a Marlise, por sua generosidade, pela ajuda nos experimentos e pelas conversas descontraídas; a Sil, que tão bem me recebeu e nunca deixou faltar nada no laboratório. Vou me lembrar com carinho dos momentos de alegria e das vezes em que nos divertíamos com as besteiras que falávamos...todos os dias, praticamente; a Tati, Bárbara e Douglas, que apesar do pouco contato, são pessoas ótimas com quem tive conversas agradáveis.

Aos ex-colegas do laboratório: Mari Morato, Camila e Matheus. Em especial agradeço ao Francisco, por sua contribuição no desenvolvimento do trabalho; e ao Mateus, com quem fiz uma grande amizade e tive momentos de muita descontração no laboratório, no almoço e na lanchonete.

Ao Laboratório de Imunologia Experimental pela utilização do espectrofotômetro.

Ao Laboratório de Imunobiologia de Transplantes pela utilização do Nanodrop e do G:BOX.

Ao Biotério de Experimentação do Departamento de Imunologia por fornecerem e cuidarem dos camundongos utilizados nos experimentos.

Ao pessoal da secretaria: Eni, João, Amanda e Jotelma.

Ao pessoal da portaria: Otacílio, Milton, Nilson, seu Geraldo, Rony, Delman.

Aos docentes e funcionários do Departamento de Imunologia.

A FAPESP, CNPq e CAPES pelo auxílio financeiro.

Por fim, agradeço a todos que de alguma forma participaram desta jornada, principalmente pelo apoio nos momentos de desânimo, incentivando-me a seguir em frente de cabeça erguida e superando os obstáculos.

*“No meio da confusão, encontre a simplicidade. A partir da discórdia, encontre a harmonia. No meio da dificuldade reside a oportunidade.”
(Albert Einstein)*

RESUMO

ISHIZUKA, E. K. **Modulação da resposta dos receptores do tipo Toll pela ativação do PAF-R em macrófagos murinos**. 2016. 87 p. Tese (Doutorado em Imunologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Receptores do tipo Toll (TLRs) e o receptor do fator ativador de plaquetas (PAF-R) estão altamente expressos em macrófagos, e são componentes importantes de processos microbicidas e homeostáticos. Há evidências de que a ativação do PAF-R afeta a sinalização desencadeada por outros receptores. Portanto, o objetivo deste projeto foi investigar o efeito da ativação do PAF-R na resposta de macrófagos a agonistas de TLR MyD88-dependentes (TLR2 e TLR4) e independente (TLR3). Estes estudos foram realizados em macrófagos peritoneais elicitados estimulados concomitantemente com cPAF e diferentes agonistas de TLR. Nossos resultados mostram que a adição de cPAF inibiu a produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-12p40, IL-6 and TNF- α) e aumentou a produção da anti-inflamatória IL-10 em macrófagos estimulados com Pam3Cys ou LPS, mas não com Poly(I:C). Adicionalmente, cPAF reduziu a expressão de COX-2 e a produção de PGE₂ induzidas por Pam3Cys e LPS, mas não afetou a expressão de iNOS e a formação de nitrito induzida por LPS. Portanto, o cPAF induz um fenótipo regulador em macrófagos ativados com agonistas de TLR2 e TLR4. Este efeito do PAF não é devido a sua ação sobre a molécula adaptadora MyD88. Quando investigamos o efeito do cPAF no programa de sinalização elicitado por LPS, encontramos que o PAF inibiu a fosforilação da subunidade p65 do NF- κ B, que induz a expressão de genes para citocinas pró-inflamatórias, e aumentou a fosforilação de NF- κ B p105, precursora da subunidade p50 que induz a expressão do gene para IL-10. Adicionalmente, o pré-tratamento dos macrófagos com um peptídeo inibidor da p105/p50 reverteu o efeito potencializador do PAF na produção da IL-10. Estes achados sugerem que a atividade transcricional diminuída da subunidade p65 e a fosforilação aumentada de p105 induzida pelo PAF são responsáveis pela diminuição das citocinas pró-inflamatórias e aumento de IL-10, respectivamente, em macrófagos estimulados com LPS. Estes resultados revelam um papel até agora desconhecido do PAF na ativação MyD88-dependente do NF- κ B em macrófagos.

Palavras-chave: Macrófagos. Receptores do tipo Toll. Fator ativador de plaquetas. NF- κ B.

ABSTRACT

ISHIZUKA, E. K. **Modulation of Toll like receptors responses by PAF-R activation in murine macrophages**. 2016. 87 p. Ph.D thesis (Immunology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Toll-like receptors (TLRs) and platelet-activating factor receptor (PAF-R) are highly expressed in macrophages, and are important components of microbicidal and homeostatic processes. There is evidence that PAF-R activation affects the signaling elicited by other receptors. Thus, the aim of this project was to investigate the effect of PAF-R activation in the responsiveness of macrophages to TLR agonists MyD88-dependent (TLR2 and TLR4) and independent (TLR3). These studies were performed in elicited peritoneal macrophages stimulated concomitantly with cPAF and different TLR agonists. Our results show that PAF addition inhibited the production of pro-inflammatory cytokines (IL-12p40, IL-6 and TNF- α) and increased anti-inflammatory IL-10 in macrophages stimulated with Pam3Cys and LPS, but not with Poly(I:C). Additionally, cPAF reduced COX-2 expression and PGE₂ production induced by Pam3Cys and LPS, but did not affect the iNOS expression and nitrite formation induced by LPS. Thus, cPAF induced a regulatory phenotype in macrophages activated with TLR2 and TLR4 agonists. This effect of PAF is not due to its action on MyD88 adaptor molecule. When we investigated the PAF effect on signaling program elicited by LPS, we found that PAF inhibited the phosphorylation of NF- κ B p65 subunit, and increased phosphorylation of NF- κ B p105, the precursor of p50 subunit, which induces IL-10 gene expression. Additionally, the pretreatment of macrophages with p105/p50 peptide inhibitor reverted the potentiating effect of PAF on IL-10 production. These findings suggest that the decreased transcriptional activity of p65 subunit and enhanced p105 phosphorylation induced by PAF are responsible for the down-regulation of pro-inflammatory cytokines and up-regulation of IL-10, respectively, in LPS-stimulated macrophages. These results unveil a heretofore unrecognized role for PAF in MyD88-dependent NF- κ B in macrophages.

Keywords: Macrophages. Toll-like receptors. Platelet activating factor. NF- κ B.

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 – Sinalização via TLR2, TLR3 e TLR4.....	27
Esquema 2 – Sinalização canônica e não canônica do NF- κ B	29
Esquema 3 – Via do remodelamento da síntese do PAF.....	31
Esquema 4 – Via <i>de novo</i> da síntese do PAF.....	32

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Expressão de PAF-R, PAF-AH e PAF-AT em PMs residentes e elicitados com tioglicolato	45
Figura 2 – Dosagem de IL-12p40 no sobrenadante da cultura de macrófagos WT e PAF-R KO estimulados simultaneamente com cPAF e LPS	46
Figura 3 – Efeito da estimulação concomitante de macrófagos com cPAF e LPS sobre a resposta induzida por TLR4	47
Figura 4 – Avaliação da resposta ao LPS em macrófagos pré-tratados com cPAF por 24 h.....	48
Figura 5 – Citocinas no sobrenadante da cultura de macrófagos estimulados simultaneamente com cPAF e LPS	50
Figura 6 – Citocinas no sobrenadante da cultura de macrófagos estimulados simultaneamente com cPAF e Pam3Cys	51
Figura 7 – Citocinas no sobrenadante da cultura de macrófagos estimulados simultaneamente com cPAF e Poly(I:C)	52
Figura 8 – Expressão de COX-2 e produção de PGE2 em macrófagos estimulados com cPAF e agonistas de TLRs.....	54
Figura 9 – Expressão de iNOS e produção de NO em macrófagos estimulados com cPAF e agonistas de TLRs.....	55
Figura 10 – O cPAF não afeta a expressão de MyD88 induzida por TLR2/4.....	56
Figura 11 – O cPAF não afeta a fosforilação de I κ B α induzida por TLR2/4	57
Figura 12 – o cPAF diminui a fosforilação de p65 induzida por TLR2/4	58
Figura 13 – A inibição de CREB não afeta o efeito potencializador do cPAF na produção de IL-10.....	59
Figura 14 – Efeito do bloqueio de PPAR- γ no aumento da produção de IL-10 induzido pelo cPAF.....	60
Figura 15 – Expressão de STAT3 em macrófagos estimulados com cPAF e agonistas MyD88-dependentes	61
Figura 16 – Efeito de inibidores de NF- κ B na modulação da produção de IL-10 pelo cPAF	62
Figura 17 – cPAF aumenta a produção de IL-10 induzida por LPS afetando a subunidade p105 do NF- κ B.....	63

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A_{2A}R – receptor A_{2A} de adenosina
AAG – 1-*O*-alquil-2-acetil-*sn*-glicerol
Acetil-CoA – acetil-coenzima A
AGEPC – acetil-gliceril-eter-fosforil-colina
AIM2 – ausente em melanoma 2
ALLN – N-acetil-L-leucil-L-leucil-L-norleucina
ALRs – receptores do tipo AIM2
AMP – adenosina monofosfato
ANOVA – análise de variância
AP-1 – proteína ativadora-1
BAFF – fator ativador de células B
BCA – ácido bicinconínico
Bcl-3 – linfoma 3 de célula B
BLT1 – receptor B1 do leucotrieno B₄
C5aR – receptor de C5a
cAMP – AMP cíclico
CBP – proteína ligadora de CREB
CD – *cluster of differentiation*
cDNA – ácido desoxirribonucleico complementar
CDP-colina – citidinadifosfocolina
CLRs – receptores de lectina tipo C
CO₂ – dióxido de carbono
COX-2 – ciclooxigenase-2
cPAF – metilcarbamil PAF
cPLA2 – fosfolipase A2 citosólica
CPT – colinafosfotransferase
CpG – dinucleotídeo CG
CREB – proteína de ligação ao elemento responsivo ao AMP cíclico
Ct – *cycle threshold*
DAG - diacilglicerol
DAMPs – padrões moleculares associados ao dano

DC – célula dendrítica
DD – domínio de morte
DNA – ácido desoxirribonucléico
dsRNA – RNA dupla fita
EIA – ensaio imunoenzimático
ELISA – ensaio imunoabsorvente ligado a enzima
ERK – quinase regulada por sinal extracelular
GAPDH – gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GPCRs – receptores acoplados a proteína G
GW9662 – 2-cloro-5-nitro-N-fenilbanzamida
HMGB1 – proteína do grupo Box-1 de alta mobilidade
HRP – peroxidase de rábano
HSP – proteína de choque térmico
IFN – Interferon
Ig – imunoglobulina
IL – interleucina
IL-1R – receptor de IL-1
iNOS – óxido nítrico sintase induzível
I κ B – inibidor do kappa B
IKK – quinase I κ B
IKK-*i* – quinase I κ B induzível
IP3 – inositol trifosfato
IRAK – quinase associada ao receptor de IL-1
IRF – fator regulador de interferon
JNKs – quinases c-Jun N-terminal
KG-501 – 2-naftol-AS-E-fosfato
LDL – lipoproteína de baixa densidade
LPCAT – PAF-acetiltransferase
LPS – lipopolissacarídeo
LRR – repetições ricas em leucina
LTB₄ – leucotrieno B₄
Mal – adaptador semelhante a MyD88
MAPK – proteína quinase ativada por mitógenos

mRNA – RNA mensageiro

MyD88 – fator de diferenciação mielóide 88

NaCl – cloreto de sódio

NAK – quinase ativadora de NF- κ B

NAP1 – proteína 1 associada a NAK

NEMO – modulador essencial do NF- κ B

NF- κ B – fator nuclear kappa B

NLRs – receptores do tipo NOD

NO₂⁻ – nitrito

NO – óxido nítrico

NOD – domínio de oligomerização de ligação de nucleotídeos

oxLDL – LDL oxidado

PAF – fator ativador de plaquetas

PAF-AH – PAF-acetilhidrolase

PAF-AT – PAF-acetiltransferase

PAF-R – receptor do PAF

Pam3Cys – (S)-[2,3-Bis(palmitoyloxy)-(2-RS)-propyl]-N-palmitoyl-(R)-Cys-(S)-Ser-(S)-Lys₄-OH

oxLDL – LDL oxidado

PAMPs – padrões moleculares associados a patógenos

PBS – tampão fosfato salino

PC – fosfocolina

PDTC – pirrolidina ditiocarbamato

PGE₂ – prostaglandina E2

PIP2 – fosfatidilinositol bifosfato

PKA – protein quinase A

PKC – proteína quinase C

PLA2 – fosfolipase A2

PLC – fosfolipase C

PMs – macrófagos peritoneais

Poly(I:C) – ácido poliinosínico:policitidílico

PP2A – proteína fosfatase 2A

PPAR – receptor ativado por proliferadores de peroxissoma

PRRs – receptores de reconhecimento de padrões

PVDF – fluoreto de polivinilideno

qPCR – reação em cadeia da polimerase quantitativo

RAGE - receptor para produtos finais de glicação avançada

RHD – domínio de homologia Rel N-terminal

RIG-I – gene 1 induzido pelo ácido retinóico

RIP1 – proteína quinase interagindo com receptor 1

RLRs – receptores do tipo RIG

RNA – ácido ribonucléico

RPMI – meio de cultura *Roswell Park Memorial Institute*

SAPKs - proteína quinases ativadas por stress

SARM – *sterile α and armadillo-motif-containing protein*

SDS-PAGE – eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio

SFB – soro fetal bovino

Siglec – receptor de ligação ao ácido siálico

SINTBAD – similar ao adaptador NAP1 TBK1

Sp1 – proteína de especificidade 1

SR-A – receptor *scavenger* do tipo A

STAT – transdutor de sinal e ativador da transcrição

TAB – protein ligadora da TAK

TAD – domínio de transativação C-terminal

TAK – quinase ativadora de TGF- β

TBK – proteína serina-treonina quinase

TBST – tampão salina tris com tween

TG – tioglicolato

Th2 – *T helper 2*

TIR – receptor Toll/Interleucina-1

TIRAP – proteína adaptadora contendo domínio TIR

TLRs – receptores do tipo Toll

TNF- α - fator de necrose tumoral alfa

TNFR – receptor de TNF

TRAF6 – fator 6 associado ao receptor do fator de necrose tumoral

TRAM – molécula adaptadora relacionada a TRIF

TRIF – proteína adaptadora contendo domínio TIR indutor de interferon beta

Ubc13 – ubiquitina conjugada a enzima 13

Uev1A – ubiquitina conjugada a enzima E2 variante 1

WIP1 – *wild type p53-induced phosphatase 1*

WT – *wild type*

LISTA DE SÍMBOLOS

$^{\circ}\text{C}$ – graus Celsius

mL – mililitro

nM - nanomolar

pg – picograma

μg - micrograma

μM – micromolar

μL – microlitro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	22
1.1 Receptores de reconhecimento em macrófagos.....	23
1.2 Receptores do tipo Toll (TLRs)	24
1.2.1 Sinalização via TLRs.....	25
1.3 Fator nuclear kappa B (NF-κB).....	27
1.4 Fator ativador de plaquetas (PAF)	30
1.5 Receptores acoplados a proteína G (GPCRs).....	33
1.6 Associação de GPCRs com receptores de reconhecimento em macrófagos	35
2 OBJETIVO	37
2.1 Objetivo geral	38
3 MATERIAL e MÉTODOS.....	39
3.1 Animais de experimentação	40
3.2 Reagentes	40
3.3 Obtenção e estimulação dos macrófagos.....	41
3.4 Quantificação de citocinas e NO.....	41
3.5 Dosagem de PGE₂	42
3.6 Extração de RNA e qPCR.....	42
3.7 Immunoblotting	43
3.8 Análise estatística	43
4 RESULTADOS.....	44
4.1 Estabelecimento de modelo para estudo da associação do PAF-R com TLRs	45
4.2 Ação do PAF na resposta de macrófagos a agonistas de TLRs.....	49
4.2.1 Efeito do PAF sobre a produção de citocinas induzida por agonistas de TLRs	49
4.2.2 Efeito do PAF na expressão de iNOS e COX-2 estimulada por agonistas de TLRs.....	53
4.3 Mecanismos moleculares da ação do PAF na resposta de macrófagos a agonistas de TLRs	55
4.3.1 Efeito do PAF na expressão de MyD88 induzida por agonistas de TLRs	55

<i>4.3.2 Mecanismos envolvidos na diminuição da produção de mediadores pró-inflamatórios induzida por LPS e Pam3Cys</i>	56
<i>4.3.3 Mecanismos envolvidos no efeito potencializador do PAF sobre a produção de IL-10 induzida por LPS e Pam3Cys</i>	58
5 DISCUSSÃO	64
6 CONCLUSÕES	72
REFERÊNCIAS	74
APÊNDICES	85
A – PAFR activation of NF- κ B p65 or p105 precursor dictates pro- and anti-inflammatory response during TLR activation in murine macrophages	86
B – PAFR in adipose tissue macrophages is associated with anti-inflammatory phenotype and metabolic homeostasis	87

1 INTRODUÇÃO

1.1 Receptores de reconhecimento em macrófagos

Macrófagos são células de origem mielóide encontradas em todos os tecidos do corpo e dotadas de grande diversidade funcional. Os macrófagos tem papel fundamental em quase todos os aspectos da biologia de um organismo, que vão do desenvolvimento, homeostasia, remoção de células alteradas ao reparo tecidual (WYNN; CHAWLA; POLLARD, 2013). Tem papel importante na defesa contra infecções por fagocitar e matar microrganismos e, juntamente com as células dendríticas, processam antígenos e os apresentam aos linfócitos fazendo a ligação entre imunidade inata e adaptativa. Além disso, os macrófagos são potentes secretores de citocinas e mediadores que induzem e regulam respostas inflamatórias e imunes (GORDON, 2002). Estas ações dos macrófagos dependem de sua capacidade de reconhecer uma grande variedade de moléculas através de receptores que detectam estruturas conservadas entre as espécies microbianas, conhecidas como padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) (TAKEUCHI; AKIRA, 2010).

A maioria dos receptores que reconhecem PAMPs pode ser classificada em uma das cinco famílias de receptores que incluem os receptores do tipo Toll (TLRs), receptores de lectina tipo C (CLRs), receptores do tipo RIG (RLRs), receptores do tipo NOD (NLRs) e receptores do tipo AIM2 (ALRs). Essas famílias podem ser separadas em duas classes principais: receptores ligados a membrana e receptores intracelulares. No primeiro grupo estão inseridos os TLRs e os CLRs, que são encontrados na superfície celular ou em compartimentos endocíticos. Esses receptores detectam a presença de ligantes microbianos no espaço extracelular e no interior de endossomos. Os RLRs, NLRs e ALRs formam a segunda classe de receptores que estão localizados no citoplasma, onde eles detectam a presença de patógenos intracelulares (BRUBAKER et al., 2015).

Os macrófagos expressam também um grande número de receptores que reconhecem padrões moleculares associados ao dano (DAMPs). Os DAMPs compreendem uma vasta gama de moléculas relacionadas a dano celular, como lipídeos oxidados e moléculas expressas em células alteradas ou estressadas (CHEN; NUÑEZ, 2010; TAKEUCHI; AKIRA, 2010). Os receptores que reconhecem DAMPs são

conhecidos como receptores *scavenger*. Os macrófagos exercem a sua função fisiológica de remoção de células danificadas e moléculas oxidadas através destes receptores. Ao contrário dos receptores que reconhecem PAMPs, a ativação dos *scavenger* não induz inflamação. Fazem parte deste grupo de receptores em macrófagos os receptores *scavenger* do tipo A (SR-A), do qual o CD36 é o mais estudado (SILVERSTEIN; FEBBRAIO, 2009).

1.2 Receptores do tipo Toll (TLRs)

Os TLRs constituem uma das famílias de PRRs mais bem caracterizadas, sendo responsáveis pelo reconhecimento de patógenos tanto fora da célula quanto no interior de endossomos (AKIRA; UEMATSU; TAKEUCHI, 2006). Estes receptores são glicoproteínas transmembrana caracterizados pela presença de domínios extracelulares contendo números variáveis de motivos de repetições ricas em leucina (LRR) e um domínio de sinalização citoplasmático homólogo ao do receptor da IL-1 (IL-1R), chamado de domínio TIR (BOWIE; O'NEILL, 2000). Baseada nas suas sequências primárias, os TLRs podem ser divididos em várias subfamílias. Até o momento, foram identificados no total 12 TLRs em camundongos e 10 em humanos. Diferentes TLRs reconhecem diferentes padrões moleculares de microrganismos e componentes próprios (TAKEUCHI; AKIRA, 2010).

TLR2 é capaz de reconhecer proteoglicanos, componentes da parede celular bacteriana, e também diacil-lipopeptídeos em associação com TLR6. TLR3 pode reconhecer RNA dupla fita, que é produzido por muitos vírus durante a replicação. TLR4 reconhece lipopolissacarídeos (LPS), componentes da membrana externa de bactérias Gram-negativas. TLR5 liga-se a flagelina, uma proteína comum as bactérias Gram-positivas e negativas. TLR7 reconhece RNA de fita simples proveniente de retrovírus. TLR8 medeia o reconhecimento de imidazoquinolinas e RNAs de fita simples. TLR9 pode detectar CpG não-metilado, que é frequentemente encontrado em DNA bacteriano (TAKEDA; AKIRA, 2005).

Os TLRs são expressos em várias células imunes, incluindo macrófagos, células dendríticas, células B, tipos específicos de células T, e em células não-imunes tais como fibroblastos e células epiteliais. A expressão de TLRs não é estática, mas ao invés disso é modulada rapidamente em resposta a patógenos, a uma variedade de citocinas e ao estresse do ambiente (AKIRA; UEMATSU; TAKEUCHI, 2006). Em macrófagos, os TLRs direcionam o processo inflamatório induzindo a produção de citocinas pró-inflamatórias (GAY; GANGLOFF, 2007).

1.2.1 Sinalização via TLRs

O reconhecimento de PAMPs pelos TLRs leva a ativação transcricional de diferentes genes, dependendo do receptor e dos tipos celulares envolvidos. A diferença nas cascatas de sinalização ativadas por TLRs individuais pode ser explicada por moléculas adaptadoras contendo o domínio TIR recrutadas pelos receptores (AKIRA; UEMATSU; TAKEUCHI, 2006). Existem cinco adaptadores contendo o domínio TIR, incluindo MyD88, TRIF, TIRAP/Mal, TRAM e SARM. A sinalização induzida por TLRs pode ocorrer por duas vias distintas dependendo do tipo de proteína adaptadora recrutada, MyD88 ou TRIF (TAKEUCHI; AKIRA, 2010).

O adaptador MyD88 é composto de um domínio de morte (DD) em adição ao domínio TIR, e é essencial para a sinalização *downstream* a vários TLRs, exceto TLR3. A sinalização via TLR2 e TLR4 requer a presença do adaptador TIRAP/Mal que serve como uma ponte entre o TLR e MyD88. Na via de sinalização MyD88 dependente (**Esq. 1**), o adaptador interage inicialmente com IRAK-4, uma quinase serina/treonina que ativa outros membros da família IRAK, IRAK-1 e IRAK-2 (KAWAGOE et al., 2008). Na sequência, as IRAKs dissociam-se do MyD88 e interagem com TRAF6, que juntamente com um complexo enzimático contendo as ubiquitinas ligases Ubc13 e Uev1A, catalisa a formação de uma cadeia de poli-ubiquitina livre. Em seguida, um complexo contendo TAK1, TAB1, TAB2 e TAB3 é ativado por essa cadeia de poli-ubiquitina e fosforila IKK- β e MAPK, resultando na ativação de fatores de transcrição como AP-1 e NF- κ B e indução de citocinas pró-inflamatórias (TAKEUCHI; AKIRA, 2010).

Em resposta a estimulação com dsRNA, TLR3 recruta uma outra proteína adaptadora, TRIF. Dentre os TLRs, TLR4 é o único que desencadeia as vias de sinalização dependente de MyD88 e dependente de TRIF. Na sinalização dependente de TRIF (**Esq. 1**), a ligação de TLR3 e TLR4 ativa NF- κ B e IRF3, resultando na indução de citocinas pró-inflamatórias e IFNs do tipo I. Nessa via, TRAF6 e RIP1 ativam NF- κ B, enquanto TRAF3 é responsável pela fosforilação de IRF3 por TBK1/IKK-*i*. NAP1 e SINTBAD são necessários para a ativação de TBK1/IKK-*i*. IRF3 fosforilado, por sua vez, transloca para o núcleo para induzir a expressão de IFNs do tipo I (TAKEUCHI; AKIRA, 2010).

Em ambas as vias, a ativação dos receptores leva a translocação nuclear de um conjunto de fatores de transcrição, incluindo NF- κ B, AP-1 e IRFs. Esses fatores cooperativamente regulam a transcrição de diversos genes (AKIRA; TAKEDA, 2004).

Esquema 1 - Sinalização via TLR2, TLR3 e TLR4

Fonte: Takeuchi & Akira (2010)

1.3 Fator nuclear kappa B (NF-κB)

O NF-κB consiste de uma família de fatores de transcrição que exercem papéis críticos na inflamação (OECKINGHAUS; GHOSH, 2009). Um grande número de estímulos externos levam a ativação do NF-κB, tais como infecções bacterianas e virais (p. ex, através do reconhecimento de produtos microbianos por TLRs), citocinas inflamatórias e ligantes de receptores de células T e B, indicando o seu papel crucial na resposta imune inata e adaptativa (HAYDEN; WEST; GHOSH, 2006).

Em mamíferos, existem cinco membros da família NF- κ B: RelA (p65), RelB, c-Rel, p50 (NF- κ B1) e p52 (NF- κ B2). As proteínas NF- κ B ligam-se a sítios κ B como dímeros, tanto homodímeros como heterodímeros, e podem exercer os seus efeitos positivos ou negativos na transcrição de genes alvo. Os membros da família NF- κ B são caracterizados pela presença de um domínio de homologia Rel N-terminal (RHD), que faz o contato com DNA e sustenta a dimerização da subunidade. Somente p65, c-Rel e RelB possuem domínios de transativação C-terminal (TADs) que conferem a capacidade de iniciar a transcrição. Embora p52 e p50 não possuam as TADs, eles podem regular positivamente a transcrição através da heterodimerização com subunidades NF- κ B contendo TAD. Alternativamente, homodímeros de p50 e p52 podem regular negativamente a transcrição competindo com dímeros contendo TAD para a ligação aos sítios κ B. Esses dímeros de p50 e p52 podem também ocupar alguns sítios κ B, e portanto aumentar a ativação para certos genes alvo (HAYDEN; GHOSH, 2012).

A ativação do NF- κ B pode se dar por duas vias: canônica e não-canônica (**Esq. 2**). A via canônica, ou clássica, é representativa do esquema geral de como o NF- κ B é regulado. Após o reconhecimento do ligante, os TLRs, assim como receptores de citocinas como o receptor de TNF (TNFR) e o receptor de IL-1 (IL-1R), entre outros estímulos, desencadeiam cascatas de sinalização que culminam na ativação de IKK β (conhecido também como IKK2). IKK β existe em um complexo com IKK α (conhecido como IKK1) e a proteína NEMO (IKK γ). IKK β ativado fosforila proteínas I κ B, tais como I κ B α , que é o membro prototípico e o mais extensivamente estudado da família dos I κ Bs. I κ B α é uma proteína inibidora que se liga ao NF- κ B no citoplasma, prevenindo a sua translocação para o núcleo. Após estimulação, I κ B α sofre fosforilação e degradação no proteassomo, levando a liberação do heterodímero p50/p65 (a forma mais frequentemente detectada), a translocação nuclear do NF- κ B, e por fim, a ativação da transcrição de genes (HAYDEN; GHOSH, 2012; VALLABHAPURAPU; KARIN, 2009).

A via não-canônica ou alternativa do NF- κ B é induzida por membros específicos da família da citocina TNF, incluindo CD40L, BAFF e linfotóxina- β . Em contraste a via

canônica, a via não-canônica depende de $\text{IKK}\alpha$ e é independente de NEMO. A ativação de $\text{IKK}\alpha$ leva a fosforilação de p100 e a geração de complexos p52/RelB, que se ligam a elementos κB específicos (OECKINGHAUS; GHOSH, 2009).

Esquema 2 – Sinalização canônica e não-canônica do NF- κB
Fonte: Oeckinghaus & Ghosh (2009)

1.4 Fator ativador de plaquetas (PAF)

Um dos sinais iniciais da resposta aos agonistas de TLR é a ativação de fosfolipase A2 (PLA2) que cliva os fosfolípides de membrana liberando os ácidos graxos insaturados, os quais vão ser metabolizados em eicosanóides. No caso dos fosfolípides de colina, com a retirada do ácido graxo insaturado, o alquil-acil glicerofosfocolina resultante vai ser transformado em liso-PAF, e em seguida acetilado, gerando o fator ativador de plaquetas (PAF). Este não é armazenado como um mediador pré-formado, mas é rapidamente sintetizado após estimulação celular (SNYDER, 1994). São descritas duas vias enzimáticas que levam a produção do PAF: a via do remodelamento e a via *de novo*.

Na via do remodelamento, fosfolípidos de membrana contendo colina servem como substrato utilizado para gerar precursores imediatos do PAF. Após estimulação das células, fosfolipase A2 citosólica (cPLA2) é ativada, torna-se associada a membrana e hidrolisa o grupamento acil esterificado na posição *sn*-2 dos fosfolípidos de membrana. Em seguida, os lisofosfolípidos que são gerados (1-radil-*sn*-glicero-3-fosfocolina ou liso-PC) servem como substratos para a PAF-acetiltransferase (LPCAT 1), uma enzima que transfere um grupo da acetil-CoA para a liso-PC, resultando no PAF biologicamente ativo (**Esq. 3**). Uma vez que a via do remodelamento é ativada principalmente durante a inflamação, ela tem sido implicada na maioria das respostas patológicas envolvendo o PAF (MCMANUS; PINCKARD, 2000; VENABLE et al., 1993).

Esquema 3 – Via do remodelamento da síntese do PAF

Fonte: Adaptado de McManus & Pinckard (2000)

Em contraste, a via *de novo* da biosíntese do PAF é a fonte primária de PAF sob condições fisiológicas, e é feito a partir de 1-*O*-alquil-2-acetil-*sn*-glicerol (AAG) (**Esq. 4**). Nesta via, a fosfocolina, a partir de citidinadifosfocolina (CDP-colina), é adicionado ao sítio *sn*-3 da AAG pela colinafosfotransferase (CPT), produzindo PAF (MCMANUS; PINCKARD, 2000).

Esquema 4 – Via *de novo* da síntese do PAF

Fonte: Adaptado de Brock. Disponível em <https://www.caymanchem.com/article/2135>

O controle da concentração e a atividade do PAF gerado através das duas vias é regulada parcialmente pelo controle da sua síntese, e parcialmente pela ação de PAF-acetilhidrolases (PAF-AHs) específicas, que constituem uma família de fosfolipases A2. Essas enzimas tem como principal função remover o grupo acetil do PAF, convertendo-o em liso-PAF biologicamente inativo (MARQUES et al., 2002).

O PAF foi originalmente descrito como “um fator solúvel” envolvido na liberação de histamina e serotonina por plaquetas (HENSON, 1970). Em 1972, (BENVENISTE; HENSON; COCHRANE, 1972) demonstraram que esse fator solúvel era liberado de basófilos de coelhos após estimulação por IgE, e deram a ele o nome de fator ativador de plaquetas. Vários estudos subsequentes descreveram a natureza lipídica do PAF, e em 1979, foi demonstrado que um fosfo-acil-glicerol semi-sintético (AGEPC) tinha propriedades fisicoquímicas e biológicas indistinguíveis do PAF natural (DEMOPOULOS; PINCKARD; HANAHAN, 1979). Através de cromatografia gasosa-

liquida e análise por espectrometria de massas, (HANAHAN et al., 1980) caracterizaram a estrutura química do PAF como 1-*O*-alquil-2-acetil-*sn*-glicero-3-fosfocolina.

O PAF é ativo em concentrações nanomolares em vários tipos celulares. O PAF é mediador dos eventos vasculares da inflamação (vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular, contração de músculo liso) e celulares (migração de leucócitos), e também atua em macrófagos modulando a produção de citocinas (PRESCOTT et al., 2000).

1.5 Receptores acoplados a proteína G (GPCRs)

O receptor do PAF (PAF-R) faz parte da grande família de receptores acoplados a proteína G (GPCRs) (CHAO; OLSON, 1993). Estes constituem a maior família de proteínas transmembrana em vertebrados e medeiam respostas fisiológicas a uma grande variedade de ligantes, tais como hormônios, estímulos sensoriais, neurotransmissores e quimiocinas (LANDRY et al., 2006). Além disso, esses receptores regulam muitas funções celulares, incluindo respostas imunes, proliferação, sobrevivência e motilidade celulares, neurotransmissão e liberação de hormônios e enzimas (KATRITCH; CHEREZOV; STEVENS, 2013).

Os GPCRs são caracterizados pela presença de sete domínios transmembrânicos e interagem com proteínas G heterotriméricas compostas pelas subunidades α , β e γ . A primeira etapa na transdução de sinal pelos GPCRs é a ligação do agonista, que desencadeia uma mudança conformacional no receptor, resultando na dissociação da subunidade $G\alpha$ das subunidades $G\beta\gamma$. A subunidade α das proteínas G são divididas em quatro subfamílias ($G\alpha_s$, $G\alpha_i$, $G\alpha_q$ e $G\alpha_{12}$). Dependendo do tipo de proteína G ao qual o receptor está acoplado, diferentes efetores *downstream* são ativados (KROEZE; SHEFFLER; ROTH, 2003; NEVES; RAM; IYENGAR, 2002). Tipicamente, a subunidade $G\alpha_s$ estimula adenilil ciclase e aumenta os níveis de AMP cíclico (cAMP), ao passo que $G\alpha_i$ inibe adenilil ciclase e diminui os níveis de cAMP. Membros da família $G\alpha_q$ ativam a fosfolipase C (PLC), que cliva fosfatidilinositol bifosfato (PIP_2) em diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato (IP_3), enquanto a subunidade $G\alpha_{12}$ ativa Rho GTPase (RITTER; HALL, 2009). A sinalização

dos GPCRs é atenuada pela internalização do receptor (desensibilização), que é facilitada pela ligação de uma proteína chamada arrestina. A sinalização, desensibilização e uma eventual resensibilização são reguladas por interações complexas de vários domínios intracelulares dos GPCRs com várias proteínas intracelulares (FERGUSON, 2001).

Dentre os aproximadamente 1000 membros da família dos GPCRs, existem receptores para quimiocinas, moléculas do complemento e mediadores lipídicos como os leucotrienos, prostaglandinas e o PAF. O envolvimento dos GPCRs em diversas funções, e mais o fato de que disfunções nesses receptores contribuem para o desenvolvimento de diversas doenças fazem desses receptores os principais alvos para intervenção terapêutica, e isso fica evidente pelo fato de que entre 50 e 60% das drogas terapêuticas conhecidas atualmente tem como alvo os GPCRs (TYNDALL; SANDILYA, 2005).

Sítios de ligação específicos para o PAF estão presentes em plaquetas, células do músculo liso, células endoteliais e leucócitos, tais como neutrófilos, eosinófilos e macrófagos. Em neutrófilos, existem duas classes de sítios de ligação, de alta e baixa afinidade. Já os macrófagos de ratos e murinos possuem receptores de alta afinidade, os quais medeiam as respostas celulares induzidas pelo PAF (CHAO; OLSON, 1993).

A ligação do PAF-R induz respostas efectoras mediante ativação de proteína G. Embora esteja claro que o PAF-R se acopla a vários sistemas efetores, a identidade dos tipos de proteínas G não está bem caracterizado (ISHII; SHIMIZU, 2000). Através de um mecanismo ligado a proteína G_{α_q} , a ativação do PAF-R inicia a hidrólise de PIP_2 mediado por $PLC\beta$ para produzir IP_3 e DAG, levando a um aumento transiente da concentração de Ca^{2+} intracelular e ativação de PKC. O aumento no Ca^{2+} também ativa $cPLA_2\alpha$, levando a liberação de ácido araquidônico e lisofosfatídeos, que servem como substrato para eicosanóides e PAF, respectivamente. Há também evidências de que parte da resposta ao PAF é sensível a toxina pertussis, sugerindo que o PAF-R pode ser ligado a proteína G_{α_i} . A sinalização através de G_{α_i} inibe a conversão de ATP para cAMP pela adenilil ciclase, prevenindo a ativação de PKA e eventos de sinalização relacionados (PRESCOTT et al., 2000).

A família da MAPK é ativada por uma variedade de estímulos extracelulares, incluindo aquelas mediadas por receptores tirosina quinases e GPCRs. Existem três classes distintas de MAPK: ERKs, p38 e JNKs/SAPKs (LOPEZ-ILASACA, 1998). Tem

sido demonstrado que as duas últimas classes podem ser fosforiladas em resposta ao PAF, de modo que parecem existir múltiplas vias para a ativação de MAPK a partir do PAF-R, dependendo das espécies e/ou tipo celular (ISHII; SHIMIZU, 2000).

Além do PAF propriamente dito, moléculas PAF-*like* também se ligam ao PAF-R. Essas moléculas são produzidas por oxidação de lipoproteínas de baixa densidade ou de fosfatidilcolinas derivadas de alimentos (HEERY et al., 1995). A oxidação de fosfatidilcolinas a lipídeos PAF-*like* também ocorre *in vivo* após a exposição a um forte estresse oxidativo derivado de fumaça de cigarro (LEHR et al., 1997; SMILEY et al., 1991). Vários agentes ambientais podem induzir a oxidação de lipídeos de modo não enzimático, e muitos destes lipídeos oxidados são ligantes do PAF-R (MURPHY, 1996). São exemplos destes estressores ambientais, a luz ultravioleta B (UVB) (MARATHE et al., 2005; SAHU et al., 2012) e a fumaça de cigarro (SAHU et al., 2013). Nestes estudos, foi mostrado que camundongos expostos a fumaça de cigarro ou a luz UV apresentaram ligantes do PAF-R no sangue, e que isto induziu uma imunossupressão sistêmica que se refletiu em resposta diminuída de reações de hipersensibilidade de contato ao DNFB.

1.6 Associação de GPCRs com receptores de reconhecimento em macrófagos

Trabalhos do nosso grupo mostram que receptores reconhecedores de PAMPs se associam com o GPCR para LTB₄ em macrófagos, potencializando as funções efetoras destas células. A ativação de TLRs leva a produção de mediadores pró-inflamatórios através da ativação do fator de transcrição NF- κ B de modo dependente da molécula adaptadora MyD88. Neste trabalho, foi observado que o LTB₄, através de seu receptor de alta afinidade BLT1, é essencial para a expressão de MyD88/STAT-1 e ativação de NF- κ B induzidos pela ativação de TLR4 (SEREZANI et al., 2011).

Receptores do tipo *scavenger* também podem se associar com GPCR. Trabalhos de nosso grupo mostram que para a ótima ingestão de partículas de LDL oxidada (oxLDL) por macrófagos murinos e humanos, o CD36 requer a ativação concomitante do PAF-R. Por microscopia confocal, foi observada a co-localização de

CD36 e PAF-R na membrana. Além disso, foi visto que estes receptores co-imunoprecipitam com as moléculas marcadoras de *lipid rafts*, flotilina e GM1, sugerindo que a associação dos receptores se dê nos *lipid rafts*. Os eventos seguintes de sinalização que levam a transcrição de genes para citocinas também dependem dos dois receptores. Esta foi a primeira descrição de associação física entre um GPCR com um receptor de reconhecimento em macrófagos (RIOS et al., 2013). Na fagocitose de células apoptóticas por macrófagos, também é necessária a associação do PAF-R com o receptor CD36. A ativação dos dois receptores é requerida também para desencadear a transcrição de genes (FERRACINI et al., 2013). Nas duas situações, observamos que a adição de oxLDL ou células apoptóticas a macrófagos humanos e murinos induz a expressão de marcadores características do fenótipo regulador M2 (IL-10^{high}/ IL-12^{low}) e que o PAF-R está implicado na indução deste fenótipo, pois vários destes marcadores foram inibidos pelo tratamento dos macrófagos com antagonistas de PAF-R (FERRACINI et al., 2013; RIOS et al., 2013).

Estes resultados sugerem que a ativação de receptores reconhecedores de PAMPs e DAMPs leva a geração imediata de mediadores lipídicos, os quais, atuando em GPCRs, modulam o fenótipo do macrófago. No caso de PAMPs, esta associação induz um fenótipo classicamente ativado, enquanto que no caso de DAMPs a associação com o PAF-R induz um fenótipo regulador. Esta classificação em macrófagos classicamente ativados, alternativamente ativados e reguladores foi proposta por FLEMING e MOSSER (2011). Enquanto os macrófagos alternativamente ativados estão mais relacionados com reparo tecidual, os macrófagos reguladores (IL-10^{high}/IL-12^{low}), apesar de estarem agrupados dentro da classificação M2, diferem bastante dos alternativamente ativados, e se caracterizam pela alta produção da citocina anti-inflamatória IL10.

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo geral

Pelo exposto, existem evidências de que GPCRs para mediadores lipídicos como LTB₄ e PAF podem interagir com receptores de reconhecimento de DAMPs ou PAMPs. Em função do tipo de interação, podem ocorrer alterações relevantes no estado funcional dos macrófagos. Assim, foi objetivo deste trabalho foi investigar o efeito da ativação do PAF-R na resposta de macrófagos murinos a agonistas de TLRs.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais de experimentação

Camundongos C57BL/6 WT e deficientes de PAF-R (PAF-R^{-/-}) machos com 6 a 8 semanas de vida provenientes do Biotério Central do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB/USP) foram utilizados. Todos os animais foram mantidos sob condições controladas de temperatura (25 °C), umidade e iluminação (ciclo claro/escuro de 12 horas) com água e ração *ad libitum*, e em ambiente livre de patógenos. Todos os experimentos foram realizados conforme as leis da Comissão Brasileira de Experimento Animal (COBEA) e aprovados pela Comissão de Ética Animal do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (129/67-12).

3.2 Reagentes

RPMI 1640 e soro fetal bovino (SFB) foram obtidos da Gibco-Life Technologies (Carlsbad, CA); Brewer thioglycollate medium da Difco (Detroit, MI); LPS de *E. coli* sorotipo 026:B6 (agonista de TLR4) da Sigma (St. Louis, MO); Pam3Cys (agonista de TLR2) da Calbiochem (San Diego, CA); Poly(I:C) (agonista de TLR3) da Invivogen (San Diego, CA). Methycarbamyl PAF C-16 (cPAF, um análogo metabolicamente estável); kit para PGE₂ EIA e anticorpo anti-COX-2 murina foram obtidos da Cayman Chemical (Ann Arbor, MI). Anticorpos murinos específicos para iNOS, phospho-IκB-α (Ser32), phospho-NF-κB p65 (Ser536), phospho-STAT3, β-actina (8H10D10), IgG de coelho ligado a HRP e IgG de camundongo ligado a HRP foram obtidos da Cell Signaling Technology (Danvers, MA) e anticorpo contra phospho-NF-κB p105/p50 (Ser337) foi cedido pela SAB Signaling (College Park, MD). KG-501 (inibidor de CREB), GW9662 (antagonista de PPARγ) e DMSO foram adquiridos da Sigma (St. Louis, MO). Os inibidores de NF-κB, ALLN e PDTC (Tocris, Minneapolis, MN, USA) foram gentilmente cedidos pela Dra Regina Markus (IB/USP). NF-κB p105/p50 inhibitor peptide foi obtido da Novus Biologicals (Littleton, CO).

3.3 Obtenção e estimulação dos macrófagos

Camundongos C57BL/6 machos WT e PAF-R^{-/-} foram injetados i.p com 2 mL de tioglicolato 3%. Após 4 dias, os animais foram sacrificados e a cavidade peritoneal lavada com 5 mL de PBS gelado. O lavado peritoneal foi centrifugado a 200 x g por 10 min a 4 °C, e o *pellet* ressuspensionado em meio RPMI 1640 para a contagem das células em câmara de Neubauer. Em seguida, as células foram colocadas em placas de 6 (3 x 10⁶ cels/poço), 12 (2 x 10⁶ cels/poço) ou 24 poços (1 x 10⁶ cels/poço) em meio RPMI e incubadas por 1 h a 37 °C e 5% CO₂ para a aderência dos macrófagos na placa. Após isso, as células foram lavadas por 2x com PBS pré-aquecido, e as placas incubadas *overnight* em meio RPMI suplementado com 10% de SFB. No dia seguinte, as células foram novamente lavadas com PBS pré-aquecido e em seguida os macrófagos foram estimulados concomitantemente com cPAF (100 nM) (RIOS et al., 2013) e LPS (100 ng/mL), Pam3Cys (100 ng/ml) ou Poly(I:C) (50 µg/mL) em diferentes tempos (4, 8 e 24 h). Em um outro conjunto de experimentos, os macrófagos foram tratados com GW9662, ALLN (1, 10 e 30 µM), PDTC (25, 50 e 100 µM) ou o peptídeo inibidor do NF-κB p105/p50 (25, 100 µM por 30 min), ou com KG-501 (3, 10 e 100 µM por 1 h). Após esses tratamentos, os macrófagos foram estimulados concomitantemente com cPAF e LPS ou Pam3Cys por 8 h.

3.4 Quantificação de citocinas e NO

Os sobrenadantes da cultura de macrófagos foram coletados e avaliados quanto a produção de IL-6, IL-10, IL-12p40 e TNF-α através de ELISA utilizando o kit BD OptEIA™ (BD Bioscience, California, USA), de acordo com as instruções do fabricante. A produção de NO foi determinada medindo a concentração de nitrito (NO₂⁻) pelo método de Griess (DING; NATHAN; STUEHR, 1988).

3.5 Dosagem de PGE₂

A concentração de PGE₂ no sobrenadante da cultura dos macrófagos foi determinada através de imunoensaio competitivo utilizando um kit comercial, de acordo com as instruções do fabricante.

3.6 Extração de RNA e qPCR

O RNA total das células cultivadas foi extraído utilizando o reagente Trizol (Ambion Life Technologies, Carlsbad, CA) de acordo com as instruções do fabricante. Em seguida, o cDNA das amostras foi sintetizado utilizando o kit RevertAid First Strand cDNA Synthesis (Thermo Scientific, Rockford, IL) e o qPCR foi realizado com primers específicos para *Paf-ah* (F: 5'- GTC TCT GCT TCA GAG GAT GC -3'; R: 5'- ACA TTG TGA TCG TGA CCG TG -3'), *Paf-at* (F: 5'- CCA GGT GGC ATT TAA GCT CT -3'; R: 5'- TCT TGG CAT ATT CTG GGT GC -3'), *Paf-r* (F: 5'- GCA GTG CTT TGC TCT GTT TCC -3'; R: 5'- GCC ATT GTG CTC CAT TGC TCT -3'), *Cox-2* (F: 5'- CTC CCT GAA GCC GTA CAC AT -3'; R: 5'- ATG GTG CTC CAA GCT CTA CC -3'), *Myd88* (F: 5'- TGA TGA CCC CCT AGG ACA AA -3'; R: 5'- TCA TCT CCT GCA CAA ACT CG -3'), *Trif* (F: 5'- GGT TCA CGA TCC TGC TCC TGA C -3'; R: 5'- GCT GGG CCT GAG AAC ACT CAA G -3'), *Stat3* (F: 5'- GGA AAT AAC GGT GAA GGT GCT -3'; R: 5'- CAT GTC AAA CGT GAG CGA CT -3') e *Gapdh* (F: 5'- AGG TCG GTG TGA ACG GAT TTG -3'; R: 5'- TGT AGA CCA TGT AGT TGA GGT CA -3') utilizando o reagente SYBR Green (Applied Biosystems, Life Technologies, Warrington, UK). *Paf-at*, *Paf-ah*, *Paf-r*, *Myd88*, *Cox-2*, *Trif* e *Stat3* mRNA foi normalizado para GAPDH e a expressão relativa dos genes foi calculada pela metodologia $2^{-(\Delta\Delta C(T))}$, como descrito por (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

3.7 Immunoblotting

As células cultivadas foram inicialmente lisadas utilizando tampão RIPA (150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.1% de SDS, 50 mM Tris pH 8,0) e a concentração de proteínas foi determinada utilizando o reagente BCA (Pierce, Rockford, IL). Os lisados de macrófagos contendo 30 µg de proteínas foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida 10% contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) e transferidas para membranas de difluoreto de polivinilideno (PVDF) (GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK) a 20 V por 40 min. Em seguida, sítios não-específicos foram bloqueados com leite desnatado a 5% em TBST (150 mM NaCl, 20 mM Tris, 0.5% Tween 20, pH 7.4) por 1 h. Após lavagem com TBST, as membranas foram incubadas com anticorpos primários contra COX-2 (1:400), iNOS (1:1000), phospho-IκB-α (Ser32) (1:1000), phospho-NF-κB p65 (Ser536) (1:1000), phospho-STAT3 (1:1000), phospho-NF-κB p105/p50 (Ser337) (1:500) ou β-actina (1:1000) a 4 °C *overnight*. Após isso, as membranas foram lavadas e incubadas com anticorpos secundários anti-rabbit ou anti-mouse IgG conjugados com peroxidase (1:3000) por 1 h. Por fim, as bandas foram visualizadas utilizando o substrato quimioluminescente ECL (Thermo Scientific, Rockford, IL).

3.8 Análise Estatística

Os dados foram apresentados como a média±desvio padrão (DP) e analisados pelo programa estatístico GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, San Diego, CA). Comparações entre grupos foram avaliados por ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni. As diferenças foram consideradas significativas para valores de $p < 0.05$.

4 RESULTADOS

4.1 Estabelecimento de modelo para estudo da associação do PAF-R com TLRs

Inicialmente fomos verificar a expressão do PAF-R em macrófagos peritoneais residentes e elicitados com tioglicolato de camundongos C57BL/6. Como mostrado na **Fig. 1**, tanto os macrófagos residentes quanto os elicitados com tioglicolato expressam o mRNA de PAF-R e os níveis de expressão são comparáveis.

Para estudarmos o efeito da associação do PAF-R com agonistas de TLRs, era importante trabalhar com macrófagos que não produzem PAF para evitar que o PAF gerado pelo estímulo com os agonistas de TLRs agisse autocrinamente nos macrófagos, dificultando a discriminação entre efeitos do PAF endógeno e os do PAF adicionado. Dessa forma, fomos avaliar a expressão do mRNA da enzima responsável pela síntese do PAF, a PAF-acetiltransferase (PAF-AT) e da enzima de degradação do PAF, a PAF-acetilhidrolase (PAF-AH) nos macrófagos residentes e elicitados. Encontramos que em macrófagos elicitados a expressão relativa de PAF-AT é quase 10 vezes menor em comparação aos macrófagos residentes. Adicionalmente, observamos que ambos os tipos de macrófagos expressam mRNA da PAF-AH (**Fig. 1**).

Figura 1. Expressão de PAF-R, PAF-AH e PAF-AT em PMs residentes e elicitados com tioglicolato. PMs residentes e elicitados obtidos de camundongos C57BL/6 foram analisados quanto a expressão de mRNA *Paf-r*, *Paf-ah* e *Paf-at* por qPCR. Os dados são representativos de um experimento e mostrado como a média $\pm$ DP de $n=4$ animais para os PMs/TG. Para os PMs residentes, os dados são representativos de um *pool* de PMs obtidos de 10 camundongos. * $p<0.05$ vs MΦ residentes.

Para comprovar que o macrófago elicitado produz pouco ou não produz PAF, comparamos a resposta ao LPS de macrófagos de animais deficientes de PAF-R com os WT. Observamos que a produção de IL-12p40 induzida por LPS é semelhante nas duas linhagens, o que mostra que, se PAF é produzido por estes macrófagos, a concentração não é suficiente para interferir na resposta ao LPS. (**Fig. 2**).

Figura 2. Dosagem de IL-12p40 no sobrenadante da cultura de macrófagos WT e PAF-R KO estimulados simultaneamente com cPAF e LPS. PMs isolados de camundongos C57BL/6 WT e PAF-R KO foram estimulados simultaneamente com cPAF (100 nM) e LPS (100 ng/mL) por 37 °C e 5% CO₂ em diferentes tempos. Após 4, 8 ou 24 h, os sobrenadantes foram coletados para a dosagem de IL-12p40 por ELISA. Os dados obtidos são de dois experimentos independentes e mostrado como a média $\pm$ DP de n=4 animais.

Estes resultados mostram que os macrófagos elicitados são mais adequados que os residentes para o nosso estudo, pois devem produzir muito pouco PAF em resposta ao LPS, visto que expressam menos mRNA de PAF-AT e a resposta ao LPS dos PAF-R^{-/-} é igual a dos WT.

A seguir, fomos testar diferentes protocolos de estimulação dos macrófagos com PAF e agonista de TLR. No primeiro protocolo comparamos o efeito do PAF adicionado simultaneamente ao LPS, e os nossos resultados mostram que o PAF aumentou a produção da IL-10 e diminuiu a produção de IL-12p40, PGE₂ e expressão de mRNA de COX-2 induzida por esse agonista (**Fig. 3**).

Figura 3. Efeito da estimulação concomitante de macrófagos com cPAF e LPS sobre a resposta induzida por TLR4. PMs isolados de camundongos C57BL/6 foram estimulados simultaneamente com cPAF (100 nM) e LPS (100 ng/mL) a 37 °C e 5% CO₂. Após 24 h, o RNA das amostras foi extraído e submetido a qPCR para a análise da expressão do mRNA *Cox-2*, e os sobrenadantes foram coletados para a dosagem de IL-12p40, IL-10 e PGE₂. Os dados obtidos são de dois experimentos independentes e mostrado como a média $\pm$ DP de n=5 animais. * p<0.05 vs controle. # p<0.05 vs LPS.

No segundo protocolo, testamos o efeito do PAF dado 24 h antes da estimulação com LPS. Nossos resultados mostram que, nesta condição experimental, o PAF não teve efeito na produção de IL-12p40, PGE₂ e expressão de mRNA de COX-2, porém diminuiu a produção de IL-10 (**Fig. 4**).

Figura 4. Avaliação da resposta ao LPS em macrófagos pré-tratados com cPAF por 24 h. PMs isolados de camundongos C57BL/6 foram pré-tratados com cPAF (100 nM) por 24 h, e em seguida estimulados com LPS (100 ng/mL) por 24 h a 37 °C e 5% CO₂. Após isso, o RNA das amostras foi extraído e submetido a qPCR para a análise da expressão do mRNA *Cox-2*, e os sobrenadantes foram coletados para a dosagem de IL-12p40, IL-10 e PGE₂. Os dados obtidos são de dois experimentos independentes e mostrado como a média $\pm$ DP de n=5 animais. * $p < 0.05$ vs controle. # $p < 0.05$ vs LPS.

Em conjunto, estes dados nos mostram que, em macrófagos elicitados, o LPS induz a produção de PGs, IL-10 e IL-12p40. Por outro lado, o PAF sozinho não estimula a produção destes mediadores. Entretanto, claramente o PAF modula a resposta dos macrófagos ao LPS e o tipo de modulação depende do momento em que o PAF é adicionado. Quando o PAF é dado concomitantemente com o LPS, ele modula a resposta ao LPS para um perfil anti-inflamatório, enquanto que nos macrófagos em que o PAF é ministrado 24 h antes do LPS, este efeito é perdido.

Escolhemos então trabalhar com a adição concomitante de LPS e PAF nos experimentos subsequentes.

4.2 Ação do PAF na resposta de macrófagos a agonistas de TLRs

4.2.1 Efeito do PAF sobre a produção de citocinas induzida por agonistas de TLRs

Uma vez estabelecido o modelo a ser utilizado neste estudo, a etapa seguinte consistiu em estudarmos o efeito do PAF sobre a ativação de macrófagos induzida por diferentes agonistas de TLRs. Com o intuito de avaliarmos o papel do PAF em ações dependentes e independentes de MyD88, fomos verificar a sua ação em macrófagos estimulados com LPS, um agonista de TLR4 que sinaliza via MyD88 e TRIF; Pam3Cys, um peptídeo sintético agonista de TLR2, cuja sinalização ocorre apenas via MyD88; e Poly(I:C), um análogo sintético da dupla fita de RNA (dsRNA) viral, o qual sinaliza apenas via TRIF.

Nossos resultados indicam que macrófagos estimulados com LPS induziram produção de IL-6, IL-12p40 e TNF- α com pico em 8 h. A estimulação concomitante com PAF diminuiu significativamente a produção dessas citocinas pró-inflamatórias. Por outro lado, o PAF induziu um aumento na produção da citocina anti-inflamatória IL-10 (**Fig. 5**).

Figura 5. Citocinas no sobrenadante da cultura de macrófagos estimulados simultaneamente com cPAF e LPS. PMs isolados de camundongos foram estimulados simultaneamente com cPAF (100 nM) e LPS (100 ng/mL) por 37 °C e 5% CO₂ em diferentes tempos. Após 4, 8 ou 24 h, os sobrenadantes foram coletados para a dosagem de IL-12p40, TNF-α, IL-6 e IL-10 por ELISA. Os dados obtidos são de três experimentos independentes e mostrados como a média ± DP de n=5 animais por experimento. * p<0.05 vs LPS.

Nos macrófagos estimulados com Pam3Cys, encontramos um padrão semelhante ao observado nos macrófagos estimulados com LPS em relação a IL-12p40 e IL-10, com a diminuição e o aumento na produção dessas citocinas, respectivamente. Entretanto, o PAF não teve efeito sobre a produção de TNF-α e IL-6 induzida por Pam3Cys (**Fig. 6**)

Figura 6. Citocinas no sobrenadante da cultura de macrófagos estimulados simultaneamente com cPAF e Pam3Cys. PMs isolados de camundongos foram estimulados simultaneamente com cPAF (100 nM) e Pam3Cys (100 ng/mL) por 37 °C e 5% CO₂ em diferentes tempos. Após 4, 8 ou 24 h, os sobrenadantes foram coletados para a dosagem de IL-12p40, TNF-α, IL-6 e IL-10 por ELISA. Os dados obtidos são de três experimentos independentes e mostrados como a média ± DP de n=5 animais por experimento. * p<0.05 vs Pam3Cys.

Por fim, fomos analisar a ação do PAF sobre a produção de citocinas induzida por Poly(I:C). Como mostrado na **Fig. 7**, nos macrófagos estimulados com Poly(I:C), o PAF não afetou significativamente nenhuma das citocinas, o que é um indicativo de que as funções moduladoras do PAF sobre as citocinas não envolvem a molécula adaptadora TRIF. Ademais, em comparação ao LPS e ao Pam3Cys, podemos observar que o Poly(I:C) foi um fraco indutor de citocinas em geral.

Figura 7. Citocinas no sobrenadante da cultura de macrófagos estimulados simultaneamente com cPAF e Poly(I:C). PMs isolados de camundongos foram estimulados simultaneamente com cPAF (100 nM) e Poly(I:C) (50 µg/mL) por 37 °C e 5% CO₂ em diferentes tempos. Após 4, 8 ou 24 h, os sobrenadantes foram coletados para a dosagem de IL-12p40, TNF-α, IL-6 e IL-10 por ELISA. Os dados obtidos são de três experimentos independentes e mostrados como a média ± DP de n=5 animais por experimento.

Em conjunto, os resultados obtidos mostram que o PAF modulou apenas as respostas induzidas por ativação de TLR2 e TLR4, que são dependentes da molécula adaptadora MyD88, mas não afetou a resposta ao TLR3, que é independente deste molécula.

4.2.2 Efeito do PAF na expressão de iNOS e COX-2 estimulada por agonistas de TLRs

Sabe-se que as respostas induzidas por TLRs desencadeiam vias de sinalização que levam a transcrição de vários genes dependentes da ativação de NF- κ B (AKIRA; UEMATSU; TAKEUCHI, 2006). Na seção anterior, demonstramos que o PAF é capaz de diminuir a produção de citocinas dependentes da ativação de NF- κ B, tais como IL-12p40, IL-6 e TNF- α . Aqui, fomos investigar a ação do PAF sobre a expressão de outras moléculas dependentes de NF- κ B, tais como COX-2 e iNOS.

COX-2 é uma enzima com papel importante em processos inflamatórios e respostas imunes, e sabe-se que a ativação de TLRs induz a sua expressão (CHEN; YANG; LEE, 2000). Nossos resultados mostram que a adição de PAF nos macrófagos estimulados com LPS e Pam3Cys levou a uma diminuição na expressão de COX-2 em 24 h em comparação aos macrófagos estimulados apenas com os agonistas (**Fig. 8A**).

Além de citocinas, a sinalização via TLRs leva a uma rápida produção de mediadores lipídicos, tais como leucotrienos e prostaglandinas, que estão envolvidos em numerosas funções biológicas. Dentre as prostaglandinas, a PGE₂ derivada da COX-2 possui um importante papel na modulação da resposta imune e inflamatória (FUNK, 2001; SAKATA; YAO; NARUMIYA, 2010). Ao avaliarmos a capacidade do PAF de modular a produção de PGE₂, observamos que ele levou a uma diminuição da produção de PGE₂ induzida pelo LPS em 16 e 24 h (**Fig. 8B**), e o mesmo efeito foi observado em relação ao Pam3Cys em 24 h (**Fig. 8C**). Por outro lado, o PAF não modulou a produção de PGE₂ induzida por Poly(I:C), semelhante ao observado com as citocinas (**Fig. 8D**).

Figura 8. Expressão de COX-2 e produção de PGE₂ em macrófagos estimulados com cPAF e agonistas de TLRs. PMs de camundongos foram estimulados concomitantemente com cPAF (100 nM) e LPS (100 ng/mL) ou Pam3Cys (100 ng/mL) a 37 °C e 5% CO₂. Após 24 h, as células foram lisadas e analisadas quanto a (A) expressão de COX-2 por imunoblotting, e os sobrenadantes foram avaliados quanto a (B-D) produção de PGE₂. Em (B-D), os dados obtidos são de dois experimentos independentes e mostrados como a média ± DP de n=5 animais. * p<0.05 vs LPS ou Pam3Cys.

Assim como a COX-2, a ativação de TLRs leva a indução iNOS, uma enzima que catalisa a formação e liberação de NO, que tem um papel chave na fisiopatologia de uma variedade de doenças (LIU; HOTCHKISS, 1995). Os resultados obtidos mostram que a expressão de iNOS induzida pelo LPS não foi afetada pelo PAF em 24 h (**Fig. 9A**). Ao analisarmos a síntese de NO derivada da iNOS (medido como nitrito), observamos que assim como a expressão da iNOS, o PAF não teve efeito sobre a produção de nitrito induzida pelo LPS em 24 h (**Fig. 9B**).

Figura 9. Expressão de iNOS e produção de NO em macrófagos estimulados com cPAF e agonistas de TLRs. PMs de camundongos foram estimulados com LPS (100 ng/mL) ou Pam3Cys (100 ng/mL) em combinação com cPAF (100 nM) a 37 °C e 5% CO₂. Após 24 h, as células foram lisadas e analisadas quanto a (A) expressão de iNOS por imunoblotting e os sobrenadantes foram avaliados quanto a (B) produção de NO pelo método de Griess. Em (A), a análise densitométrica dos níveis protéicos de iNOS é mostrado e o resultado obtido é representativo de um experimento independente e mostrado como a média ± DP de n=5 animais. Em (B), o dado refere-se a um experimento independente e mostrado como a média ± DP de n=5 animais por grupo. * p<0.05 vs controle.

4.3 Mecanismos moleculares da ação do PAF na resposta de macrófagos a agonistas de TLRs

4.3.1 Efeito do PAF na expressão de MyD88 induzida por agonistas de TLRs

Até aqui, demonstramos que o PAF diminui a produção de mediadores pró-inflamatórios e aumenta a produção de IL-10 induzidas pela ativação de agonistas de TLR dependentes de MyD88. Nesta seção, fomos determinar os mecanismos moleculares pelos quais o PAF estaria modulando a ativação dos macrófagos. Sabendo-se que na sinalização pelos TLRs o primeiro evento é o recrutamento de moléculas adaptadoras, investigamos inicialmente se o PAF afeta a expressão da

molécula adaptadora MyD88. Como mostrado na **Fig. 10A**, observamos que o estímulo com LPS aumentou a expressão de mRNA de MyD88 nos tempos de 4 e 8 h após o estímulo, enquanto o Pam3Cys (**Fig. 10B**) induziu aumento apenas em 4 h. Entretanto, a ativação concomitante com cPAF não afetou a expressão do MyD88 induzida por LPS e nem por Pam3Cys

Figura 10. O cPAF não afeta a expressão de MyD88 induzida por TLR2/4. PMs de camundongos foram estimulados simultaneamente com cPAF (100 nM) e LPS (100 ng/mL) ou Pam3Cys (100 ng/mL) a 37 °C e 5% CO₂. Após 4 e 8 h, o RNA das amostras foi extraído e submetido a qPCR para a análise da expressão do mRNA *Myd88* nos macrófagos estimulados com (A) LPS ou (B) Pam3Cys. Os dados obtidos são de um experimento independente e mostrados como a média ± DP de n=3 animais. * p<0.05 vs controle.

4.3.2 Mecanismos envolvidos na diminuição da produção de mediadores pró-inflamatórios induzida por LPS e Pam3Cys

Uma vez estabelecido que o efeito do PAF é independente de MyD88 e TRIF, fomos avaliar a sua ação na sinalização *downstream* aos adaptadores, mais especificamente na via do NF-κB, para determinar em que ponto desta via o PAF poderia estar agindo para modular as respostas induzidas pelos agonistas de TLRs.

Uma vez que a ativação do NF-κB direciona programas pró-inflamatórios, nós especulamos que esse fator de transcrição poderia ser o alvo do PAF para atenuar as respostas induzidas por TLR2 e TLR4.

Para testarmos essa hipótese, nós investigamos inicialmente o efeito do PAF na expressão da proteína inibidora IκBα, e não observamos qualquer efeito na ativação dessa proteína mediada por LPS e Pam3Cys (**Fig.11**), indicando que o efeito do PAF poderia ser *downstream* a degradação do IκBα.

Figura 11. O cPAF não afeta a fosforilação de IκBα induzida por TLR2/4. PMs isolados de camundongos foram estimulados com cPAF (100 nM) e LPS (100 ng/mL) ou Pam3Cys (100 ng/mL) a 37 °C e 5% CO₂. Extratos brutos protéicos obtidos após 60 min de estimulação foram submetidos ao *immunoblotting* para detecção de phospho- IκB-α. A análise densitométrica dos níveis protéicos de phospho- IκB-α é mostrado. O resultado obtido é representativo de dois experimentos independentes e mostrado como a média ± DP de n=3 animais.

Um outro ponto de regulação da ativação do NF-κB é a fosforilação da subunidade p65, uma etapa necessária para a atividade transcricional do NF-κB (VERMEULEN et al., 2002). Como mostrado na **Fig. 12**, o PAF diminuiu a fosforilação da subunidade p65 induzida por LPS e Pam3Cys em 15 min.

Figura 12. O cPAF diminui a fosforilação de p65 induzida por TLR2/4. PMs isolados de camundongos foram estimulados com cPAF (100 nM) e LPS (100 ng/mL) ou Pam3Cys (100 ng/mL) a 37 °C e 5% CO₂ por 15 min. Após esse período, as células foram lisadas e os extratos brutos protéicos foram incubados com anti-phospho-p65 para detecção por *immunoblotting*. O resultado obtido é representativo de dois experimentos independentes.

Em conjunto, esses resultados mostram que a diminuição na produção das citocinas pró-inflamatórias pelo PAF ocorre por sua ação sobre a atividade transcricional da subunidade p65, e isso ocorre independente de mudanças na expressão de IκBα.

4.3.3 Mecanismos envolvidos no efeito potencializador do PAF sobre a produção de IL-10 induzida por LPS e Pam3Cys

Nossa próxima abordagem foi investigar os possíveis alvos moleculares envolvidos no efeito do PAF sobre a produção da IL-10.

CREB é um fator de transcrição que regula muitas respostas celulares, tais como proliferação, sobrevivência e diferenciação. Ele é induzido por uma variedade de sinais inflamatórios (p. ex, LPS) e medeia a transcrição de vários genes, incluindo a IL-10 (WEN; SAKAMOTO; MILLER, 2010). Uma vez que a atividade do CREB pode ser modulado farmacologicamente, utilizamos um inibidor de CREB, o composto KG-501 para avaliarmos se o efeito potencializador do PAF na produção de IL-10 poderia ser dependente desse fator de transcrição. Como mostrado na **Fig. 13**, o tratamento prévio dos macrófagos com KG-501 não teve efeito no aumento da IL-10 mediado pelo PAF em células estimuladas com LPS.

Figura 13. A inibição de CREB não afeta o efeito potencializador do cPAF na produção de IL-10. PMs murinos foram pré-tratados com o inibidor de CREB KG-501 (3 e 10 μ M) por 1 h, e em seguida estimulados com cPAF (100 nM) e LPS (100 ng/mL) a 37 °C e 5% CO₂. Após 8 h, os sobrenadantes da cultura foram coletados e os níveis de IL-10 determinados por ELISA. Os dados são representativos de um experimento independente e apresentados como a média $\pm$ DP de n=5 animais. * p<0.05 vs LPS.

Os receptores ativados por proliferadores de peroxissoma (PPARs) constituem uma família de receptores nucleares envolvidos na homeostase da glicose, no metabolismo lipídico e na inflamação. Existem três membros pertencentes a essa família de receptores: PPAR α , PPAR β e PPAR γ (TYAGI et al., 2011). Sabe-se que o PPAR- γ tem como ligantes naturais os ácidos graxos e substratos derivados de lipídeos (FERRÉ, 2004), e a sua ativação com pioglitazona aumenta a produção de IL-10 induzida por LPS em macrófagos peritoneais (FERREIRA et al., 2014). Dessa forma, hipotetizamos que o PAF poderia se ligar ao PPAR- γ e assim potencializar a produção da IL-10 induzida pelo LPS. Para testar isso, macrófagos foram pré-tratados com um antagonista de PPAR- γ , o composto GW9662, seguido pela estimulação com PAF e LPS por 8 h. Como observado na **Fig. 14**, o bloqueio do PPAR- γ não reverteu o efeito do PAF nos níveis de IL-10 induzido pelo LPS, o que sugere que o aumento da IL-10 independe da ativação de PPAR- γ .

Figura 14. Efeito bloqueio de PPAR- γ no aumento da produção de IL-10 induzido pelo cPAF. PMs murinos foram pré-tratados com GW9662 (30 μ M) por 30 min, e em seguida estimulados com cPAF (100 nM) e LPS (100 ng/mL) ou Pam3Cys (100 ng/mL) a 37 °C e 5% CO₂. Após 8 h, os sobrenadantes foram coletados para a dosagem de IL-10 por ELISA. Os dados obtidos referem-se a um experimento e mostrados como a média $\pm$ DP de n=5 animais por grupo. * $p < 0.05$ vs LPS.

Um outro alvo potencial que consideramos para o efeito do PAF na produção da IL-10 foi STAT3. Embora a IL-10 ative STAT3, há evidências de que essa citocina é controlada pela ligação da STAT3 na região promotora da IL-10 (BENKHART et al., 2000; ZIEGLER-HEITBROCK et al., 2003). Portanto, nos questionamos se o aumento da IL-10 mediado pelo PAF poderia ser dependente de mudanças na expressão de STAT3. Nossos resultados mostram que o PAF não afetou os níveis de mRNA de STAT3 induzido por LPS em 4 e 8 h (**Fig. 15A**), bem como a sua fosforilação (**Fig. 15B**) em 60 min.

Figura 15. Expressão de STAT3 em macrófagos estimulados com cPAF e agonistas MyD88-dependentes. (A) PMs murinos foram expostos ao cPAF (100 nM) e LPS (100 ng/mL) ou Pam3Cys (100 ng/mL) a 37 °C e 5% CO₂. Nos tempos indicados, o RNA total foi extraído e as amostras foram submetidas a qPCR para determinação dos níveis de mRNA *Stat3*. (B) Amostras de extrato bruto protéico obtidos de macrófagos estimulados com cPAF e LPS por 60 min foram incubadas com anti-phospho-STAT3 para detecção por imunoblotting. A análise densitométrica foi utilizada para quantificar as bandas. Em (A), os dados são representativos de um experimento independente e apresentado como a média ± DP de n=5 animais. Em (B), o resultado é representativo de um experimento independente e apresentado como a média ± DP de n=3 animais. * p<0.05 vs controle.

Estudos indicam que a ativação de NF-κB em macrófagos e células dendríticas via TLR2 e TLR4 está envolvida na produção de IL-10 (KANTERS et al., 2003; SARAIVA; O'GARRA, 2010). Assim, pré-tratamos os macrófagos com dois inibidores que atuam em diferentes pontos da via do NF-κB: ALLN, um inibidor de proteassomo, e PDTC, que inibe a ligação do NF-κB ao DNA. Utilizando concentrações não-tóxicas dos compostos, descobrimos que o tratamento com o ALLN inibiu o aumento da IL-10 induzido pelo PAF (**Fig. 16A**), sugerindo uma dependência do NF-κB no efeito do PAF sobre a IL-10 induzida pelo LPS. Entretanto, a inibição do proteassomo pelo ALLN pode prevenir não somente a via do NF-κB, como outras vias que poderiam levar a produção da IL-10, de modo que fomos testar o efeito de um outro inibidor, o composto PDTC. Diferentemente do ALLN, o tratamento dos macrófagos com PDTC não teve efeito no aumento da IL-10 promovido pelo cPAF (**Fig. 16B**).

Figura 16. Efeito de inibidores de NF- κ B na modulação da produção de IL-10 pelo cPAF. PMs murinos foram pré-tratados com **(A)** ALLN (10 μ M) ou **(B)** PDTC (100 μ M) por 30 min, e em seguida estimulados com cPAF (100 nM) e LPS (100 ng/mL) a 37 °C e 5% CO₂. Após 8 h, os sobrenadantes foram coletados para a dosagem de IL-10 por ELISA. Os dados obtidos referem-se a dois experimentos e estão mostrados como a média $\pm$ DP de n=5 animais. * p<0.05 vs LPS. # p<0.05 vs cPAF + LPS.

Dados da literatura mostram que a subunidade p50 do NF- κ B está envolvida com a atividade transcricional da IL-10 (CAO et al., 2006). Portanto, especulamos que o PAF poderia agir sobre o NF- κ B p105/p50 aumentando a IL-10 induzida pelos agonistas de TLR. Como mostrado na Fig. 17A, PAF aumenta a fosforilação da p105 induzida por LPS. Para confirmar que a p105 é o alvo para o aumento da IL-10 mediado pelo PAF nas células estimuladas com LPS, macrófagos foram pré-tratados com um peptídeo inibidor da p105/p50 antes da estimulação com LPS. Nossos dados mostram que a inibição com o peptídeo p105/p50, mas não com o peptídeo controle, reverteu o aumento da IL-10 em macrófagos estimulados simultaneamente com PAF e LPS (Fig. 17B).

Figura 17. cPAF aumenta a produção de IL-10 induzido por LPS afetando a subunidade p105 do NF- κ B. (A) PMs murinos foram simultaneamente estimulados com cPAF (100 nM) e LPS (100 ng/mL) a 37 °C e 5% CO₂. Após 15 min, as células foram lisadas e os extratos protéicos foram submetidos ao imunoblotting utilizando anticorpo específico para phospho-NF- κ B p105/p50. A análise densitométrica foi utilizada para quantificar as bandas. O dado é representativo de um experimento independente e apresentado como a média $\pm$ DP de n=5 animais. * p<0.05 vs controle. # p<0.05 vs LPS. (B) Macrófagos pré-tratados por 30 min com um peptídeo inibidor da subunidade p105/p50 do NF- κ B (25 μ M) ou com peptídeo controle foram estimulados com cPAF e LPS. Após 8 h, os níveis de IL-10 nos sobrenadantes da cultura foram determinados por ELISA. O resultado obtido é representativo de um experimento independente e apresentado como a média $\pm$ DP de n=5 animais. * p<0.05 vs controle. # p<0.05 vs cPAF + LPS.

Em conjunto, esses resultados indicam que o PAF potencializa a produção da IL-10 controlando diretamente a ativação da p105 durante a ativação de TLR4 em macrófagos.

5 DISCUSSÃO

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do PAF na resposta de macrófagos a ligantes de TLRs. Sabendo que a ativação de TLRs pode induzir a síntese de PAF (TSUYUKI et al., 2002), o primeiro passo foi encontrar um modelo que excluísse a participação do PAF endogenamente gerado. Estudos feitos por (ROUBIN et al., 1982) mostraram que macrófagos peritoneais elicitados com tioglicolato são deficientes na produção de PAF quando estimulados com ionóforo de cálcio ou zymosan. Nossos resultados corroboram os dados obtidos por esse grupo, uma vez que macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 elicitados com TG tem menor atividade de PAF-AT, enzima requerida para a síntese de PAF. Adicionalmente, mostramos que esta deficiência também é observada quando o estímulo é LPS, uma vez que macrófagos peritoneais elicitados e estimulados com LPS também tem menor atividade de PAF-AT. Além disso, macrófagos elicitados de camundongos PAF-R^{-/-} responderam ao LPS produzindo citocinas em concentrações comparáveis aos animais WT. Mostramos ainda que os macrófagos elicitados expressam o receptor para o PAF, a semelhança dos macrófagos residentes. Ainda na escolha do modelo, vimos que o PAF sozinho não induz produção de citocinas, porém, quando dado concomitantemente com LPS, o PAF diminui a produção da citocina pró-inflamatória IL-12p40 e aumenta a anti-inflamatória IL-10. Quando o PAF é administrado 24 h antes do LPS, este efeito do PAF é perdido.

Com base nestes resultados, escolhemos utilizar macrófagos peritoneais elicitados estimulados concomitantemente com agonistas de TLRs e agonista de PAF-R. Resumidamente, os resultados obtidos mostram que: 1) o PAF influencia a produção de mediadores inflamatórios induzida por agonistas de TLR, favorecendo um fenótipo regulador; 2) este efeito do PAF é observado apenas com agonistas de TLR dependentes da molécula adaptadora MyD88; 3) o efeito do PAF na ativação dos macrófagos pelos TLRs envolve primariamente a via do NF- κ B, mais especificamente a subunidade p65 e a proteína precursora p105.

Em nosso estudo, tanto nos macrófagos estimulados com LPS quanto nos estimulados com Pam3Cys, o PAF induziu uma mudança no fenótipo dos macrófagos de um perfil pró-inflamatório para um perfil anti-inflamatório. Baseado na relação IL-12p40/IL-10, descobrimos que o PAF diminui de forma drástica essa relação, contribuindo para o desenvolvimento de um fenótipo regulador. O mesmo foi observado em estudos anteriores do nosso grupo no qual se observou que o PAF-R co-localiza com o receptor *scavenger* CD36 em microdomínios de membrana

chamados *lipid rafts* para a captação de oxLDL e fagocitose de células apoptóticas por macrófagos murinos, induzindo um perfil regulador nessas células (FERRACINI et al., 2013; RIOS et al., 2013).

Macrófagos reguladores são conhecidos por modularem respostas inflamatórias, e sendo assim, o PAF, por induzir macrófagos reguladores, poderia ser útil no controle de doenças inflamatórias. Nesse sentido, diferentes estudos mostram o potencial de macrófagos reguladores no controle da inflamação. ZIEGLER et al. (2015) mostraram que a transferência adotiva de macrófagos reguladores em camundongos atenua a inflamação alérgica das vias aéreas, diminuindo os níveis de IgE alérgeno-específicos, o influxo de eosinófilos para as vias aéreas, a produção de citocinas Th2, e a produção de muco nos pulmões, enquanto aumenta a produção local e sistêmica de IL-10. Um outro exemplo do uso de macrófagos reguladores como um agente terapêutico foi demonstrado por GERBER e MOSSER (2001). Nesse estudo foram ativados os receptores Fc γ em macrófagos, os quais tem alta capacidade de produção de IL-10, e estes macrófagos foram inoculados em camundongos antes de uma injeção letal de LPS. Como resultado, os animais tratados foram salvos da endotoxemia, mostrando que macrófagos com perfil regulador tem potencial para prevenir respostas inflamatórias.

Os macrófagos expressam uma grande variedade de receptores na membrana plasmática, e interações de receptores reconhecedores de patógenos com vários tipos de GPCRs são bem descritos na literatura (MUKHOPADHYAY et al., 2004). ZHANG et al. (2007), por exemplo, demonstraram que a estimulação de macrófagos peritoneais com GPCR de C5a e C3a aumentam a produção de IL-10 induzida por LPS. HAWLISCH et al. (2005) encontraram um efeito negativo do C5a na síntese de citocinas da família da IL-12 (IL-12, IL-23 e IL-17) induzida por TLR4 em macrófagos murinos. Em um outro estudo, PINHAL-ENFIELD et al. (2003) reportaram que o receptor A2A de adenosina (A_{2A}R) sinergiza com agonistas de TLR2,4,7 e 9 para diminuir a produção de TNF- α em macrófagos peritoneais. Também já havia sido descrito por nosso grupo que o GPCR de LTB₄ interage com receptores de dectina-1, controlando a resposta de macrófagos a *Candida albicans* (SEREZANI et al., 2012).

Quanto a interação de um outro GPCR, o PAF-R, com TLRs em macrófagos, nós mostramos aqui que o PAF diminui a produção das citocinas pró-inflamatórias

IL-6, TNF- α e IL-12p40 e aumenta os níveis de IL-10 induzidos por LPS. Estes resultados corroboram os obtidos por JEONG et al. (2009) em macrófagos estimulados com LPS. No nosso estudo, nós ampliamos os estudos feitos por esse grupo, analisando o efeito do PAF sobre outros agonistas de TLR e os mecanismos moleculares envolvidos neste e efeito do PAF. Encontramos que similarmente ao observado na resposta ao LPS, o PAF também afeta a resposta ao Pam3Cys, diminuindo os níveis de IL-12p40 e aumentando a produção de IL-10. Entretanto, não há alteração nos níveis de TNF- α e IL-6 mediado pelo PAF. Por outro lado, o PAF não modula a produção de citocinas induzidas pelo agonista de TLR3 Poly(I:C), e isso indica que estas ações do PAF são restritas a agonistas de TLRs dependentes de MyD88.

A seguir, questionamos se os efeitos do PAF sobre a resposta ao LPS e Pam3Cys poderia ser decorrente da sua ação sobre as moléculas adaptadoras, à semelhança do que havia sido observado anteriormente com o LTB₄ que amplificou a expressão de MyD88 em macrófagos estimulados com LPS (FILGUEIRAS et al., 2015; SEREZANI et al., 2011). No presente trabalho, observamos que o estímulo com LPS e Pam3Cys aumentou a expressão de mRNA de MyD88, entretanto, a ativação concomitante com PAF não afetou a expressão do adaptador induzida por ambos os agonistas, indicando que o efeito do PAF é *downstream* aos adaptadores.

Tendo em vista que o fator de transcrição NF- κ B está intimamente relacionado com a indução de genes pró-inflamatórios (NICHOLAS et al., 2007) investigamos a seguir se o efeito inibitório do PAF sobre a produção da citocina pró-inflamatória IL-12p40 seria sobre este fator de transcrição. Nossos resultados mostram que a diminuição na produção das citocinas pró-inflamatórias pelo PAF ocorre por sua ação sobre a atividade transcricional da subunidade p65, e isso ocorre independente de mudanças na expressão de I κ B- α . Entretanto, outros fatores de transcrição exercem um papel importante na regulação de genes pró-inflamatórios. Por exemplo, o fator de transcrição AP-1, similarmente ao NF- κ B, contém sítios de transcrição para muitos mediadores inflamatórios, incluindo IL-6 e TNF- α (BALASUBRAMANIAN; GANJU; GROOPMAN, 2003; FU et al., 2002). Tendo em vista que os níveis de IL-6 e TNF- α induzidos por Pam3Cys não foram afetados pela adição do PAF, é possível que o PAF possa influenciar outras vias de

sinalização além do NF- κ B para diminuir a produção das citocinas pró-inflamatórias. Esse mesmo raciocínio pode ser aplicado a expressão de iNOS induzida pelo LPS, que não foi alterada pelo PAF. Em macrófagos murinos, a regulação da expressão de iNOS é governado predominantemente pelo NF- κ B (CONNELLY et al., 2001). Entretanto, tem sido mostrado que AP-1 ativa a expressão do gene da iNOS (KLEINERT; SCHWARZ; FÖRSTERMANN, 2003). Portanto, é possível que o PAF possa modular a expressão de iNOS de modo dependente de AP-1, como observado por OH et al. (2005). Nesse estudo, a expressão de iNOS induzida por LPS em macrófagos foi inibida através da supressão da AP-1, mas não do NF- κ B.

Diferentes proteínas G são conhecidas por ativarem vias de sinalização que levam a ativação do NF- κ B. XIE et al. (2000) mostraram que o receptor de bradicinina B2 utiliza uma via de sinalização que envolve a proteína $G\alpha_q$ para a ativação de NF- κ B, e isso ocorre pelo aumento da fosforilação do $I\kappa B-\alpha$. Em leucócitos polimorfonucleares, o receptor para FMLP acoplado a proteína $G\alpha_i$, também ativa NF- κ B, levando a produção de IL-8 (CASSATELLA et al., 1992). Nossos dados sugerem que a proteína $G\alpha_q$ acoplada ao PAF-R também pode ativar a via de sinalização do NF- κ B.

Quando investigamos o efeito do PAF na fosforilação de $I\kappa B-\alpha$ induzida pelos agonistas TLR2 e TLR4, encontramos que o PAF não afeta a expressão de $I\kappa B-\alpha$. Entretanto, o PAF diminui a fosforilação da p65 na Ser536. A subunidade p65 possui 12 diferentes sítios de fosforilação (HOCHRAINER; RACCHUMI; ANRATHER, 2013). Em nosso estudo, optamos por avaliar o efeito do PAF no resíduo Ser536, pois a fosforilação da p65 nesse resíduo contribui para a transativação do NF- κ B e consequente expressão de genes, incluindo citocinas pró-inflamatórias (CHEN et al., 2004; VERMEULEN et al., 2002).

Sabe-se que o complexo IKK, que desencadeia a degradação de $I\kappa B-\alpha$, está envolvido na fosforilação da p65 (PERKINS, 2007). YANG et al. (2003) descreveram um papel essencial da $IKK\beta$, uma quinase do complexo IKK, na fosforilação da p65 Ser536 induzida por LPS. Por outro lado, WIP-1 é uma fosfatase que tem como alvo a p65 Ser536 e age como um regulador negativo da sinalização do NF- κ B (CHEW et al., 2009). Em um outro estudo, HSIEH et al. (2011) descreveram a ação da fosfatase PP2A na defosforilação da p65 Ser536, levando a inativação do NF- κ B e

subsequente *downregulation* da expressão de iNOS em células do músculo liso de ratos estimulados com LPS e IFN- γ . Dessa forma, especulamos que o PAF poderia diminuir a produção das citocinas pró-inflamatórias mediada por TLRs influenciando as ações de fosfatases envolvidas na ativação da p65. Entretanto, esta hipótese ainda necessita ser investigada.

Um outro nível de regulação da transcrição mediada pelo NF- κ B é conferido por interações entre as subunidades do NF- κ B e proteínas co-ativadoras. Entre essas interações, o NF- κ B, semelhante a vários outros fatores de transcrição, associa-se com uma proteína co-ativadora chamada CBP, e essa interação é um pré-requisito vital para a transcrição eficiente pelo NF- κ B (ZHONG; VOLL; GHOSH, 1998). Dessa forma, não podemos excluir a possibilidade de que o PAF possa estar modulando a expressão de proteínas co-ativadoras associadas ao NF- κ B, levando a diminuição da sua atividade transcricional.

Múltiplas vias adicionais que regulam o NF- κ B tem sido identificadas, mas os mecanismos moleculares não estão completamente caracterizados (PERKINS, 2007). Entre elas, a regulação não-canônica da ativação do NF- κ B induzida por receptores da família do TNFR foi descrita. Nessa via, ao contrário do que ocorre na via canônica, a atividade transcricional do NF- κ B ocorre independentemente da degradação de I κ B (DOUILLETTE et al., 2006). Nossos resultados mostrando que a inibição da fosforilação da p65 mediada pelo PAF em macrófagos estimulados com agonistas de TLR ocorre independentemente de mudanças no I κ B- α sugere que o PAF pode estar induzindo uma via semelhante a dos receptores da família do TNFR.

Quanto ao efeito do PAF na síntese de IL-10, existem evidências de que a PGE₂ possa estimular a produção desta citocina em determinadas circunstâncias. Estudos feitos por MACKENZIE et al. (2013) mostram que em macrófagos derivados da medula óssea estimulados com LPS, a adição de PGE₂ induziu a produção de IL-10. Isso nos levou a questionar se o aumento da IL-10 mediado pelo PAF poderia ser via PGE₂. Ao analisarmos conjuntamente a produção de IL-10 e PGE₂ nos macrófagos estimulados com PAF e LPS ou Pam3Cys, observamos que a produção de IL-10 nesses casos parece ser independente de PGE₂, visto que ao mesmo tempo em que o PAF aumentou a produção de IL-10, ele diminuiu os níveis de PGE₂.

A lista de fatores de transcrição envolvidos na regulação da expressão da citocina anti-inflamatória IL-10 tem se expandido, o que reflete o grau de complexidade que a expressão dessa citocina demanda (SARAIVA; O'GARRA, 2010). Por exemplo, CAO et al. (2005) descreveram o protooncogene c-Maf expresso em monócitos e macrófagos como um fator de transcrição indispensável para a expressão do gene da IL-10 em macrófagos estimulados com LPS. Por sua vez, TONE et al. (2000) mostraram que Sp1 e Sp3 são fatores de transcrição que regulam a expressão do gene da IL-10, ligando-se a um “motivo” no promotor dessa citocina. A contribuição exata de muitos destes fatores de transcrição permanece elusivo, e em alguns casos pode ser específico do tipo de célula, mas pode também depender do tipo de estímulo que desencadeia a expressão da IL-10 (SARAIVA; O'GARRA, 2010). Em nosso estudo, mostramos que o PAF aumenta a produção de IL-10 induzida por agonistas de TLR. Nós excluimos a participação dos fatores de transcrição CREB e STAT3 no efeito potencializador do PAF na produção dessa citocina.

Além do seu envolvimento na produção de mediadores pró-inflamatórios, o NF- κ B pode também contribuir para a síntese de moléculas anti-inflamatórias como a IL-10 (SARAIVA; O'GARRA, 2010). Tem sido demonstrado que homodímeros de NF- κ B p50 são transcrionalmente ativos (KAWAI; AKIRA, 2007). De fato, CAO et al. (2006) mostraram que homodímeros de p50 são dotados de atividade transcricional. Além disso, o mesmo grupo mostrou que esses homodímeros ligam-se ao promotor proximal do gene da IL-10, ativando a sua transcrição em macrófagos primários, e macrófagos deficientes de p50 tem uma expressão comprometida da IL-10 após estimulação com LPS comparado com macrófagos *wild-type*. Isso nos levou a investigar se o aumento da IL-10 mediado pelo PAF poderia ser dependente de mudanças na ativação da subunidade p50. Para estudar o efeito do PAF na atividade da p50, fizemos um ensaio de *immunoblotting* para medir a fosforilação do NF- κ B p105/p50 e encontramos que o PAF aumenta a fosforilação da p105 induzida pelo LPS.

O produto do gene *Nf κ b1*, p105, é o precursor da subunidade p50 do NF- κ B, e funciona como uma molécula do tipo I κ B sequestrando a p50 no citoplasma (RICE; MACKICHAN; ISRAËL, 1992). Estudos feitos por BANERJEE et al. (2006) e ISHIKAWA et al. (1998) mostraram que a produção de IL-10 induzida por LPS em

macrófagos de animais deficientes de p105 é altamente comprometido. Portanto, nosso dado mostrando que o PAF aumenta a fosforilação de p105 induzida por LPS sugere que ela pode ser o alvo para o aumento da IL-10 mediado pelo PAF. Essa hipótese foi confirmada uma vez que o tratamento dos macrófagos com um peptídeo inibidor da p105/p50 preveniu o aumento da IL-10, indicando que a p105 tem um papel essencial em mediar a produção aumentada da IL-10 nos macrófagos estimulados com PAF e LPS. Até o momento não há dados na literatura mostrando tal efeito, e este é o primeiro estudo que mostra uma relação entre p105 e PAF na produção da IL-10.

Tem sido demonstrado que o complexo IKK ativa não somente a p65, mas também regula a fosforilação da p105 (BEINKE; LEY, 2004). Mais especificamente, as duas quinases do complexo IKK, IKK α e IKK β , podem fosforilar diretamente a p105 na Ser927, que reside em um motivo conservado homólogo a sequência alvo do IKK no I κ B- α (LANG et al., 2003; SALMERÓN et al., 2001). Se a ativação da p105 mediado pelo PAF poderia ser dependente do complexo IKK, isso ainda precisa ser estudado.

Em conjunto, os achados deste estudo mostram que o PAF tem um efeito “amortecedor” na ativação de macrófagos, modificando sinais provenientes da ativação de TLRs, mais especificamente TLR2 e, principalmente TLR4. O PAF exerce este efeito primariamente na via do NF- κ B através da *downregulation* da atividade transcricional da subunidade p65, o que leva a diminuição dos níveis dos mediadores pró-inflamatórios, e o aumento da produção da IL-10 através da proteína p105.

6 CONCLUSÕES

- Macrófagos peritoneais elicitados com tioglicolato expressam PAF-R e são deficientes na produção de PAF, sendo um modelo ideal para estudar a ação do PAF exógeno sobre a resposta a agonistas de TLR. produzem quantidades insignificantes de PAF.
- O PAF modula a produção de citocinas induzidas pelos macrófagos ativados por agonistas dos TLR MyD88-dependentes LPS e Pam3Cys: diminui a produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-12p40, IL-6 e TNF- α) e aumenta a anti-inflamatória IL-10 .
- O PAF regula o fenótipo de macrófagos ativados por LPS e Pam3Cys para um perfil regulador (IL-10^{high}/IL-12^{low}).
- O PAF diminui a produção de PGE₂ e a expressão de COX-2 induzida pelos agonistas dos TLR MyD88-dependentes. O PAF não afeta a expressão de iNOS e a produção de NO.
- PAF não modula a produção de citocinas induzida pelo agonista MyD88-independente Poly(I:C).
- PAF não afeta a expressão de MyD88 induzida por agonistas de TLR2 e TLR4.
- Em relação a ação moduladora do PAF sobre a produção de citocinas induzida por agonistas de TLR MyD88-dependentes:
  - a) É independente da molécula adaptadora MyD88.
  - b) O efeito inibidor do PAF sobre a produção das citocinas pró-inflamatórias ocorre por sua ação sobre a atividade transcricional da subunidade p65, e isso ocorre independente de mudanças na expressão de I κ B α .
  - c) O efeito potencializador do PAF sobre a produção de IL-10 não depende de CREB, STAT3 e PPAR- γ . Ele é devido ao aumento da fosforilação da proteína precursora p105 do NF- κ B.

REFERÊNCIAS¹

AKIRA, S.; TAKEDA, K. Toll-like receptor signalling. **Nat Rev Immunol.**, v. 4, n. 7, p. 499-511, Jul 2004. ISSN 1474-1733. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15229469> >.

AKIRA, S.; UEMATSU, S.; TAKEUCHI, O. Pathogen recognition and innate immunity. **Cell**, v. 124, n. 4, p. 783-801, Feb 2006. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16497588> >.

BALASUBRAMANIAN, A.; GANJU, R. K.; GROOPMAN, J. E. Hepatitis C virus and HIV envelope proteins collaboratively mediate interleukin-8 secretion through activation of p38 MAP kinase and SHP2 in hepatocytes. **J Biol Chem.**, v. 278, n. 37, p. 35755-66, Sep 2003. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12824191> >.

BANERJEE, A. et al. Diverse Toll-like receptors utilize Tpl2 to activate extracellular signal-regulated kinase (ERK) in hemopoietic cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 103, n. 9, p. 3274-9, Feb 2006. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16484370> >.

BEINKE, S.; LEY, S. C. Functions of NF-kappaB1 and NF-kappaB2 in immune cell biology. **Biochem J.**, v. 382, n. Pt 2, p. 393-409, Sep 2004. ISSN 1470-8728. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15214841> >.

BENKHART, E. M. et al. Role of Stat3 in lipopolysaccharide-induced IL-10 gene expression. **J Immunol.**, v. 165, n. 3, p. 1612-7, Aug 2000. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10903771> >.

BENVENISTE, J.; HENSON, P. M.; COCHRANE, C. G. Leukocyte-dependent histamine release from rabbit platelets. The role of IgE, basophils, and a platelet-activating factor. **J Exp Med.**, v. 136, n. 6, p. 1356-77, Dec 1972. ISSN 0022-1007. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4118412> >.

BOWIE, A.; O'NEILL, L. A. The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal generators for pro-inflammatory interleukins and microbial products. **J Leukoc Biol.**, v. 67, n. 4, p. 508-14, Apr 2000. ISSN 0741-5400. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10770283> >.

---

¹ De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BROCK, T. G. The biosynthesis of PAF via *de novo* synthesis. Platelet-Activating Factor: Activator of Inflammation, Angiogenesis and Metastasis. Disponível em: < <https://www.caymanchem.com/article/2135> >. Acesso em: 28 mar. 2016

BRUBAKER, S. W. et al. Innate immune pattern recognition: a cell biological perspective. **Annu Rev Immunol.**, v. 33, p. 257-90, 2015. ISSN 1545-3278. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25581309> >.

CAO, S. et al. The protooncogene c-Maf is an essential transcription factor for IL-10 gene expression in macrophages. **J Immunol.**, v. 174, n. 6, p. 3484-92, Mar 2005. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15749884> >.

CAO, S et al. NF-kappaB1 (p50) homodimers differentially regulate pro- and anti-inflammatory cytokines in macrophages. **J Biol Chem.**, v. 281, n. 36, p. 26041-50, Sep 2006. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16835236> >.

CASSATELLA, M. A. et al. IL-8 production by human polymorphonuclear leukocytes. The chemoattractant formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine induces the gene expression and release of IL-8 through a pertussis toxin-sensitive pathway. **J Immunol.**, v. 148, n. 10, p. 3216-20, May 1992. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1578146> >.

CHAO, W.; OLSON, M. S. Platelet-activating factor: receptors and signal transduction. **Biochem J.**, v. 292 (Pt 3), p. 617-29, Jun 1993. ISSN 0264-6021. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8391253> >.

CHEN, G. Y.; NUÑEZ, G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. **Nat Rev Immunol.**, v. 10, n. 12, p. 826-37, Dec 2010. ISSN 1474-1741. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21088683> >.

CHEN, Y. et al. Inhibition of NF-kappaB activity by IkappaBbeta in association with kappaB-Ras. **Mol Cell Biol.**, v. 24, n. 7, p. 3048-56, Apr 2004. ISSN 0270-7306. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15024091> >.

CHEN, Y.; YANG, L.; LEE, T. J. Oroxylin A inhibition of lipopolysaccharide-induced iNOS and COX-2 gene expression via suppression of nuclear factor-kappaB activation. **Biochem Pharmacol.**, v. 59, n. 11, p. 1445-57, Jun 2000. ISSN 0006-2952. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10751555> >.

CHEW, J. et al. WIP1 phosphatase is a negative regulator of NF-kappaB signalling. **Nat Cell Biol.**, v. 11, n. 5, p. 659-66, May 2009. ISSN 1476-4679. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19377466> >.

CONNELLY, L. et al. Biphasic regulation of NF-kappa B activity underlies the pro- and anti-inflammatory actions of nitric oxide. **J Immunol.**, v. 166, n. 6, p. 3873-81, Mar 2001. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11238631> >.

DEMOPOULOS, C. A.; PINCKARD, R. N.; HANAHAN, D. J. Platelet-activating factor. Evidence for 1-O-alkyl-2-acetyl-sn-glyceryl-3-phosphorylcholine as the active component (a new class of lipid chemical mediators). **J Biol Chem.**, v. 254, n. 19, p. 9355-8, Oct 1979. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/489536> >.

DING, A. H.; NATHAN, C. F.; STUEHR, D. J. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. **J Immunol.**, v. 141, n. 7, p. 2407-12, Oct 1988. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3139757> >.

DOUILLETTE, A. et al. The proinflammatory actions of angiotensin II are dependent on p65 phosphorylation by the IkkappaB kinase complex. **J Biol Chem.**, v. 281, n. 19, p. 13275-84, May 2006. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16513650> >.

FERGUSON, S. S. Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling. **Pharmacol Rev.**, v. 53, n. 1, p. 1-24, Mar 2001. ISSN 0031-6997. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11171937> >.

FERRACINI, M. et al. Clearance of apoptotic cells by macrophages induces regulatory phenotype and involves stimulation of CD36 and platelet-activating factor receptor. **Mediators Inflamm.**, v. 2013, p. 950273, 2013. ISSN 1466-1861. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24347838> >.

FERREIRA, A. E. et al. PPAR-γ/IL-10 axis inhibits MyD88 expression and ameliorates murine polymicrobial sepsis. **J Immunol.**, v. 192, n. 5, p. 2357-65, Mar 2014. ISSN 1550-6606. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24489087> >.

FERRÉ, P. The biology of peroxisome proliferator-activated receptors: relationship with lipid metabolism and insulin sensitivity. **Diabetes**, v. 53 Suppl 1, p. S43-50, Feb 2004. ISSN 0012-1797. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14749265> >.

FILGUEIRAS, L. R. et al. Leukotriene B4-mediated sterile inflammation promotes susceptibility to sepsis in a mouse model of type 1 diabetes. **Sci Signal.**, v. 8, n. 361, p. ra10, Jan 2015. ISSN 1937-9145. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25628460> >.

FLEMING, B. D.; MOSSER, D. M. Regulatory macrophages: setting the threshold for therapy. **Eur J Immunol.**, v. 41, n. 9, p. 2498-502, Sep 2011. ISSN 1521-4141. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21952805> >.

FU, Y. et al. Regulation of tumor necrosis factor alpha promoter by human parvovirus B19 NS1 through activation of AP-1 and AP-2. **J Virol.**, v. 76, n. 11, p. 5395-403, Jun 2002. ISSN 0022-538X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11991968> >.

FUNK, C. D. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. **Science**, v. 294, n. 5548, p. 1871-5, Nov 2001. ISSN 0036-8075. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11729303> >.

GAY, N. J.; GANGLOFF, M. Structure and function of Toll receptors and their ligands. **Annu Rev Biochem.**, v. 76, p. 141-65, 2007. ISSN 0066-4154. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17362201> >.

GERBER, J. S.; MOSSER, D. M. Reversing lipopolysaccharide toxicity by ligating the macrophage Fc gamma receptors. **J Immunol.**, v. 166, n. 11, p. 6861-8, Jun 2001. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11359846> >.

GORDON, S. Pattern recognition receptors: doubling up for the innate immune response. **Cell**, v. 111, n. 7, p. 927-30, Dec 2002. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12507420> >.

HANAHAN, D. J. et al. Identification of platelet activating factor isolated from rabbit basophils as acetyl glyceryl ether phosphorylcholine. **J Biol Chem.**, v. 255, n. 12, p. 5514-6, Jun 1980. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7380824> >.

HAWLISCH, H. et al. C5a negatively regulates toll-like receptor 4-induced immune responses. **Immunity**, v. 22, n. 4, p. 415-26, Apr 2005. ISSN 1074-7613. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15845447> >.

HAYDEN, M. S.; GHOSH, S. NF- κ B, the first quarter-century: remarkable progress and outstanding questions. **Genes Dev.**, v. 26, n. 3, p. 203-34, Feb 2012. ISSN 1549-5477. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22302935> >.

HAYDEN, M. S.; WEST, A. P.; GHOSH, S. NF-kappaB and the immune response. **Oncogene**, v. 25, n. 51, p. 6758-80, Oct 2006. ISSN 0950-9232. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17072327> >.

HEERY, J. M. et al. Oxidatively modified LDL contains phospholipids with platelet-activating factor-like activity and stimulates the growth of smooth muscle cells. **J Clin**

Invest., v. 96, n. 5, p. 2322-30, Nov 1995. ISSN 0021-9738. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7593619> >.

HENSON, P. M. Release of vasoactive amines from rabbit platelets induced by sensitized mononuclear leukocytes and antigen. **J Exp Med.**, v. 131, n. 2, p. 287-306, Feb 1970. ISSN 0022-1007. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5419850> >.

HOCHRAINER, K.; RACCHUMI, G.; ANRATHER, J. Site-specific phosphorylation of the p65 protein subunit mediates selective gene expression by differential NF- κ B and RNA polymerase II promoter recruitment. **J Biol Chem.**, v. 288, n. 1, p. 285-93, Jan 2013. ISSN 1083-351X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23100252> >.

HSIEH, C. Y. et al. Andrographolide enhances nuclear factor-kappaB subunit p65 Ser536 dephosphorylation through activation of protein phosphatase 2A in vascular smooth muscle cells. **J Biol Chem.**, v. 286, n. 8, p. 5942-55, Feb 2011. ISSN 1083-351X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21169355> >.

ISHII, S.; SHIMIZU, T. Platelet-activating factor (PAF) receptor and genetically engineered PAF receptor mutant mice. **Prog Lipid Res.**, v. 39, n. 1, p. 41-82, Jan 2000. ISSN 0163-7827. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10729607> >.

ISHIKAWA, H. et al. Chronic inflammation and susceptibility to bacterial infections in mice lacking the polypeptide (p)105 precursor (NF-kappaB1) but expressing p50. **J Exp Med.**, v. 187, n. 7, p. 985-96, Apr 1998. ISSN 0022-1007. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9529315> >.

JEONG, Y. I. et al. The novel role of platelet-activating factor in protecting mice against lipopolysaccharide-induced endotoxic shock. **PLoS One**, v. 4, n. 8, p. e6503, 2009. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19652714> >.

KANTERS, E. et al. Inhibition of NF-kappaB activation in macrophages increases atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice. **J Clin Invest.**, v. 112, n. 8, p. 1176-85, Oct 2003. ISSN 0021-9738. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14561702> >.

KATRITCH, V.; CHEREZOV, V.; STEVENS, R. C. Structure-function of the G protein-coupled receptor superfamily. **Annu Rev Pharmacol Toxicol.**, v. 53, p. 531-56, 2013. ISSN 1545-4304. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23140243> >.

KAWAGOE, T. et al. Sequential control of Toll-like receptor-dependent responses by IRAK1 and IRAK2. **Nat Immunol.**, v. 9, n. 6, p. 684-91, Jun 2008. ISSN 1529-2916. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18438411> >.

KAWAI, T.; AKIRA, S. Signaling to NF-kappaB by Toll-like receptors. **Trends Mol Med.**, v. 13, n. 11, p. 460-9, Nov 2007. ISSN 1471-4914. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18029230> >.

KLEINERT, H.; SCHWARZ, P. M.; FÖRSTERMANN, U. Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. **Biol Chem.**, v. 384, n. 10-11, p. 1343-64, 2003 Oct-Nov 2003. ISSN 1431-6730. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14669979> >.

KROEZE, W. K.; SHEFFLER, D. J.; ROTH, B. L. G-protein-coupled receptors at a glance. **J Cell Sci.**, v. 116, n. Pt 24, p. 4867-9, Dec 2003. ISSN 0021-9533. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14625380> >.

LANDRY, Y. et al. Heptahelical and other G-protein-coupled receptors (GPCRs) signaling. **Curr Med Chem.**, v. 13, n. 1, p. 51-63, 2006. ISSN 0929-8673. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16457639> >.

LANG, V. et al. betaTrCP-mediated proteolysis of NF-kappaB1 p105 requires phosphorylation of p105 serines 927 and 932. **Mol Cell Biol.**, v. 23, n. 1, p. 402-13, Jan 2003. ISSN 0270-7306. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12482991> >.

LEHR, H. A. et al. Vitamin C blocks inflammatory platelet-activating factor mimetics created by cigarette smoking. **J Clin Invest.**, v. 99, n. 10, p. 2358-64, May 1997. ISSN 0021-9738. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9153277> >.

LIU, R. H.; HOTCHKISS, J. H. Potential genotoxicity of chronically elevated nitric oxide: a review. **Mutat Res.**, v. 339, n. 2, p. 73-89, Jun 1995. ISSN 0027-5107. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7791803> >.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-8, Dec 2001. ISSN 1046-2023. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11846609> >.

LOPEZ-ILASACA, M. Signaling from G-protein-coupled receptors to mitogen-activated protein (MAP)-kinase cascades. **Biochem Pharmacol.**, v. 56, n. 3, p. 269-77, Aug 1998. ISSN 0006-2952. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9744561> >.

MACKENZIE, K. F. et al. PGE(2) induces macrophage IL-10 production and a regulatory-like phenotype via a protein kinase A-SIK-CRTC3 pathway. **J Immunol.**, v. 190, n. 2, p. 565-77, Jan 2013. ISSN 1550-6606. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23241891> >.

MARATHE, G. K. et al. Ultraviolet B radiation generates platelet-activating factor-like phospholipids underlying cutaneous damage. **J Biol Chem.**, v. 280, n. 42, p. 35448-57, Oct 2005. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16115894> >.

MARQUES, M. et al. Identification of platelet-activating factor acetylhydrolase II in human skin. **J Invest Dermatol.**, v. 119, n. 4, p. 913-9, Oct 2002. ISSN 0022-202X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12406338> >.

MCMANUS, L. M.; PINCKARD, R. N. PAF, a putative mediator of oral inflammation. **Crit Rev Oral Biol Med.**, v. 11, n. 2, p. 240-58, 2000. ISSN 1045-4411. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12002818> >.

MUKHOPADHYAY, S. et al. The potential for Toll-like receptors to collaborate with other innate immune receptors. **Immunology**, v. 112, n. 4, p. 521-30, Aug 2004. ISSN 0019-2805. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15270722> >.

MURPHY, R. C. Free radical-induced oxidation of glycerophosphocholine lipids and formation of biologically active products. **Adv Exp Med Biol.**, v. 416, p. 51-8, 1996. ISSN 0065-2598. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9131126> >.

NEVES, S. R.; RAM, P. T.; IYENGAR, R. G protein pathways. **Science**, v. 296, n. 5573, p. 1636-9, May 2002. ISSN 1095-9203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12040175> >.

NICHOLAS, C. et al. Apigenin blocks lipopolysaccharide-induced lethality in vivo and proinflammatory cytokines expression by inactivating NF-kappaB through the suppression of p65 phosphorylation. **J Immunol.**, v. 179, n. 10, p. 7121-7, Nov 2007. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17982104> >.

OECKINGHAUS, A.; GHOSH, S. The NF-kappaB family of transcription factors and its regulation. **Cold Spring Harb Perspect Biol.**, v. 1, n. 4, p. a000034, Oct 2009. ISSN 1943-0264. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20066092> >.

OH, J. W. et al. Effects of phenylethanoid glycosides from *Digitalis purpurea* L. on the expression of inducible nitric oxide synthase. **J Pharm Pharmacol.**, v. 57, n. 7, p. 903-10, Jul 2005. ISSN 0022-3573. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15969951> >.

PERKINS, N. D. Integrating cell-signalling pathways with NF-kappaB and IKK function. **Nat Rev Mol Cell Biol.**, v. 8, n. 1, p. 49-62, Jan 2007. ISSN 1471-0072. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17183360> >.

PINHAL-ENFIELD, G. et al. An angiogenic switch in macrophages involving synergy between Toll-like receptors 2, 4, 7, and 9 and adenosine A(2A) receptors. **Am J Pathol.**, v. 163, n. 2, p. 711-21, Aug 2003. ISSN 0002-9440. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12875990> >.

PRESCOTT, S. M. et al. Platelet-activating factor and related lipid mediators. **Annu Rev Biochem.**, v. 69, p. 419-45, 2000. ISSN 0066-4154. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10966465> >.

RICE, N. R.; MACKICHAN, M. L.; ISRAËL, A. The precursor of NF-kappa B p50 has I kappa B-like functions. **Cell**, v. 71, n. 2, p. 243-53, Oct 1992. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1423592> >.

RIOS, F. J. et al. Uptake of oxLDL and IL-10 production by macrophages requires PAFR and CD36 recruitment into the same lipid rafts. **PLoS One**, v. 8, n. 10, p. e76893, 2013. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24130805> >.

RITTER, S. L.; HALL, R. A. Fine-tuning of GPCR activity by receptor-interacting proteins. **Nat Rev Mol Cell Biol.**, v. 10, n. 12, p. 819-30, Dec 2009. ISSN 1471-0080. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19935667> >.

ROUBIN, R. et al. Biosynthesis of platelet-activating factor (PAF-acether). IV. Impairment of acetyl-transferase activity in thioglycollate-elicited mouse macrophages. **J Immunol.**, v. 129, n. 2, p. 809-13, Aug 1982. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6806384> >.

SAHU, R. P. et al. Cigarette smoke exposure inhibits contact hypersensitivity via the generation of platelet-activating factor agonists. **J Immunol.**, v. 190, n. 5, p. 2447-54, Mar 2013. ISSN 1550-6606. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23355733> >.

SAHU, R.P. et al. The environmental stressor ultraviolet B radiation inhibits murine antitumor immunity through its ability to generate platelet-activating factor agonists. **Carcinogenesis**, v. 33, n. 7, p. 1360-7, Jul 2012. ISSN 1460-2180. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22542595> >.

SALMERÓN, A. et al. Direct phosphorylation of NF-kappaB1 p105 by the IkappaB kinase complex on serine 927 is essential for signal-induced p105 proteolysis. **J Biol Chem.**, v. 276, n. 25, p. 22215-22, Jun 2001. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11297557> >.

SARAIVA, M.; O'GARRA, A. The regulation of IL-10 production by immune cells. **Nat Rev Immunol.**, v. 10, n. 3, p. 170-81, Mar 2010. ISSN 1474-1741. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20154735> >.

SEREZANI, C. H. et al. Macrophage dectin-1 expression is controlled by leukotriene B4 via a GM-CSF/PU.1 axis. **J Immunol.**, v. 189, n. 2, p. 906-15, Jul 2012. ISSN 1550-6606. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22696442> >.

SEREZANI, C. H. et al. Leukotriene B4 amplifies NF-kB activation in mouse macrophages by reducing SOCS1 inhibition of MyD88 expression. **J Clin Invest.**, v. 121, n. 2, p. 671-82, Feb 2011. ISSN 1558-8238. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21206089> >.

SILVERSTEIN, R. L.; FEBBRAIO, M. CD36, a scavenger receptor involved in immunity, metabolism, angiogenesis, and behavior. **Sci Signal.**, v. 2, n. 72, p. re3, 2009. ISSN 1937-9145. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19471024> >.

SMILEY, P. L. et al. Oxidatively fragmented phosphatidylcholines activate human neutrophils through the receptor for platelet-activating factor. **J Biol Chem.**, v. 266, n. 17, p. 11104-10, Jun 1991. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1645725> >.

SNYDER, F. Metabolic processing of PAF. **Clin Rev Allergy**, v. 12, n. 4, p. 309-27, 1994. ISSN 0731-8235. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7743460> >.

TAKEDA, K.; AKIRA, S. Toll-like receptors in innate immunity. **Int Immunol.**, v. 17, n. 1, p. 1-14, Jan 2005. ISSN 0953-8178. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15585605> >.

TAKEUCHI, O.; AKIRA, S. Pattern recognition receptors and inflammation. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 805-20, Mar 2010. ISSN 1097-4172. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20303872> >.

TONE, M. et al. IL-10 gene expression is controlled by the transcription factors Sp1 and Sp3. **J Immunol.**, v. 165, n. 1, p. 286-91, Jul 2000. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10861063> >.

TSUYUKI, K. et al. Possible participation of intracellular platelet-activating factor in NF-kappaB activation in rat peritoneal macrophages. **Biochim Biophys Acta**, v. 1583, n. 1, p. 26-34, Jun 2002. ISSN 0006-3002. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12069846> >.

TYAGI, S. et al. The peroxisome proliferator-activated receptor: A family of nuclear receptors role in various diseases. **J Adv Pharm Technol Res.**, v. 2, n. 4, p. 236-40, Oct 2011. ISSN 0976-2094. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22247890> >.

TYNDALL, J. D.; SANDILYA, R. GPCR agonists and antagonists in the clinic. **Med Chem.**, v. 1, n. 4, p. 405-21, Jul 2005. ISSN 1573-4064. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16789897> >.

VALLABHAPURAPU, S.; KARIN, M. Regulation and function of NF-kappaB transcription factors in the immune system. **Annu Rev Immunol.**, v. 27, p. 693-733, 2009. ISSN 0732-0582. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19302050> >.

VENABLE, M. E. et al. Platelet-activating factor: a phospholipid autacoid with diverse actions. **J Lipid Res.**, v. 34, n. 5, p. 691-702, May 1993. ISSN 0022-2275. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8389794> >.

VERMEULEN, L. et al. Regulation of the transcriptional activity of the nuclear factor-kappaB p65 subunit. **Biochem Pharmacol.**, v. 64, n. 5-6, p. 963-70, Sep 2002. ISSN 0006-2952. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12213593> >.

WEN, A. Y.; SAKAMOTO, K. M.; MILLER, L. S. The role of the transcription factor CREB in immune function. **J Immunol.**, v. 185, n. 11, p. 6413-9, Dec 2010. ISSN 1550-6606. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21084670> >.

WYNN, T. A.; CHAWLA, A.; POLLARD, J. W. Macrophage biology in development, homeostasis and disease. **Nature**, v. 496, n. 7446, p. 445-55, Apr 2013. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23619691> >.

XIE, P. et al. Activation of NF-kappa B by bradykinin through a Galpha(q)- and Gbeta gamma-dependent pathway that involves phosphoinositide 3-kinase and Akt. **J Biol Chem.**, v. 275, n. 32, p. 24907-14, Aug 2000. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10801799> >.

YANG, F. et al. IKK beta plays an essential role in the phosphorylation of RelA/p65 on serine 536 induced by lipopolysaccharide. **J Immunol.**, v. 170, n. 11, p. 5630-5, Jun 2003. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12759443> >.

ZHANG, X. et al. Regulation of Toll-like receptor-mediated inflammatory response by complement in vivo. **Blood**, v. 110, n. 1, p. 228-36, Jul 2007. ISSN 0006-4971. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17363730> >.

ZHONG, H.; VOLL, R. E.; GHOSH, S. Phosphorylation of NF-kappa B p65 by PKA stimulates transcriptional activity by promoting a novel bivalent interaction with the coactivator CBP/p300. **Mol Cell.**, v. 1, n. 5, p. 661-71, Apr 1998. ISSN 1097-2765. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9660950> >.

ZIEGLER, T. et al. A novel regulatory macrophage induced by a helminth molecule instructs IL-10 in CD4+ T cells and protects against mucosal inflammation. **J Immunol.**, v. 194, n. 4, p. 1555-64, Feb 2015. ISSN 1550-6606. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25589067> >.

ZIEGLER-HEITBROCK, L. et al. IFN-alpha induces the human IL-10 gene by recruiting both IFN regulatory factor 1 and Stat3. **J Immunol.**, v. 171, n. 1, p. 285-90, Jul 2003. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12817009> >.

APÊNDICES

A – Ishizuka EK, Filgueiras LR, Rios FJ, SerezaniCH, Jancar S. PAFR activation of NF- κ B p65 or p105 precursor dictates pro- and anti-inflammatory response during TLR activation in murine macrophages.

B – Filgueiras LR, Koga MM, Quaresma PG, **Ishizuka EK**, Montes MBA, Prada PO, Saad MJ, Jancar S, Rios FJ. PAFR in adipose tissue macrophages is associated with anti-inflammatory phenotype and metabolic homeostasis.

A – Ishizuka EK, Filgueiras LR, Rios FJ, SerezaniCH, Jancar S. PAFR activation of NF- κ B p65 or p105 precursor dictates pro- and anti-inflammatory response during TLR activation in murine macrophages (em processo de submissão)

PAFR activation of NF- κ B p65 or p105 precursor dictates pro-and anti-inflammatory response during TLR activation in murine macrophages

Edson K. Ishizuka¹, Luciano R. Filgueiras¹, Francisco J. Rios², Carlos H. Serezani³, Sonia Jancar^{1*}

1 Department of Immunology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil,

2 Institute of Cardiovascular and Medical Sciences, BHF Glasgow Cardiovascular Research Centre, University of Glasgow, Glasgow, United Kingdom,

3 Department of Microbiology and Immunology, Indiana University School of Medicine, Indianapolis, Indiana, United States of America (46202)

Running title: PAFR modulates TLR responsiveness

Key words: Platelet activating aactor receptor, Toll-like receptor, NF- κ B, macrophage, NF- κ B p65, NF- κ B p105

* corresponding author

Email: sojancar@icb.usp.br

*Address correspondence: Dr Sonia Jancar, Department of Immunology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, 05508-900

ABSTRACT

Platelet-activating factor receptor (PAFR) is a G protein-coupled receptor (GPCR) implicated in many chronic diseases. Toll-like receptors (TLRs) play a critical role in shaping innate and adaptive immune response. It remains to be fully understood whether PAFR signaling changes the fate of TLR activation in macrophages. In this study, we investigated the effect of PAFR activation in the responsiveness of macrophages to MyD88-dependent and -independent agonists, such as Pam3Cys (TLR2), LPS (TLR4) and Poly(I:C) (TLR3). Exogenous PAF inhibited the production of pro-inflammatory cytokines (IL-12p40, IL-6 and TNF- α) and increased anti-inflammatory IL-10 in macrophages challenged with Pam3Cys and LPS, but not by Poly(I:C). PAF did not affect mRNA expression of MyD88, suggesting that the inhibitory effect of PAF is on the signaling programs elicited by TLRs. PAF inhibited LPS-induced phosphorylation of NF- κ B p65 that induces inflammatory cytokine gene expression and increased NF- κ B p105 phosphorylation which drives IL-10 mRNA expression. These findings indicate that the impaired transcriptional activity of p65 subunit and enhanced p105 phosphorylation induced by PAF are responsible for the down-regulation of pro-inflammatory cytokines and up-regulation of IL-10, respectively in PAF+LPS-challenged macrophages. Together, our data unveil a heretofore-unrecognized role for the PAFR in MyD88-dependent activation of NF- κ B in macrophages.

B – Filgueiras LR, Koga MM, Quaresma PG, Ishizuka EK, Montes MBA, Prada PO, Saad MJ, Jancar S, Rios FJ. PAFR in adipose tissue macrophages is associated with anti-inflammatory phenotype and metabolic homeostasis.

Clinical Science (2016) 130, 601–612 doi: 10.1042/CS20150538

Original Paper

PAFR in adipose tissue macrophages is associated with anti-inflammatory phenotype and metabolic homeostasis

Luciano Ribeiro Filgueiras*, Marianna Mainardi Koga*, Paula G. Quaresma†, Edson Kiyotaka Ishizuka*, Marlise B.A. Montes*, Patricia O. Prada†‡, Mario J. Saad†, Sonia Jancar* and Francisco J. Rios§

*Department of Immunology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

†Department of Internal Medicine, State University of Campinas (UNICAMP), Campinas, SP Brazil

‡School of Applied Sciences, State University of Campinas (UNICAMP), Limeira, SP Brazil

§Institute of Cardiovascular and Medical Sciences, BHF Glasgow Cardiovascular Research Centre, University of Glasgow, 126 University Place, Glasgow G12 8TA, U.K.

Abstract

Metabolic dysfunction is associated with adipose tissue inflammation and macrophage infiltration. PAFR (platelet-activating factor receptor) is expressed in several cell types and binds to PAF (platelet-activating factor) and oxidized phospholipids. Engagement of PAFR in macrophages drives them towards the anti-inflammatory phenotype. In the present study, we investigated whether genetic deficiency of PAFR affects the phenotype of ATMs (adipose tissue macrophages) and its effect on glucose and insulin metabolism. PAFRKO (PAFR-knockout) and WT (wild-type) mice were fed on an SD (standard diet) or an HFD (high-fat diet). Glucose and insulin tolerance tests were performed by blood monitoring. ATMs were evaluated by FACS for phenotypic markers. Gene and protein expression was investigated by real-time reverse transcription–quantitative PCR and Western blotting respectively. Results showed that the epididymal adipose tissue of PAFRKO mice had increased gene expression of *Ccr7*, *Nos2*, *Il6* and *Il12*, associated with pro-inflammatory mediators, and reduced expression of the anti-inflammatory *Il10*. Moreover, the adipose tissue of PAFRKO mice presented more pro-inflammatory macrophages, characterized by an increased frequency of F4/80⁺CD11c⁺ cells. Blood monocytes of PAFRKO mice also exhibited a pro-inflammatory phenotype (increased frequency of Ly6C⁺ cells) and PAFR ligands were detected in the serum of both PAFRKO and WT mice. Regarding metabolic parameters, compared with WT, PAFRKO mice had: (i) higher weight gain and serum glucose concentration levels; (ii) decreased insulin-stimulated glucose disappearance; (iii) insulin resistance in the liver; (iv) increased expression of *Ldlr* in the liver. In mice fed on an HFD, some of these changes were potentiated, particularly in the liver. Thus it seems that endogenous ligands of PAFR are responsible for maintaining the anti-inflammatory profile of blood monocytes and ATMs under physiological conditions. In the absence of PAFR signalling, monocytes and macrophages acquire a pro-inflammatory phenotype, resulting in adipose tissue inflammation and metabolic dysfunction.

Key words: adipose tissue, glucose, insulin, macrophages, platelet-activating factor receptor.

INTRODUCTION

The incidence of insulin resistance, the hallmark of T2D (Type 2 diabetes), has increased dramatically as a consequence of the increase in worldwide obesity [1,2]. Under physiological conditions, the adipose tissue contributes to homeostasis by producing hormones, lipid mediators, adipokines and growth factors, which play an important role in glucose metabolism. In the obese stage,

however, adipose tissue shows a high inflammatory profile that leads to metabolic disturbances such as glucose intolerance and insulin resistance [3].

ATMs (adipose tissue macrophages) are the predominant leucocyte observed in metabolically healthy and also insulin-resistant fat in both humans and mice models [4,5]. In metabolically healthy conditions, ATMs represent between 5 and 10% of the total cell population in WAT (white adipose tissue) and

Abbreviations: ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; ATM, adipose tissue macrophage; CCR, CC chemokine receptor; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; GTT, glucose tolerance test; H&E, haematoxylin and eosin; HFD, high-fat diet; IL, interleukin; iNOS, inducible nitric oxide synthase; i.p., intraperitoneal; ITT, insulin tolerance test; LDH, lactate dehydrogenase; PAF, platelet-activating factor; PAFR, PAF receptor; PAFRKO, PAFR-knockout; PBMC, peripheral blood mononuclear cell; PE, phycoerythrin; PI3K, phosphoinositide 3-kinase; SD, standard diet; T2D, Type 2 diabetes; WAT, white adipose tissue; WT, wild-type.

Correspondence: Dr Francisco Rios (email Francisco.Rios@glasgow.ac.uk).