ELAINE UCHIMA UEHARA

ATIVIDADE IMUNOMODULADORA DO ÓXIDO NÍTRICO NA
RESPOSTA *IN VITRO* DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE
RECÉM-NATOS E ADULTOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de mestre em Ciências.

Área de concentração: Imunologia

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Alessandra Pontillo

Coorientador: Prof. Dr. Cyro Alves de Brito

Versão corrigida. A versão original eletrônica, encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

São Paulo
2017

RESUMO

UEHARA, E. U. **Atividade imunomoduladora do óxido nítrico na resposta *in vitro* de células mononucleares de recém-natos e adultos.** Dissertação (Mestrado em Imunologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

O período neonatal é marcado por uma maior susceptibilidade a diversas infecções, devido a uma dificuldade do seu sistema imune de gerar respostas pró-inflamatórias e de perfil Th1. As atividades microbicidas do óxido nítrico já são muito bem descritas, entretanto, seu potencial como molécula imunorreguladora vem chamando a atenção, e o número de publicações relatando essas atividades vem crescendo. Assim, a proposta deste trabalho foi avaliar as potenciais atividades imunomoduladoras deste composto, e sua capacidade em reverter esse perfil anti-inflamatório e Th2 tão característico do período neonatal. Para tanto, células mononucleares de adultos e neonatos foram isoladas a partir de sangue periférico e de cordão umbilical, respectivamente. Estas células foram estimuladas com agonistas de TLR ou PHA, na presença do inibidor de óxido nítrico sintase, NOS (L-NAME), ou do doador de NO, NOC-18. Os resultados mostraram uma menor secreção de citocinas pró (IL-1 β , TNF- α , IL-6) e anti-inflamatórias (IL-10) nas células de adultos tratadas com L-NAME e estimuladas com CL097 e LPS. O mesmo foi observado para as células de neonatos quanto à secreção de TNF- α , IL-6 e IL-10. O estímulo com o agonista de TLR3, Poly I:C, em contrapartida, parece não ser modulado pela inibição das NOS, já que não houve mudança na secreção de citocinas quando apenas o estímulo inato foi utilizado, para os dois grupos. A adição do doador de NO, entretanto, parece não ter modulado a secreção destas 4 citocinas em neonatos, e em adultos. De forma geral, o estímulo policlonal de PHA, em conjunto com NOC-18 não alterou proliferação, ativação e apoptose de linfócitos de adultos, entretanto, causou uma alteração do perfil de citocinas secretadas (aumento de IL-4, IL-2, IL-10 e TNF- α). Nos neonatos, em contrapartida, não houve alteração no perfil de citocinas secretadas, mas foi possível observar um aumento da população de linfócitos T CD4⁺ ativados, além da maior expressão de CD69 nestes. Em conjunto, os dados indicam que o NO pode gerar alterações diferentes nas células mononucleares de adultos e neonatos, corroborando com as divergências já descritas entre os dois sistemas imunes, e ressaltando outros pontos nos quais as células tem susceptibilidades distintas. Já se sabe que os neonatos possuem menores quantidades de enzimas antioxidantes, possibilitando um acúmulo de espécies reativas, que tem potencial para reagir com o NO e causar modificações proteicas como a S-nitrosilação. O crescente número de publicações sobre as modificações que o NO é capaz de causar em proteínas, e como eles podem regular diversos processos celulares nos leva a acreditar que, nos neonatos, o NO é capaz de nitrosilar enzimas e/ou fatores de transcrição que estejam envolvidos nos processos celulares alterados que foram observados.

Palavras-chave: Óxido nítrico. Neonato. Nitrosilação. Imunidade neonatal. iNOS.

ABSTRACT

UEHARA, E. U. **Nitric oxide immunomodulatory activity in newborn and adult mononuclear cell responses *in vitro***. Masters Thesis (Immunology). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Early life is characterized by an increased susceptibility to a variety of infections because the difficult that newborn immune system has to develop proinflammatory and Th1 responses. Nitric oxide's microbicidal activities are well described, however, its immunomodulatory potential have been drawing attention, and the number of publications describing these activities is booming. Then, the proposal of this work was to evaluate NO-immunomodulatory properties, and whether NO is able to exchange anti-inflammatory and Th2 responses, which is the main characteristic of newborn immune system. For this purpose, adult and newborn's mononuclear cells were isolated from peripheral and cord blood, respectively. Cells were stimulated with TLR agonists and PHA, in the presence of nitric oxide synthase inhibitor, L-NAME, or an NO-donor, NOC-18. There were less pro (IL-1 β , TNF- α and IL-6) and anti-inflammatory (IL-10) cytokine release in L-NAME-treated cells stimulated with CL097 and LPS. The same was observed in newborn mononuclear cells to TNF- α , IL-6 and IL-10 release. TLR3 stimulus (Poly I:C), however, apparently were not modulated by NOS inhibition once there were no cytokine release changes in comparison to the situation with TLR stimulus alone, in both groups. NO-donor addition, however, did not modulate these inflammatory cytokine release, in adults and neonates. In a general way, polyclonal stimulus, PHA, together with NOC-18 did not change proliferation, activation and apoptosis rates in adult lymphocytes, nevertheless, changed the cytokine profile release (increasing IL-4, IL-2, IL-10 and TNF- α secretion). In spite of, in neonates, there were no modulation of cytokine release, but we were able to see an increase number of activated T CD4⁺ cells, and a higher CD69 expression on it. In resume, results indicates NO is able to have different effects in newborn and adult mononuclear cells, corroborating with the differences that have already been described between both immune systems, and highlighting point in which they have different susceptibilities. Is it already known that neonates have lower amounts of antioxidant enzymes, allowing an accumulation of reactive species, which has the potential to react with NO and to cause protein modifications such as S-nitrosylation. The increasing number of publication on the modification that NO is able to cause in proteins, and how they can regulate several cellular processes lead us to believe that, in neonates, NO is able to nitrosylates enzymes and/or transcription factors that are involved in the altered cellular processes that we observed.

Keywords: Nitric oxide. Newborn. Nitrosylation. Neonate immunity. iNOS

INTRODUÇÃO

1 Introdução

Mesmo com o avanço da ciência e da medicina, a primeira infância ainda é um período crítico onde aproximadamente 40% dos óbitos de crianças até 5 anos de idade ocorre enquanto elas ainda são recém-nascidas. Ao menos 60% destes óbitos são decorrentes de prematuridade e/ou infecções (BHUTTA; BLACK, 2013; LIU et al., 2012). Por isso, em função desta elevada taxa de letalidade, e à maior susceptibilidade a diversas infecções, o período neonatal recebe especial atenção.

Durante muito tempo atribuiu-se essa susceptibilidade nos recém-natos a um sistema imune deficiente e menos desenvolvido, denominações consideradas mal-empregadas atualmente. Nos dias atuais, os pesquisadores preferem atribuir essas diferenças na responsividade do sistema imune do neonato à fase de transição pelo qual ele passa, de um ambiente “estéril”, dentro da placenta, e sob a influência de diversos sinais anti-inflamatórios necessários para a manutenção da gestação, para um mundo externo repleto de antígenos e patógenos (ADKINS et al., 2014; KOLLMANN et al., 2017; ZHANG et al., 2017). Soma-se a essa mudança de microambiente, a colonização bacteriana em diversas superfícies do corpo, como pele e trato gastrointestinal (GENSOLLEN et al., 2016). Sendo assim, é necessário que o sistema imune do recém-nascido seja capaz de combater infecções, mas ao mesmo tempo, que não reaja de maneira exacerbada a alguns estímulos microbianos, a fim de evitar processos inflamatórios intensos.

Alguns pontos nos quais os sistemas imunes de neonatos e adultos divergem já foram descritos, e estes contemplam desde a resposta imune inata até a adaptativa.

1.1 Imunidade inata neonatal

A imunidade inata dos neonatos é foco de muitos estudos, dada sua importância como primeira linha de defesa do organismo, e sua capacidade de direcionar a resposta imune adaptativa (GOENKA; KOLLMANN, 2015; KOLLMANN et al., 2012).

Logo ao nascer, o recém-nato, nascido a termo, é recoberto pela chamada vernix caseosa, secreção branca de glândulas sebáceas fetais que recobre o neonato nos primeiros dias de vida. Essa secreção contém uma série de peptídeos antimicrobianos como lisozima e β -defesinas que vão atuar como primeira barreira física na defesa contra microorganismos (TOLLIN et al., 2005) (**Figura 1**).

Ao contrário do que se pode pensar, a quantidade de células (como monócitos, células dendríticas e neutrófilos) nesse período é bastante semelhante ao que é encontrado em indivíduos adultos (GOENKA; KOLLMANN, 2015; GUILMOT et al., 2011; KOLLMANN et al., 2009; LEVY et al., 1999), entretanto, funcionalmente, o que se observa é uma reduzida capacidade dessas células de induzir respostas pró-inflamatórias.

Os neutrófilos neonatais possuem atividade fagocítica diminuída (SILVEIRA-LESSA et al., 2016), além de quantidades de duas a quatro vezes menores de peptídeos antimicrobianos pré-formados (LEVY et al., 1999), o que dificulta a eliminação de bactérias Gram negativas, e pode aumentar a susceptibilidade dos neonatos frente à sepse, por exemplo.

As células NK, por sua vez, encontram-se em número bastante aumentado no sangue periférico dos recém-natos quando comparadas com adultos. Após o nascimento, a quantidade dessas células cai progressivamente, atingindo números semelhantes aos de um adulto até os 5 anos de idade. Apesar desse número aumentado de células, há uma grande deficiência nas respostas antivirais e antitumorais devido a dificuldades que essas células NK têm para secretar IFN- γ (GUILMOT et al., 2011).

As células inatas neonatais têm maior dificuldade de expressar moléculas coestimuladoras e secretar citocinas importantes não só para uma correta ativação, mas também para um direcionamento adequado da resposta imune celular. Monócitos e células dendríticas (convencionais e plasmocitóides) de neonatos secretam quantidades menores de TNF- α , IL-12p70 e IFN- γ , e expressam menos CD80, CD86 e moléculas de MHC de classe II após ativação via receptores do tipo *Toll* (TLR). O número de DCs polifuncionais para essas citocinas também se encontra diminuído (KOLLMANN et al., 2009).

A expressão de receptores de imunidade inata como os TLR e os *NOD-like receptors* (NLR) também se encontra conservada e estável nos recém-natos, entretanto, funcionalmente, percebe-se algumas diferenças que tornam esse tipo de imunidade nesse período da vida um pouco menos eficiente (DOWLING; LEVY, 2014).

Fatores solúveis como as proteínas do sistema complemento encontram-se não só diminuídas no início da vida (cerca de dois terços da quantidade encontrada em adultos), como possuem menores capacidades opsonizantes e líticas (MCGREAL et al., 2012) (**Figura 1**).

As concentrações de adenosina, purina endógena, ao contrário dos demais fatores solúveis, encontram-se mais elevadas no plasma de neonatos (cerca de quatro vezes mais) e pode exercer funções supressoras nas células imunes (**Figura 1**). Esta pode se ligar em seus receptores de membrana, aumentando a concentração intracelular do segundo mensageiro, o monofosfato cíclico de adenosina (AMPc). Já há relatos mostrando que, em células mononucleares neonatais, as concentrações de AMPc são até 20 vezes maiores do que nas de adultos, e que isso impacta diretamente na inibição da transcrição de uma série de citocinas responsáveis pela polarização de perfil Th1, e aumenta a secreção de citocinas que direcionam para um perfil regulador (IL-10) e Th17 (IL-6 e IL-23) (HASKÓ et al., 2000; KOLLMANN et al., 2012; LEVY et al., 2006). Os maiores níveis desse segundo mensageiro interferem, por exemplo, na sinalização pelo TLR2, através da inibição da fosforilação da MAPK, interferindo diretamente na secreção de citocinas pró-inflamatórias (KOLLMANN et al., 2012).

A dificuldade das pDCS de transcrever e secretar IFN do tipo I ocorre devido a um problema na translocação do IRF7 para o núcleo, e consequentemente problemas na transcrição dos genes de IFN- α e IFN- β (DANIS et al., 2008). A ligação de IRF3 ao coativador CBP é menor nos neonatos, e isso interfere diretamente na secreção das mesmas citocinas pós estímulo via TLR3 e TLR4 TRIF-dependente e na transcrição de genes induzidos por IFN (*Interferon-stimulated genes* - ISGs) (AKSOY et al., 2007).

A exposição das células NK ao TGF- β (secretado provavelmente por células T reguladoras) inibe uma correta maturação destas, além de afetar diretamente a secreção de IFN- γ e a desgranulação dessas células em

humanos e camundongos. Essa citocina reguladora suprime o aumento de expressão de fatores de transcrição, como t-bet e GATA3, necessários nos últimos estágios de maturação e desenvolvimento das NK (IVARSSON et al., 2013; MARCOE et al., 2012).

Recentemente houve a descrição das células eritróides CD71+, que também parecem contribuir para o microambiente anti-inflamatório dos neonatos (**Figura 1**). Estas foram descritas como células eritróides, nucleadas, que expressam grandes quantidades de arginase-2 e parecem ser importantes para controlar a inflamação local gerada no trato gastrointestinal após colonização bacteriana (ELAHI et al., 2013).

Outro tipo celular, que parece estar aumentado na primeira infância, e que colabora com a supressão das respostas imunes são as MDSCs (*Myeloid-derived suppressor cell* ou células mielóide supressoras) (**Figura 1**). Estas células de origem mielóide são caracterizadas por induzirem a supressão *in vitro* de linfócitos e células NK através de diversos mecanismos, dentre eles a expressão de iNOS e arginase-1, e a produção de espécies reativas de oxigênio (GANTT et al., 2014; GERVASSI et al., 2014).

Muitos destes fatores, característicos da resposta imune inata neonatal, exercem importante impacto no desenvolvimento de respostas adaptativas. A dificuldade das DCs em secretarem IL-12p70 e IFN- γ e aumentar a expressão de moléculas coestimuladoras, como CD80 e CD86, favorece a diferenciação dos linfócitos TCD4+ em Th2, Th17 e até mesmo em T reguladoras (Treg). Esse perfil de resposta imune, com menor secreção de citocinas pró-inflamatórias e de padrão Th1, favorece a maior susceptibilidade a uma série de infecções por patógenos intracelulares.

Figura 1 - Fatores imunes presentes na pele, mucosas e no sangue durante a vida fetal, em neonatos pré-termo e termo, durante a infância e na vida adulta. Durante a vida fetal, e logo após o nascimento, durante o período neonatal, o recém-nato apresenta uma série de fatores que contribuem para a supressão do seu sistema imune (adenosina plasmática, células T reguladoras, células eritróides). Todos esses fatores visam, principalmente, evitar uma resposta imune exacerbada frente à colonização microbiana que estão sofrendo. Apesar destes, os neonatos contam com alguns fatores protetivos como os peptídeos antimicrobianos da vernix caseosa e os anticorpos maternos (adquiridos por passagem transplacentária, ou pela amamentação). Com o amadurecimento do sistema imune, há uma diminuição desses fatores supressores/reguladores, e um aumento de outros elementos que irão colaborar para uma resposta eficiente contra diversos tipos de patógenos (ILCs, proteínas e peptídeos antimicrobianos, componentes do sistema complemento, e uma maior e melhor polarização dos linfócitos para o perfil Th1) (KOLLMANN et al., 2017).

1.2 Imunidade adaptativa neonatal

A limitada exposição a antígenos intraútero faz com que os neonatos tenham um repertório limitado não só de linfócitos T e B de memória, mas também de células efectoras. Além disso, a resposta imune inata, pouco eficaz no combate a potenciais patógenos, interfere na resposta dos neonatos a muitos patógenos, e ao desenvolvimento de uma resposta protetora pós-vacinação (ADKINS, 2007; DOWLING; LEVY, 2014; THOME et al., 2016).

As maiores concentrações de IL-10 parecem agir de forma autócrina nas DCs de cordão, limitando a sua maturação, e somada à ausência de IL-12 e IFN- γ , favorecem a polarização dos linfócitos T CD4⁺ neonatais em Th2 (LANGRISH et al., 2002) (**Figura 2**). Além dos fatores imunes, fatores epigenéticos colaboram para essa maior polarização Th2 no período neonatal. Os *loci* das citocinas características do perfil Th2 (IL-4, IL-5 e IL-13) encontram-se mais disponíveis pela menor metilação do CNS-1, um *enhancer* e co-regulador da expressão destas citocinas. Assim, linfócitos de neonatos quando estimulados (mesmo em condições não polarizantes) respondem rapidamente com maiores secreções de IL-4, enquanto que linfócitos adultos (que possuem o CNS-1 hipermetilado) não só demoram mais tempo, mas também necessitam de citocinas que direcionem sua resposta para um perfil Th2 (ZAGHOUBANI et al., 2009).

Por sua vez, a maior secreção de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β , IL-6 e IL-23 pelas células mononucleares neonatais favoreceriam a diferenciação dos mesmos linfócitos em Th17 (KOLLMANN et al., 2009) (**Figura 2**), entretanto, o que se observa, é uma maior dificuldade na diferenciação desses linfócitos, ocasionado por uma menor expressão do RNA mensageiro de seu fator de transcrição, ROR γ t (DE ROOCK et al., 2013).

A maior proporção de células T reguladoras (30 a 40% do total de células T CD4⁺) tanto na periferia quanto em órgãos linfoides de neonatos, quando comparado com adultos, corrobora para essa dificuldade de desenvolver respostas de perfil Th1 (THOME et al., 2016) (**Figura 2**). Funcionalmente, *in vitro*, a depleção dessas células reguladoras neonatais aumenta a proliferação de linfócitos, a secreção de citocinas, e melhora a

resposta contra patógenos de forma epítipo-específica (BRUSTOSKI et al., 2006; FERNANDEZ et al., 2008; LEGRAND et al., 2006; THOME et al., 2016).

Figura 2 - Perfil de polarização de respostas de linfócitos em diferentes períodos da vida. O período neonatal é marcado por uma maior resposta anti-inflamatória, e uma polarização de perfil Th2 e regulador. Após este período, os indivíduos tornam-se mais capazes de desenvolver respostas pró-inflamatórias, antivirais e polarizar sua resposta para um perfil Th1 (KOLLMANN et al., 2012).

Tal dificuldade em desenvolver uma resposta eficiente de linfócitos T vai afetar também o desenvolvimento de centros germinativos, e consequentemente de linfócitos B. Apesar de tardia, e em menores quantidades, camundongos imunizados no nascimento são capazes de gerar centros germinativos, expressar enzimas importantes para a troca de classe de imunoglobulinas como a AID (*Activation-induced Citidine Deaminase* – Citidina Deaminase induzida por ativação), e secretar anticorpos quando comparados com animais adultos (MUNGUÍA-FUENTES et al., 2017). Entretanto, nesse período, os linfócitos B expressam menores quantidades de moléculas como o CD73 (PETTENGILL; LEVY, 2016). A expressão reduzida dessa ectonucleotidase impacta diretamente na maturação e troca de isotipo de anticorpo em linfócitos B, como já foi demonstrado em camundongos adultos e em indivíduos adultos com imunodeficiência comum variável (CVID – *Common Variable Immunodeficiency*) (SCHENA et al., 2013). Parece haver, também, uma menor migração de plasmócitos para a medula óssea, colaborando para

que essa resposta mediada por anticorpos não se sustente por muito tempo (PIHLGREN et al., 2001).

Com essa resposta imune de caráter mais anti-inflamatório, e com uma polarização de resposta que não favorece a defesa contra patógenos intracelulares, a susceptibilidade na infecção por estes agentes encontra-se aumentada no período neonatal (**Figura 2**).

1.3 NO e a resposta imune

O óxido nítrico (NO) é um pequeno e inorgânico radical, instável, produzido a partir da oxidação do aminoácido L-arginina através da ação da enzima óxido nítrico sintase (NOS) (DAVIS et al., 2001).

O NO entrou no cenário da imunologia no final da década de 80, tendo sido descrito como molécula microbicida, produzida por fagócitos, através da ação da óxido nítrico sintase induzida (iNOS). Entretanto, atualmente, sabe-se que não só outras células do sistema imune são capazes de produzir NO, como também pode haver a expressão das demais isoformas de NOS (eNOS – óxido nítrico sintase endotelial, e nNOS - óxido nítrico sintase neuronal) (BOGDAN, 2001; 2015).

As NOS são todas homodímeros que catalisam a oxirredução da L-arginina (**Figura 3**). As duas isoformas constitutivas (eNOS e nNOS) produzem baixas concentrações de NO e agem de forma dependente de Ca^{2+} , ao passo que a induzida (iNOS) produz altas quantidades de NO, de forma independente de Ca^{2+} mas dependente de estímulos imunes (DAVIS et al., 2001).

A L-arginina também é substrato para outra enzima, a arginase, que compete com as NOS por esse aminoácido. A arginase metaboliza a L-arginina em L-ornitina e ureia, tendo um importante papel em processos antiinflamatórios e de remodelamento tecidual (**Figura 3**).

Figura 3 - Metabolismo da L-arginina pelas enzimas iNOS e arginase-1. As enzimas iNOS e arginase competem pelo mesmo substrato, o aminoácido L-arginina. A iNOS metaboliza esse aminoácido em citrulina e NO, enquanto a arginase em ornitina e ureia (adaptado de BOGDAN, 2011).

Estímulos via receptores de reconhecimento de padrões, tais como TLRs e NLRs, ou de citocinas, como TNFR, IL1R e IFNGR, levam à ativação de vias de sinalização intracelulares que culminam na transcrição (mediada por NF- κ B e/ou AP-1) de *NOS2*, entre outros genes pró-inflamatórios, e na consequente expressão de iNOS (**Figura 4**). Em contrapartida, citocinas de perfil Th2, assim como citocinas anti-inflamatórias como IL-10 e TGF- β inibem essa expressão e estimulam a transcrição do gene *ARG1* da arginase através da ativação do fator de transcrição C/EBP β (KLEINERT et al., 2004) (**Figura 4**).

Tais características tão opostas têm servido de base para diferenciar populações de macrófagos, por exemplo. Macrófagos do tipo M1, caracterizados por um perfil mais pró-inflamatório expressam mais iNOS, enquanto que macrófagos do tipo M2, que possuem atividade mais reguladora e resolutive, expressam mais arginase (MURRAY; WYNN, 2011).

Apesar de grande parte dos estudos sobre NO no sistema imune terem sido feitos em macrófagos, como dito anteriormente, outras células do sistema imune são capazes de produzir essa molécula e de usá-la, também, como molécula microbicida. Tal fato levou a certas denominações para estados transitórios de células, como é o caso das tip-DCs. Células dendríticas que expressam altas quantidades de *NOS2* (gene responsável por transcrever

iNOS) e secretam altas concentrações de TNF- α foram assim denominadas em estudos que demonstraram seu papel microbicida em infecções virais e bacterianas (SERBINA et al., 2003; ALDRIDGE et al., 2009). Apesar desse tipo de denominação, é importante ressaltar que tais nomenclaturas fazem referência a estados transitórios das células, não havendo nenhuma modificação definitiva capaz de torná-la um tipo celular diferente.

Figura 4 - Vias de ativação de iNOS por TLR e citocinas. Expressão de iNOS pode ser induzida e/ou potencializada por PAMPs, DAMPs e citocinas. A sinalização através de TLR, IL-1R e TNFR induz ativação de AP-1 e NF κ B, os principais fatores de transcrição envolvidos na transcrição de iNOS (UEHARA et al., 2015).

O NO produzido pode exercer seus mecanismos microbicidas diretamente sobre os patógenos ao interagir com componentes importantes destes como ácidos nucleicos, moléculas responsáveis por infectividade ou virulência inativando-os ou modificando-os estrutural e funcionalmente. Indiretamente, o NO pode interagir com moléculas de tal forma a modificar o metabolismo microbiano, inibir a formação/maturação do fagolisossomo, a secreção de toxinas e sistemas de secreção (BOGDAN, 2015). Tais efeitos microbicidas também não se restringem à célula que produziu o NO. Por ser um gás, o NO é capaz de facilmente se difundir pelas células, podendo alcançar células que não expressam iNOS, mas que estejam infectadas por

algum patógeno intracelular e ali exercer suas funções antimicrobianas (OLEKHNOVITCH et al., 2014).

Outro importante mecanismo que o NO utiliza para limitar as infecções é induzir a morte das células infectadas. Macrófagos previamente ativados por IFN- β ou IFN- γ , quando infectados podem induzir um aumento de expressão de iNOS e secreção de NO, que pode resultar na ativação de caspases e morte das células infectadas, tanto por apoptose, como por necrose (independente da ativação de caspase). A morte dessas células resulta na inibição da expansão e replicação destes patógenos (HERBST et al., 2011; ZWAFERINK et al., 2008).

Além das atividades microbidas já bem estabelecidas, o NO dentro do sistema imune também participa da maturação de células dendríticas. Em modelos experimentais, patógenos e citocinas induzem a produção de NO via iNOS, que pode inibir a ação das caspases (inflamatórias e apoptóticas). Com sua atividade inibida, as caspases não serão capazes de clivar a cadeia invariante ligada ao MHC de classe II, possibilitando que as moléculas de MHC consigam ser corretamente enoveladas, e a DC que está sendo maturada, aumente a expressão dessas moléculas em sua superfície, além de outras moléculas coestimuladoras como CD80 e CD86 (HUANG et al., 2008). Em humanos, entretanto, apesar de resultados bastante controversos, há evidências de que há um aumento de expressão de outra isoforma, nNOS, que também é importante para um aumento de expressão de moléculas coestimuladoras como CD80 e CD83, e secreção de citocinas como IL-12p40, IFN- γ , IL-4 e IL-13 (ADLER et al., 2010).

Assim sendo, muitos dos estudos realizados relatam este papel do NO como uma molécula de importante atividade microbida, mas com outras atividades que colaboram na indução de processos inflamatórios.

1.4 NO como modulador da resposta imune

Além da sua clássica atividade microbida, recentemente, alguns trabalhos vêm demonstrando que outras células (linfócitos T e B, células dendríticas), além de macrófagos e monócitos, são capazes de produzir NO, e que esta molécula pode ter um papel imunomodulador dependendo da sua

origem e da concentração em que ele se encontra (BAUER et al., 1997; JIANJUN YANG et al., 2013; NIEDBALA et al., 2007; NIEDBALA et al., 2013; NIEDBALA et al., 2014; WINK et al., 2011).

Por ser uma molécula instável, o NO pode reagir com alguns resíduos de proteínas que contenham enxofre como cisteína, podendo causar mudanças pós traducionais de tal modo a modificar sua estrutura e/ou função (HERNANSANZ-AGUSTÍN et al., 2013).

As principais reações pelas quais o NO pode causar modificações em proteínas são a nitração e a S-nitrosilação. A nitração é um processo que ocorre principalmente em situações de estresse oxidativo, e depende da reação do NO com o radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$). Estes dois radicais livres podem dar origem ao peroxinitrito ($ONOO^-$), composto altamente oxidante e potencialmente lesivo às células (DAVIS et al., 2001; PACHER et al., 2007). A S-nitrosilação (ou S-nitrosação) ocorre através da oxidação do NO em N_2O_3 , e posterior dissociação deste radical em nitrosium (NO^+) e NO_2 . O radical NO^+ gerado torna-se então disponível para reagir com o grupamento tiol do resíduo de cisteína, formando um S-nitrosotiol (STAMLER et al., 1992).

Tais modificações podem ser causadas pelo próprio NO endógeno tanto em componentes da resposta imune inata quando da adaptativa. Alguns trabalhos já relataram modificações em receptores de reconhecimento de padrão, como os inflamassomas. O NO é capaz de nitrosilar o NLRP3 (em maior quantidade e proporção) além de outros receptores como o NLRC4 e AIM2, contribuindo, por exemplo, como a progressão e gravidade de algumas infecções como a tuberculose e o choque séptico (MAO et al., 2013; MISHRA et al., 2013; PARK et al., 2013).

Altas concentrações de NO aumentam a sinalização via p53, o que suprime as funções de células T e a secreção de citocinas como IL-2, IL-4, IL-15, IL-10 e IFN- γ (BAUER et al., 1997), enquanto que concentrações mínimas de NO induzem o aumento de monofosfato cíclico de guanosina (GMPc) que, por sua vez, favorece a expressão da cadeia β_2 do receptor de IL-12 (IL-12R β_2) e a diferenciação de linfócitos Th1 (NIEDBALA et al., 1999). Fisiologicamente, a colocalização de tipDCs, cDCs e linfócitos T CD4+ em baços de camundongos infectados por *L. monocytogenes* evidencia a importância do NO

para potencializar uma polarização Th1, além de inibir a indução de outros fatores de transcrição como FoxP3 (induzido por TGF- β) (LEE et al., 2011).

Também já foi mostrado, em modelos animais e em humanos, que linfócitos T CD4⁺ ativados produzem NO, e este vai mediar a nitração de resíduos tirosínicos do fator de transcrição ROR γ t (característico de linfócitos Th17), inativando-o. Assim, a deficiência de iNOS favorece a diferenciação dos linfócitos T CD4⁺ em Th17, sem afetar as populações de Th1 e Th2, enquanto que sua presença diminui a secreção de IL-17 pelos linfócitos TCD4⁺ ativados (JIANJUN YANG et al., 2013; NIEDBALA et al., 2011; NIEDBALA et al., 2013).

Em modelo de adição exógena de NO, foi observado que ele favorece a geração de células Treg, chamadas de NO-Tregs, que não expressam o fator de transcrição FoxP3. Essas células são geradas a partir de linfócitos TCD4⁺ CD25⁻ na presença de NO, α CD3 e APC, e têm capacidade supressora *in vitro* e *in vivo*, principalmente sobre células Th17. Essas células reguladoras podem atuar diminuindo a inflamação em modelos de doenças inflamatórias como colite e artrite (NIEDBALA et al., 2007).

Além de todas essas atividades sob os linfócitos T, o NO também pode regular a sobrevivência de plasmócitos. Tais células secretoras de anticorpo, quando nocauteadas para o gene da iNOS, tem um maior estresse de retículo endoplasmático e uma maior atividade de caspases iniciadoras (caspase-9 e caspase-12) e efetoras (caspase-3 e caspase-6) da apoptose (SAINI et al., 2014).

1.5 Justificativa

Como descrito acima, os neonatos são mais susceptíveis a infecções devido às características da sua resposta imune, voltada para evitar repostas pró-inflamatórias intensas. Isso infelizmente corrobora com uma maior mortalidade nesse período, especialmente em países menos desenvolvidos.

As pesquisas com NO nos últimos anos vem mudando de foco, deixando de caracterizá-lo apenas como molécula microbicida, e destacando seu papel como molécula mensageira e moduladora. Graças às suas características de radical livre, o NO pode reagir com uma série de proteínas, especialmente aquelas com algum resíduo de cisteína, de tal forma a modificá-las tanto

estrutural como funcionalmente. Isso faz com que o NO, seja ele produzido pelas células, ou adicionado exogenamente, consiga modificar o perfil de resposta de linfócitos TCD4+, principalmente.

Apesar do papel imunomodulador do NO ter sido bastante estudado nos últimos anos, pouco se sabe sobre sua ação no sistema imune neonatal. Assim, compreender a ação desse radical sobre as células do sistema imune de neonatos e adultos corrobora não só com a compreensão da resposta imune nesses períodos, mas também como esse radical poderia ser utilizado como alvo em terapias ou formulações vacinais.

Conclusão

6 Conclusões

No presente estudo avaliamos o potencial imunomodulador *in vitro* do NO nas respostas imunes inata e adquirida de células mononucleares de adultos e neonatos, e os nossos dados apontam que:

- O NO (seja ele endógeno ou exógeno) é capaz de modular as respostas imunes de neonatos e adultos, porém de formas distintas;
- Durante respostas imunes inatas (ex.: via ativação por TLR) o NO produzido pelas NOS parece ser importante, visto que o uso de L-NAME modulou a secreção de citocinas inflamatória;
- Entretanto, a adição do NO exógeno parece modular a resposta apenas relacionada à ativação dos NLR, e não dos TLR;
- Na resposta imune adaptativa de adultos, o NO exógeno modula a secreção de citocinas, sem alterar ativação, proliferação e apoptose;
- Na resposta imune adaptativa de neonatos, o NO exógeno modula o perfil de ativação dos linfócitos, mas sem alterar os demais parâmetros analisados.

Assim, estudos mais aprofundados sobre as vias de sinalização que o NO estaria modulando/modificando se fazem necessários, a fim de avaliar o potencial dessa molécula como alvo em terapias, ou para um futuro uso em formulações vacinais.

Referências*

ADKINS, B. Heterogeneity in the CD4 T Cell Compartment and the Variability of Neonatal Immune Responsiveness. **Curr Immunol Rev**, v. 3, n. 3, p. 151-159, Aug 2007. ISSN 1573-3955. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19122799> >.

ADKINS, B.; LEVY, O.; BETZ, A. G. A new unexpected twist in newborn immunity. **Nat Med**, v. 20, n. 1, p. 22-23, Jan 2014. ISSN 1546-170X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24398960> >.

ADLER, H. S. et al. Neuronal nitric oxide synthase modulates maturation of human dendritic cells. **J Immunol**, v. 184, n. 11, p. 6025-6034, Jun 2010. ISSN 1550-6606. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20421643> >.

AKSOY, E. et al. Interferon regulatory factor 3-dependent responses to lipopolysaccharide are selectively blunted in cord blood cells. **Blood**, v. 109, n. 7, p. 2887-2893, Apr 2007. ISSN 0006-4971. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17138826> >.

ALDRIDGE, J. R. et al. TNF/iNOS-producing dendritic cells are the necessary evil of lethal influenza virus infection. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 106, n. 13, p. 5306-5311, Mar 2009. ISSN 1091-6490. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19279209> >.

BAIG, M. S. et al. NOS1-derived nitric oxide promotes NF- κ B transcriptional activity through inhibition of suppressor of cytokine signaling-1. **J Exp Med**, v. 212, n. 10, p. 1725-1738, Sep 2015. ISSN 1540-9538. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26324446> >.

BAUER, H. et al. Nitric oxide inhibits the secretion of T-helper 1- and T-helper 2-associated cytokines in activated human T cells. **Immunology**, v. 90, n. 2, p. 205-211, Feb 1997. ISSN 0019-2805. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9135548> >.

BHUTTA, Z. A.; BLACK, R. E. Global maternal, newborn, and child health--so near and yet so far. **N Engl J Med**, v. 369, n. 23, p. 2226-2235, Dec 2013. ISSN 1533-4406. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24304052> >.

BOGDAN, C. Nitric oxide and the immune response. **Nat Immunol**, v. 2, n. 10, p. 907-916, Oct 2001. ISSN 1529-2908. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11577346> >.

*De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

_____. Regulation of lymphocytes by nitric oxide. **Methods Mol Biol**, v. 677, p. 375-393, 2011. ISSN 1940-6029. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20941622> >.

_____. Nitric oxide synthase in innate and adaptive immunity: an update. **Trends Immunol**, v. 36, n. 3, p. 161-178, Mar 2015. ISSN 1471-4981. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25687683> >.

BRUSTOSKI, K. et al. Reduced cord blood immune effector-cell responsiveness mediated by CD4+ cells induced in utero as a consequence of placental Plasmodium falciparum infection. **J Infect Dis**, v. 193, n. 1, p. 146-154, Jan 2006. ISSN 0022-1899. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16323143> >.

BUZZO, C. L. et al. Epigenetic regulation of nitric oxide synthase 2, inducible (Nos2) by NLRC4 inflammasomes involves PARP1 cleavage. **Sci Rep**, v. 7, p. 41686, Feb 2017. ISSN 2045-2322. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28150715> >.

DANIS, B. et al. Interferon regulatory factor 7-mediated responses are defective in cord blood plasmacytoid dendritic cells. **Eur J Immunol**, v. 38, n. 2, p. 507-517, Feb 2008. ISSN 0014-2980. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18200500> >.

DAVIS, K. L. et al. Novel effects of nitric oxide. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v. 41, p. 203-236, 2001. ISSN 0362-1642. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11264456> >.

DE ROOCK, S. et al. Defective TH17 development in human neonatal T cells involves reduced RORC2 mRNA content. **J Allergy Clin Immunol**, v. 132, n. 3, p. 754-756.e3, Sep 2013. ISSN 1097-6825. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23726039> >.

DE SOUZA, K. P. et al. Nitric oxide synthase expression correlates with death in an experimental mouse model of dengue with CNS involvement. **Virology**, v. 10, p. 267, 2013. ISSN 1743-422X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23978258> >.

DOWLING, D. J.; LEVY, O. Ontogeny of early life immunity. **Trends Immunol**, v. 35, n. 7, p. 299-310, Jul 2014. ISSN 1471-4981. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24880460> >.

ELAHI, S. et al. Immunosuppressive CD71+ erythroid cells compromise neonatal host defence against infection. **Nature**, v. 504, n. 7478, p. 158-162, Dec 2013. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24196717> >.

FERNANDEZ, M. A. et al. T regulatory cells contribute to the attenuated primary CD8+ and CD4+ T cell responses to herpes simplex virus type 2 in neonatal mice. **J**

Immunol, v. 180, n. 3, p. 1556-1564, Feb 2008. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18209051> >.

FERRET-BERNARD, S. et al. Cellular and molecular mechanisms underlying the strong neonatal IL-12 response of lamb mesenteric lymph node cells to R-848. **PLoS One**, v. 5, n. 10, p. e13705, Oct 2010. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21060840> >.

GANTT, S. et al. The role of myeloid-derived suppressor cells in immune ontogeny. **Front Immunol**, v. 5, p. 387, 2014. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25165466> >.

GENSOLLEN, T. et al. How colonization by microbiota in early life shapes the immune system. **Science**, v. 352, n. 6285, p. 539-544, Apr 2016. ISSN 1095-9203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27126036> >.

GERVASSI, A. et al. Myeloid derived suppressor cells are present at high frequency in neonates and suppress in vitro T cell responses. **PLoS One**, v. 9, n. 9, p. e107816, 2014. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25248150> >.

GOENKA, A.; KOLLMANN, T. R. Development of immunity in early life. **J Infect**, v. 71 Suppl 1, p. S112-120, Jun 2015. ISSN 1532-2742. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25934325> >.

GROß, C. J. et al. K(+) Efflux-Independent NLRP3 Inflammasome Activation by Small Molecules Targeting Mitochondria. **Immunity**, v. 45, n. 4, p. 761-773, Oct 2016. ISSN 1097-4180. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27692612> >.

GUILMOT, A. et al. Natural killer cell responses to infections in early life. **J Innate Immun**, v. 3, n. 3, p. 280-288, 2011. ISSN 1662-8128. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21411972> >.

HASKÓ, G. et al. Adenosine inhibits IL-12 and TNF-[alpha] production via adenosine A2a receptor-dependent and independent mechanisms. **FASEB J**, v. 14, n. 13, p. 2065-2074, Oct 2000. ISSN 0892-6638. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11023991> >.

HERBST, S.; SCHAIBLE, U. E.; SCHNEIDER, B. E. Interferon gamma activated macrophages kill mycobacteria by nitric oxide induced apoptosis. **PLoS One**, v. 6, n. 5, p. e19105, May 2011. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21559306> >.

HERNANSANZ-AGUSTÍN, P. et al. Nitrosothiols in the immune system: signaling and protection. **Antioxid Redox Signal**, v. 18, n. 3, p. 288-308, Jan 2013. ISSN 1557-7716. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22746191> >.

HESS, D. T. et al. Protein S-nitrosylation: purview and parameters. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 6, n. 2, p. 150-166, Feb 2005. ISSN 1471-0072. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15688001> >.

HOYT, L. R. et al. Mitochondrial ROS induced by chronic ethanol exposure promote hyper-activation of the NLRP3 inflammasome. **Redox Biol**, v. 12, p. 883-896, Apr 2017. ISSN 2213-2317. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28463821> >.

HUANG, D. et al. Nitric-oxide synthase 2 interacts with CD74 and inhibits its cleavage by caspase during dendritic cell development. **J Biol Chem**, v. 283, n. 3, p. 1713-1722, Jan 2008. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18003616> >.

ILLI, B. et al. NO sparks off chromatin: tales of a multifaceted epigenetic regulator. **Pharmacol Ther**, v. 123, n. 3, p. 344-352, Sep 2009. ISSN 1879-016X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19464317> >.

_____. Nitric oxide modulates chromatin folding in human endothelial cells via protein phosphatase 2A activation and class II histone deacetylases nuclear shuttling. **Circ Res**, v. 102, n. 1, p. 51-58, Jan 2008. ISSN 1524-4571. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17975112> >.

ISHIDA, A. et al. Induction of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21(Sdi1/Cip1/Waf1) by nitric oxide-generating vasodilator in vascular smooth muscle cells. **J Biol Chem**, v. 272, n. 15, p. 10050-7, Apr 1997. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9092548> >.

IVARSSON, M. A. et al. Differentiation and functional regulation of human fetal NK cells. **J Clin Invest**, v. 123, n. 9, p. 3889-3901, Sep 2013. ISSN 1558-8238. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23945237> >.

JIANJUN YANG et al. T cell-derived inducible nitric oxide synthase switches off Th17 cell differentiation. **J Exp Med**, v. 210, n. 7, p. 1447-1462, Jul 2013. ISSN 1540-9538. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23797094> >.

JIN, L. et al. Role and regulation of autophagy and apoptosis by nitric oxide in hepatic stellate cells during acute liver failure. **Liver Int**, May 2017. ISSN 1478-3231. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28508586> >.

KLEINERT, H. et al. Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. **Eur J Pharmacol**, v. 500, n. 1-3, p. 255-266, Oct 2004. ISSN 0014-2999. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15464038> >.

KOLLMANN, T. R. et al. Neonatal innate TLR-mediated responses are distinct from those of adults. **J Immunol**, v. 183, n. 11, p. 7150-7160, Dec 2009. ISSN 1550-6606. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19917677> >.

_____. Protecting the Newborn and Young Infant from Infectious Diseases: Lessons from Immune Ontogeny. **Immunity**, v. 46, n. 3, p. 350-363, Mar 2017. ISSN 1097-4180. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28329702> >.

_____. Innate immune function by Toll-like receptors: distinct responses in newborns and the elderly. **Immunity**, v. 37, n. 5, p. 771-783, Nov 2012. ISSN 1097-4180. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23159225> >.

KRAUSE, B. J. et al. Arginase-2 is cooperatively up-regulated by nitric oxide and histone deacetylase inhibition in human umbilical artery endothelial cells. **Biochem Pharmacol**, v. 99, p. 53-59, Jan 2016. ISSN 1873-2968. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26551598> >.

LANGRISH, C. L. et al. Neonatal dendritic cells are intrinsically biased against Th-1 immune responses. **Clin Exp Immunol**, v. 128, n. 1, p. 118-123, Apr 2002. ISSN 0009-9104. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11982599> >.

LEE, S. W. et al. Nitric oxide modulates TGF-beta-directive signals to suppress Foxp3+ regulatory T cell differentiation and potentiate Th1 development. **J Immunol**, v. 186, n. 12, p. 6972-6980, Jun 2011. ISSN 1550-6606. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21555530> >.

LEGRAND, F. A. et al. Strong HIV-1-specific T cell responses in HIV-1-exposed uninfected infants and neonates revealed after regulatory T cell removal. **PLoS One**, v. 1, p. e102, 2006. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17183635> >.

LEVY, O. et al. The adenosine system selectively inhibits TLR-mediated TNF-alpha production in the human newborn. **J Immunol**, v. 177, n. 3, p. 1956-1966, Aug 2006. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16849509> >.

_____. Impaired innate immunity in the newborn: newborn neutrophils are deficient in bactericidal/permeability-increasing protein. **Pediatrics**, v. 104, n. 6, p. 1327-1333, Dec 1999. ISSN 1098-4275. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10585984> >.

LIU, L. et al. Global, regional, and national causes of child mortality: an updated systematic analysis for 2010 with time trends since 2000. **Lancet**, v. 379, n. 9832, p. 2151-2161, Jun 2012. ISSN 1474-547X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22579125> >.

MAO, K. et al. Nitric oxide suppresses NLRP3 inflammasome activation and protects against LPS-induced septic shock. **Cell Res**, v. 23, n. 2, p. 201-212, Feb 2013. ISSN 1748-7838. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23318584> >.

MARCOE, J. P. et al. TGF- β is responsible for NK cell immaturity during ontogeny and increased susceptibility to infection during mouse infancy. **Nat Immunol**, v. 13, n. 9, p. 843-850, Sep 2012. ISSN 1529-2916. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22863752> >.

MCGREAL, E. P.; HEARNE, K.; SPILLER, O. B. Off to a slow start: under-development of the complement system in term newborns is more substantial following premature birth. **Immunobiology**, v. 217, n. 2, p. 176-186, Feb 2012. ISSN 1878-3279. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21868122> >.

MILLS, E. L.; KELLY, B.; O'NEILL, L. A. J. Mitochondria are the powerhouses of immunity. **Nat Immunol**, v. 18, n. 5, p. 488-498, Apr 2017. ISSN 1529-2916. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28418387> >.

MISHRA, B. B. et al. Nitric oxide controls the immunopathology of tuberculosis by inhibiting NLRP3 inflammasome-dependent processing of IL-1 β . **Nat Immunol**, v. 14, n. 1, p. 52-60, Jan 2013. ISSN 1529-2916. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23160153> >.

MUNGUÍA-FUENTES, R. et al. Immunization of Newborn Mice Accelerates the Architectural Maturation of Lymph Nodes, But AID-Dependent IgG Responses Are Still Delayed Compared to the Adult. **Front Immunol**, v. 8, p. 13, 2017. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28154564> >.

MURRAY, P. J.; WYNN, T. A. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. **Nat Rev Immunol**, v. 11, n. 11, p. 723-737, Nov 2011. ISSN 1474-1741. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21997792> >.

NAPOLI, C. et al. Effects of nitric oxide on cell proliferation: novel insights. **J Am Coll Cardiol**, v. 62, n. 2, p. 89-95, Jul 2013. ISSN 1558-3597. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23665095> >.

NASSI, N. et al. Anti-oxidant enzymes and related elements in term and preterm newborns. **Pediatr Int**, v. 51, n. 2, p. 183-187, Apr 2009. ISSN 1442-200X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19405912> >.

NIEDBALA, W. et al. Regulation of type 17 helper T-cell function by nitric oxide during inflammation. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 108, n. 22, p. 9220-9225, May 2011. ISSN 1091-6490. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21576463> >.

_____. Nitric oxide-induced regulatory T cells inhibit Th17 but not Th1 cell differentiation and function. **J Immunol**, v. 191, n. 1, p. 164-170, Jul 2013. ISSN 1550-6606. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23720815> >.

_____. Nitric oxide enhances Th9 cell differentiation and airway inflammation. **Nat Commun**, v. 5, p. 4575, 2014. ISSN 2041-1723. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25099390> >.

_____. Nitric oxide induces CD4+CD25+ Foxp3 regulatory T cells from CD4+CD25 T cells via p53, IL-2, and OX40. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 104, n. 39, p. 15478-15483, Sep 2007. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17875988> >.

_____. Effects of nitric oxide on the induction and differentiation of Th1 cells. **Eur J Immunol**, v. 29, n. 8, p. 2498-2505, Aug 1999. ISSN 0014-2980. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10458764> >.

OBERMAJER, N. et al. Induction and stability of human Th17 cells require endogenous NOS2 and cGMP-dependent NO signaling. **J Exp Med**, v. 210, n. 7, p. 1433-1445, Jul 2013. ISSN 1540-9538. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23797095> >.

OLEKHNOVITCH, R. et al. Collective nitric oxide production provides tissue-wide immunity during Leishmania infection. **J Clin Invest**, v. 124, n. 4, p. 1711-1722, Apr 2014. ISSN 1558-8238. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24614106> >.

PACHER, P.; BECKMAN, J. S.; LIAUDET, L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. **Physiol Rev**, v. 87, n. 1, p. 315-424, Jan 2007. ISSN 0031-9333. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17237348> >.

PARK, Y. J. et al. TXNIP deficiency exacerbates endotoxic shock via the induction of excessive nitric oxide synthesis. **PLoS Pathog**, v. 9, n. 10, p. e1003646, 2013. ISSN 1553-7374. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24098117> >.

PERRONE, S. et al. Oxygen Use in Neonatal Care: A Two-edged Sword. **Front Pediatr**, v. 4, p. 143, 2016. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28119904> >.

PETTENGILL, M. A.; LEVY, O. Circulating Human Neonatal Naïve B Cells are Deficient in CD73 Impairing Purine Salvage. **Front Immunol**, v. 7, p. 121, 2016. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27066009> >.

PIHLGREN, M. et al. Delayed and deficient establishment of the long-term bone marrow plasma cell pool during early life. **Eur J Immunol**, v. 31, n. 3, p. 939-946, Mar 2001. ISSN 0014-2980. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11241299> >.

RIOS, E. C. et al. The role of nitric oxide in the epigenetic regulation of THP-1 induced by lipopolysaccharide. **Life Sci**, v. 147, p. 110-116, Feb 2016. ISSN 1879-0631. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26826317> >.

SAINI, A. S. et al. Inducible nitric oxide synthase is a major intermediate in signaling pathways for the survival of plasma cells. **Nat Immunol**, v. 15, n. 3, p. 275-282, Mar 2014. ISSN 1529-2916. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24441790> >.

SANTHANAM, L. et al. Inducible NO synthase dependent S-nitrosylation and activation of arginase1 contribute to age-related endothelial dysfunction. **Circ Res**, v. 101, n. 7, p. 692-702, Sep 2007. ISSN 1524-4571. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17704205> >.

SCHENA, F. et al. Dependence of immunoglobulin class switch recombination in B cells on vesicular release of ATP and CD73 ectonucleotidase activity. **Cell Rep**, v. 3, n. 6, p. 1824-1831, Jun 2013. ISSN 2211-1247. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23770243> >.

SCHMITTGEN, T. D.; LIVAK, K. J. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. **Nat Protoc**, v. 3, n. 6, p. 1101-1108, 2008. ISSN 1750-2799. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18546601> >.

SERBINA, N. V. et al. TNF/iNOS-producing dendritic cells mediate innate immune defense against bacterial infection. **Immunity**, v. 19, n. 1, p. 59-70, Jul 2003. ISSN 1074-7613. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12871639> >.

SILVEIRA-LESSA, A. L. et al. TLR expression, phagocytosis and oxidative burst in healthy and septic newborns in response to Gram-negative and Gram-positive rods. **Hum Immunol**, v. 77, n. 10, p. 972-980, Oct 2016. ISSN 1879-1166. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27450230> >.

STAMLER, J. S. et al. S-nitrosylation of proteins with nitric oxide: synthesis and characterization of biologically active compounds. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 89, n. 1, p. 444-448, Jan 1992. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1346070> >.

TAYLOR-ROBINSON, A. W. Counter-regulation of T helper 1 cell proliferation by nitric oxide and interleukin-2. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 233, n. 1, p. 14-19, Apr 1997. ISSN 0006-291X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9144387> >.

THOMAS, D. D. et al. The chemical biology of nitric oxide: implications in cellular signaling. **Free Radic Biol Med**, v. 45, n. 1, p. 18-31, Jul 2008. ISSN 0891-5849. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18439435> >.

THOME, J. J. et al. Early-life compartmentalization of human T cell differentiation and regulatory function in mucosal and lymphoid tissues. **Nat Med**, v. 22, n. 1, p. 72-77, Jan 2016. ISSN 1546-170X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26657141> >.

TOLLIN, M. et al. Vernix caseosa as a multi-component defence system based on polypeptides, lipids and their interactions. **Cell Mol Life Sci**, v. 62, n. 19-20, p. 2390-9, Oct 2005. ISSN 1420-682X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16179970> >.

TORRE, D. et al. Increased levels of nitrite in the sera of children infected with human immunodeficiency virus type 1. **Clin Infect Dis**, v. 22, n. 4, p. 650-653, Apr 1996. ISSN 1058-4838. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8729204> >.

TORRE, D.; PUGLIESE, A.; SPERANZA, F. Role of nitric oxide in HIV-1 infection: friend or foe? **Lancet Infect Dis**, v. 2, n. 5, p. 273-280, May 2002. ISSN 1473-3099. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12062993> >.

UEHARA, E. U.; SHIDA, B. E. S.; DE BRITO, C. A. Role of nitric oxide in immune responses against viruses: beyond microbicidal activity. **Inflamm Res**, v. 64, n. 11, p. 845-852, Nov 2015. ISSN 1420-908X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26208702> >.

VAN DER VEEN, R. C. et al. Nitric oxide inhibits the proliferation of T-helper 1 and 2 lymphocytes without reduction in cytokine secretion. **Cell Immunol**, v. 193, n. 2, p. 194-201, May 1999. ISSN 0008-8749. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10222062> >.

VILLALOBO, A. Nitric oxide and cell proliferation. **FEBS J**, v. 273, n. 11, p. 2329-2344, Jun 2006. ISSN 1742-464X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16704409> >.

WAHEED, S. M. et al. Nitric oxide blocks cellular heme insertion into a broad range of heme proteins. **Free Radic Biol Med**, v. 48, n. 11, p. 1548-1558, Jun 2010. ISSN 1873-4596. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20211245> >.

WINK, D. A. et al. Nitric oxide and redox mechanisms in the immune response. **J Leukoc Biol**, v. 89, n. 6, p. 873-891, Jun 2011. ISSN 1938-3673. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21233414> >.

YOSHIMURA, A.; NAKA, T.; KUBO, M. SOCS proteins, cytokine signalling and immune regulation. **Nat Rev Immunol**, v. 7, n. 6, p. 454-465, Jun 2007. ISSN 1474-1733. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17525754> >.

YU, H. R. et al. Identification of immunodeficient molecules in neonatal mononuclear cells by proteomic differential displays. **Proteomics**, v. 11, n. 17, p. 3491-3500, Sep

2011. ISSN 1615-9861. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21751377> >.

ZAGHOUBANI, H.; HOEMAN, C. M.; ADKINS, B. Neonatal immunity: faulty T-helpers and the shortcomings of dendritic cells. **Trends Immunol**, v. 30, n. 12, p. 585-591, Dec 2009. ISSN 1471-4981. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19846341> >.

ZHANG, X.; ZHIVAKI, D.; LO-MAN, R. Unique aspects of the perinatal immune system. **Nat Rev Immunol**, Jun 2017. ISSN 1474-1741. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28627520> >.

ZWAFFERINK, H. et al. Stimulation of inducible nitric oxide synthase expression by beta interferon increases necrotic death of macrophages upon *Listeria monocytogenes* infection. **Infect Immun**, v. 76, n. 4, p. 1649-1656, Apr 2008. ISSN 1098-5522. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18268032> >.