DANIELLA STEFANI OXER

Interação entre as vias de sinalização

CD40/CD40L e os PPARs

**Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Ciências**

**Área de concentração: Emergências Clínicas
Orientador: Prof. Dr. Heraldo Possolo de Souza**

São Paulo

2008

Dedico este trabalho a minha mãe que, apesar de nossas diferenças terem sido o pivô de nossa relação durante muitos anos, foi ela quem esteve inteiramente ao meu lado quando eu mais precisei e foi com quem eu pude (e posso) contar em qualquer ocasião.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Dr Heraldo Possolo de Souza por ter me dado a oportunidade de me aprofundar na minha carreira profissional e por fazer da nossa relação orientador-aluna muito agradável e enriquecedora. Agradeço também por se preocupar em quais serão os meus próximos passos tentando me ajudar a seguir o meu caminho.

À Dra Eloísa Bonfá por ter apostado na idéia e ao Dr Eduardo Borba Neto pela a seleção dos pacientes lúpicos.

Ao Luiz Claudio Godoy que mesmo de longe teve uma grande participação neste trabalho.

A Dra Ieda Laurindo que, dando uma sugestão na minha qualificação desviou o rumo da minha tese.

Ao Professor Francisco Laurindo que permitiu que eu fizesse o *real time* PCR em seu laboratório. Agradeço também a Denise de Castro Fernandes e ao João Wosniak Jr. que sempre estiveram dispostos a sanar as minhas dúvidas.

A Thais Martins de Lima que me recebeu de braços abertos no laboratório do Professor Rui Curi e me ensinou e auxiliou a fazer o EMSA.

Aos Doutores Francisco José Nigro Mazon e Eduardo Martins Zincone pela seleção dos pacientes do PS, ao Dr. Antônio Alci Barone que permitiu que eu selecionasse pacientes no ambulatório de tuberculose e a Dra Suzi Jacon por aprovar a minha ida ao setor de admissão para obter amostra de pacientes.

As enfermeiras Kátia Regina Oliveira do ambulatório da reumatologia que sempre me recebeu com um sorriso no rosto, Maria Amélia que me auxiliou com os pacientes do PS e do setor de admissão e a Teresa que trabalhou comigo no ambulatório de tuberculose.

A Angélica Belém de Souza e Rose Cler Ferreira que me auxiliaram na parte burocrática do processo.

A Kelli Cristina Gouvea que, no dia-a-dia, esbanja bom humor.

Aos funcionários do LIM-51, principalmente a Denise Barbeiro por ter me iniciado na biologia molecular e a Suely Kubo que me auxiliou amplamente na cultura celular.

Aos colegas de pós-graduação pelos cafés, os barzinhos e o apoio profissional. Um agradecimento especial a Dra Ana Lochabel Moretti que me auxiliou bastante durante a pós-graduação.

A Dra Marilena que foi fundamental para todo o processo da pós-graduação.

A Carol Guido, Lu Queiroz, Van Fidalgo, Cris do Vale, Flávia Rea e Tatu Damberg simplesmente por serem minhas grandes amigas e fazerem parte da minha vida.

A minha avó por ter me acolhido em sua casa com o maior amor e carinho.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas e siglas

Lista de tabelas e figuras

Resumo

Summary

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. A via de sinalização CD40/CD40L	1
1.2. PPARs	5
1.3. Interações entre CD40/CD40L e PPARs	9
1.4. Lúpus eritematoso sistêmico	11
1.5. Hipótese	16
2. OBJETIVOS	17
3. METODOLOGIA	18
3.1. Pacientes	18
3.2. Isolamento de células do sangue periférico	19
3.3. Cultura celular	20
3.4. Extração de RNA e PCR	21
3.5. Quantificação de IL-1 β e CD40L solúvel	23
3.6. EMSA	24
3.7. Silenciamento por RNA de interferência	27
3.8. Análise estatística	28
4. RESULTADOS	29

4.1. Citocina IL-1 β	29
4.2. Expressão de PPARs α e γ em células estimuladas com rhCD40L	31
4.3. Expressão de PPARs α e γ em células estimuladas com LPS	33
4.4. Expressão de CD36 em células estimuladas com rhCD40L	36
4.5. Atividade de NF- κ B e PPARs	38
4.6. Efeito do silenciamento de PPAR γ na via CD40/CD40L	41
4.7. Níveis de sCD40L em plasma de pacientes lúpicos	44
4.8. Expressão de PPARs α e γ em células de pacientes lúpicos	46
4.9. Expressão de PPARs α e γ em células de pacientes lúpicos sem medicação	48
4.10. Expressão de PPARs α e γ em pacientes com doenças infecciosas crônicas e agudas	50
4.11. Níveis de sCD40L em plasma de pacientes	53
5. DISCUSSÃO	55
6. CONCLUSÕES	65
7. REFERÊNCIAS	66

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	porcentagem
µg	micrograma
µl	microlitro
µM	micromolar
15dPGJ2	15-desoxi-prostaglandina J2
ANOVA	análise univariada
AP-1	ativador protéico-1
APC	do inglês “Antigen-presenting cell” traduzido como célula apresentadora de antígeno
apo-AI	apolipoproteína A-I
BCL-6	do inglês “B cell lymphoma-6”
BSA	do inglês “Bovine serum albumin” traduzido como albumina sérica bovina
CD	do inglês “Cluster of differentiation” traduzido como conjuntos de diferenciação
cDNA	do inglês “Complementary DNA” traduzido como DNA complementar
COX	ciclooxigenase 1
DEPC	dietilpirocarbonato
DHA	do inglês “Docosahexanoic acid” traduzido como ácido docosahexanóico

DNA	do inglês “Deoxyribonucleic acid” traduzido como ácido desoxiribonucléico
dNTP	do inglês “Deoxyribonucleotide triphosphate” traduzido como desoxiribonucleotídeo trifosfato
dsDNA	do inglês “duble strand DNA” traduzido como DNA dupla fita
DTT	ditiotreitól
EDTA	do inglês “Ethylenediamine-tetra acetic acid” traduzido como ácido etilenodiamino tetra acético
EGTA	do inglês “Ethylene glycol tetraacetic acid” traduzido como ácido etileno glicol tetracético
ELISA	do inglês “Enzyme linked immuno sorbent assay” traduzido como ensaio imunoenzimático
EMSA	do inglês “Eletrophoretic mobilityshift assay” traduzido como ensaio de mobilidade eletroforética retardada em gel
EPA	do inglês “Eicosapentaenoic acid” traduzido como ácido eicosapentaenóico
EPM	erro padrão da média
GAPDH	gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
h	horas
HDL	do inglês “High density lipoprotein” traduzido como lipoproteína de alta densidade
IFN-γ	Interferon – gama
IgG, IgA, IgM	Imunoglobulina G, A e M

IL-1β, 12, 6	Interleucina – 1 beta, 12, 6
IκB	do inglês “Inhibitor of the transcription factor NF- κ B” traduzido como inibidor do fator nuclear de transcrição NF- κ B
LDL	do inglês “Low density lipoprotein” traduzido como lipoproteína de baixa densidade
LES	lúpus eritematoso sistêmico
LPS	lipopolisacáride
LTB₄	leucotrieno B ₄
MES	mercaptoetanosulfanato
MHCII	do inglês “Major histocompatibility complex” traduzido como complexo principal de histocompatibilidade
ml	mililitro
mM	milimolar
MMPs	do inglês “Matrix metalloproteinases” traduzido como metaloproteinases de matriz
mRNA	RNA mensageiro
n	número
NF-AT	do inglês “Nuclear factor of activated T-cells” traduzido como fator nuclear de células T ativadas
NF-κB	do inglês “Nuclear factor-kappa B” traduzido como fator nuclear-KappaB
nM	nanomolar
Pb	pares de base
pg	picograma

PMSF	do inglês “Phenyl methyl sulfonyl fluoride” traduzido por fenilmetilsulfonilflúor
PPARs	do inglês “Peroxisome proliferator activated receptors” traduzido como receptores ativados por proliferadores de peroxissomos
PPRE	do inglês “Peroxisome proliferator response element” traduzido como elemento responsivo de proliferadores de peroxissomos
RAR	do inglês “Retinoic acid receptor” traduzido como receptor de ácido retinóico
rhCD40L	do inglês “Recombinant human CD40L” traduzido como CD40L recombinante humano
RNA	do inglês “Ribonucleic acid” traduzido como ácido Ribonucléico
RT-PCR	do inglês “Reverse-transcriptase-polymerase chain reaction” traduzido como transcrição reversa –reação em cadeia da polimerase
RXR	do inglês “Retinoid X receptor” traduzido como receptor do ácido 9-cis retinóico
s	segundos
SLEDAI	do inglês “Systemic lupus erythematosus disease activity index” traduzido como índice de atividade do lúpus eritematoso sistêmico

STAT-6	do inglês “Signal transducer and activator of transcription 6” traduzido como transdutor de sinal e ativador da transcrição 6
TB	tuberculose
TGF-β	do inglês “Transforming growth factor beta” traduzido como fator de crescimento transformador beta
Th1, 2	do inglês “T-cell helper 1, 2” traduzido como célula T auxiliadora 1, 2
THP-1	do inglês “Human acute monocytic leukemia cell line”
TLR	do inglês “Toll like receptor” traduzido como receptor tipo toll
TNF	do inglês “Tumor necrosis factor” traduzido como fator de necrose tumoral
TR	do inglês “Thyroid hormone receptor” traduzido como receptor de hormônio tireoideano
TRAF	do inglês “TNF receptor associated factor” traduzido como fator associado a receptor de TNF
TZD	thiazolidinedionas
VCAM-1	do inglês “Vascular cell adhesion molecule 1” traduzido como molécula de adesão de célula muscular 1
VDR	do inglês “Vitamin D nuclear receptor” traduzido como receptor nuclear de vitamina

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Tabela 1 <i>Primers</i> utilizados	22
Figura 1 Citocina IL-1 β	30
Figura 2 Expressão de PPARs α e γ em células estimuladas com rhCD40L	32
Figura 3 Expressão de PPARs α e γ em células estimuladas com LPS	34
Figura 4 Expressão de CD36 em células estimuladas com LPS	37
Figura 5 Atividade de NF- κ B e PPARs	39
Figura 6 Efeito do silenciamento de PPAR γ na via CD40/CD40L	42
Figura 7 Níveis de sCD40L em plasma de pacientes lúpicos	45
Figura 8 Expressão de PPARs α e γ em células de pacientes lúpicos	47
Figura 9 Expressão de PPARs α e γ em células de pacientes lúpicos sem medicação	49
Figura 10 Expressão de PPARs α e γ em pacientes com doenças infecciosas crônicas e agudas	51
Figura 11 Níveis de sCD40L em plasma de pacientes	54

RESUMO

O receptor CD40 e seu ligante CD40L possuem um papel importante na interface entre a resposta imune inata e a adaptativa. Disfunções desta via de sinalização são descritas em doenças de origem inflamatória e autoimunes. Em Lúpus eritematoso sistêmico (LES) foi descrito um aumento nos níveis séricos de CD40L solúvel, que participa na produção de auto-anticorpos. Receptores ativados por proliferadores de peroxissomos (PPARs) são fatores de transcrição que inicialmente foram descritos como envolvidos apenas no metabolismo lipídico, mas que atualmente são também descritos como atuantes no controle da resposta imune. Com isso, nosso objetivo é determinar se a ativação dos PPARs modula o processo inflamatório através da interação com CD40/CD40L *in vitro* ou *in vivo*.

Células de linhagem monocítica humana THP-1 foram tratadas por 24 horas com forbol-éster (PMA, 40 nM) e posteriormente estimuladas com CD40L recombinante (rhCD40L, 1 µg/ml) por diferentes períodos. Transcritos de mRNA foram analisados por *real time* PCR e os resultados expressos como razão da expressão do gene *housekeeping* GAPDH. As células THP-1 apresentam um aumento na expressão de PPAR α e γ após 16 e 2 horas de estímulo com rhCD40L, respectivamente. Estas células também foram estimuladas com LPS (10 µg/ml) e LPS+rhCD40L para sabermos se a resposta obtida anteriormente era específica ao estímulo com rhCD40L. O resultado mostra que há uma diminuição na expressão de PPAR α e γ após o estímulo com LPS ou LPS+rhCD40L, indicando que

nessas condições a modulação da expressão de PPARs é específica para a via de sinalização CD40/CD40L. Foi medida também a expressão de CD36, que é descrito na literatura como um indicador da atividade de PPARs. O resultado mostra que o estímulo com CD40L promove um aumento de CD36, o que indica indiretamente que o PPAR estava ativo neste modelo experimental. Para mostrar a interação direta destas duas vias de sinalização, silenciámos o gene de PPAR γ por siRNA e posteriormente analisamos a expressão de CD80, cuja expressão encontra-se aumentada logo após a ativação do CD40 de acordo com a literatura. O resultado mostra que, com o silenciamento de PPAR γ , há um aumento de CD80 logo após a ativação do CD40, evidenciando assim a interação entre essas duas vias de sinalização.

A fim de verificar se os achados encontrados *in vitro* poderiam ser observados *in vivo*, foi isolada a fração mononuclear de sangue periférico de pacientes com LES com a doença em atividade (n=17), a doença inativa (n=21) ou doadores saudáveis (n=12) e foi medida a expressão de PPAR α e γ por *real time* PCR. PPAR α apresenta um aumento em pacientes com a doença ativa ou inativa em comparação aos doadores saudáveis. Já a expressão de PPAR γ apresenta aumento apenas em lúpicos em atividade quando comparados com lúpicos inativos ou doadores saudáveis. Quando considerado nesta análise o efeito do tratamento dos pacientes com corticosteróides nos níveis de PPAR, observou-se que a expressão de PPAR γ apresenta o mesmo padrão anterior. Estes resultados sugerem a hipótese de que PPAR γ seja um possível marcador de atividade de LES. Para

confirmar esta especificidade, foram adicionadas à análise células mononucleares retiradas de pacientes com tuberculose e com infecções agudas. Os dados mostram que os níveis elevados de PPAR γ se mantêm apenas em pacientes com lúpus ativo, o que confirma nossa hipótese.

Nossos achados sugerem que PPAR α e γ são regulados especificamente em resposta à ativação da via do CD40/CD40L, em monócitos em cultura e em células obtidas de pacientes com LES. Podemos também sugerir que PPAR γ possa ser um marcador para a atividade de LES. Estes resultados podem representar um novo mecanismo de controle da via de sinalização do CD40/CD40L, participando no controle da resposta inflamatória em cultura e em células de pacientes lúpicos.

Descritores: Antígenos CD40, ligante a CD40, PPAR alfa, PPAR gama, macrófagos, lúpus eritematoso sistêmico.

SUMMARY

The membrane receptor CD40 and its ligand CD40L play an important role in the interface between innate and acquired immunity. Dysfunction of this signaling pathway was described in inflammatory and autoimmune diseases. In systemic lupus erythematosus (SLE), increased serum levels of soluble CD40L have been detected, where it plays a significant role in the generation of auto-antibodies. Peroxisome proliferator activator receptors (PPARs) are transcription factors originally described in lipid metabolism. More recently, they were also characterized as inflammatory modulators. Therefore, our objective was to determine whether the activation of PPARs may modulate the inflammatory process through interaction with the CD40/CD40L signaling pathway *in vitro* and *in vivo*.

Macrophages derived from the human monocytic cell line THP-1 by 24h-treatment with PMA (40 nM) were stimulated with human recombinant CD40L (rhCD40L, 1 µg/ml) for different periods. Messenger RNA (mRNA) transcripts for PPAR α , and γ were determined by real time PCR and expressed as a ratio of the housekeeping gene GAPDH transcripts. THP-1 cells express a basal level of PPAR α and γ gene transcription, which is increased 16 and 2 hours after exposure to rhCD40L, respectively. We also stimulated the THP-1 cells with LPS (10 µg/ml) and LPS+rhCD40L to see if the increase of PPAR was a response specific to the rhCD40L stimuli. The data show that there is a decrease in PPAR α and γ genes expression upon LPS or LPS+rhCD40L stimulation, indicating that in these times (2 and 16

hours) the response is specific for the CD40/CD40L signaling pathway. Increased expression of CD36 is known as an indicator of PPARs activity. We measured CD36 and saw an increase of this receptor after rhCD40L stimulus, indicating indirectly that PPARs were active in this experimental model. To prove the direct interaction between CD40/CD40L and PPAR γ , we silenced the PPAR γ gene by siRNA and analyzed the expression of CD80, which is known to increase after CD40 activation. The results show an increase in CD40L-stimulated CD80 expression upon silencing of PPAR γ , showing that there is an interaction between these signaling pathways.

To confirm whether these findings also occur *in vivo*, mononuclear cells were isolated from whole blood samples from SLE patients with active (n=17) and inactive disease (n=21), and healthy donors (n=12). The mRNA transcripts for PPARs were detected by real time PCR. In both active and inactive SLE patients, monocytes show an increase in PPAR α mRNA expression, as compared to healthy donors. PPAR γ mRNA is increased only in active patients when compared to healthy donors and inactive lupus patients. Further in this analysis, when we separated the patients with and without the administration of corticosteroids, PPAR γ displayed the same pattern as above. These results suggested that PPAR γ may be a marker for lupus activity. To validate this hypothesis, we compared the results obtained from patients with tuberculosis and acute infections. Results showed that only active-lupus patients have an increase in PPAR γ , confirming the specificity of this phenomenon and hence our hypothesis.

Our findings suggest that PPAR α and γ are up-regulated specifically in response to CD40/CD40L activation, in both cultured macrophages and in monocytes obtained from SLE patients. We could also suggest that PPAR γ may be marker for lupus activity. Our results may represent a new control mechanism of the CD40/CD40L signaling pathway and seem to be implicated in the control of the inflammatory response in both human macrophages *in vitro* and SLE patients.

Descriptors: Antigens CD40, CD40 ligand, PPAR alpha, PPAR gamma, macrophages, lupus erythematosus systemic

1. INTRODUÇÃO

1.1. A via de sinalização CD40/CD40L

O receptor de membrana CD40 foi identificado primeiramente em linfócitos B, como parte de um sistema de co-estimulação da ativação dessas células. Hoje se sabe que ele é expresso também em monócitos/macrófagos, células dendríticas, células endoteliais, células musculares lisas vasculares, fibroblastos e células epiteliais [1, 2]. O CD40 é uma glicoproteína transmembrânica tipo I, composta por 277 aminoácidos em humanos e é classificada como pertencente à superfamília dos receptores de TNF [1, 2].

O ligante da molécula CD40 (inicialmente chamado gp39 ou CD40L e, posteriormente, renomeado CD154) é um polipeptídeo de 261 aminoácidos e faz parte da família do TNF; está presente em Linfócitos B e T, basófilos, eosinófilos, monócitos/macrófagos, células dendríticas, endoteliais e epiteliais [2].

A interação entre a molécula CD40 e seu ligante desencadeia respostas específicas nas células onde esta ocorre, sendo comum exibirem a capacidade de ativar uma sinalização pró-inflamatória [1]. Assim, em linfócitos B a ligação CD40/CD40L promove diretamente a diferenciação, proliferação e mudança (“switching”) na classe de imunoglobulina produzida [3, 4]. Em células apresentadoras de antígenos, induz a produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6, IL-12, IFN- γ e TNF- α), expressão de

quimiocinas, metaloproteinases de matriz extracelular, óxido nítrico sintase, ciclooxigenase, além de marcadores de superfície envolvidos na co-ativação de linfócitos (CD86). Em células da parede vascular, leva à expressão de moléculas de adesão (VCAM-1, E-Selectina e CD54), citocinas e enzimas, como as MMPs e COX [1, 2]. Essa atividade pleiotrópica dessa via de sinalização a coloca numa posição central no desenvolvimento de uma resposta imune adequada e na gênese da auto-tolerância [5].

Embora o CD40 não tenha atividade de quinase, sua ligação leva à ativação de várias quinases e à produção de segundos mensageiros. Após a ligação, sua porção intracitoplasmática interage com os fatores associados ao receptor de TNF (TRAFs), desencadeando, a partir daí, cascatas de sinalização que culminam com a ativação da transcrição gênica [1, 2]. Desta maneira, os sinais provenientes da ativação do CD40 são traduzidos na ativação de fatores de transcrição específicos, que promovem a ativação de genes específicos. O mais importante fator de transcrição ativado pela via CD40 parece ser o NF- κ B [6], embora também ocorra à ativação dos fatores AP1, NF-AT e STAT-6 [1]. Entretanto, a participação de cada um destes fatores *in vivo* ainda não está clara.

Os mecanismos que controlam a desativação da via de sinalização do CD40/CD40L ainda não estão totalmente esclarecidas. A inativação e degradação dos TRAFs parece ser parte desse controle, embora não esteja clara sua ocorrência *in vivo* e em situações patológicas [7]. Essa família de proteínas forma diferentes oligômeros que, através de interações proteína-proteína, ativam as diferentes cascatas de sinalização, como por exemplo,

as vias da tirosina quinases JAK3, syk, lyn, fosfoninosítideo-3 quinase (PI-3 quinase) e fosfolipase [1]. Os resultados mostrando ativação de serina-treonina quinases (JNK/SPAK, p38, MAPK) ainda são controversos e não confirmados, devido, provavelmente, ao uso de diferentes modelos celulares no seu estudo [8].

Pelo discutido acima, fica claro que o esclarecimento dos fatores que regulam a atividade dessa via de sinalização é indispensável para melhor compreensão da resposta imune fisiológica e em condições patológicas.

Acreditava-se que a atividade do receptor CD40 dependesse somente do nível de sua expressão. Embora CD40 esteja constitutivamente presente nas células, sua expressão pode ser estimulada por um grande número de fatores, como citocinas [9], ésteres de forbol [10], fatores de crescimento [11], luz ultravioleta [12] e angiotensina II [13]. Por outro lado, a inibição de sua expressão por citocinas, como TGF- β envolveria um mecanismo pós-transcricional, consistindo de degradação aumentada seu mRNA, inibindo dessa maneira a síntese da proteína ativa [14].

Recentemente, demonstramos que o óxido nítrico pode modular a atividade do receptor CD40, através da S-nitrosilação de resíduos de cisteína, presentes em sua porção extracelular (Godoy CL, Ozer D, Souza HP, submetido à publicação), sugerindo que o receptor pode ser controlado também por modificações pós-traducionais.

Por analogia com outras cascatas de sinalização, podemos supor que existam outros mecanismos de controle que modulem, positiva ou

negativamente o sinal transmitido pelo receptor CD40, entretanto esses mecanismos ainda não foram descritos.

Disfunção da via de sinalização CD40/CD40L foi descrita primeiramente na Síndrome de Hiper-IgM, onde mutações no CD40L levam a uma imunodeficiência congênita, caracterizada por níveis baixos/ausentes de IgG e IgA, linfócitos B circulantes normais e aumento de IgM [7]. Posteriormente demonstrou-se que a interação CD40/CD40L é importante na fisiopatologia de diversas doenças inflamatórias crônicas, como a artrite reumatóide, lúpus eritematoso sistêmico e rejeição a transplante, colocando essa via de sinalização como peça fundamental no desenvolvimento da tolerância e auto-imunidade [1, 5].

Gerou grande interesse a participação do CD40/CD40L na gênese e desenvolvimento da doença aterosclerótica. Inicialmente, foi demonstrado que ocorria expressão dessas proteínas, de maneira funcional, dentro da placa aterosclerótica [9]. Posteriormente, a relevância biológica desses mediadores nas fases iniciais da patogênese da aterosclerose foi confirmada. Demonstrou-se o bloqueio desta via de sinalização em camundongos hiperlipidêmicos proporcionou menor progressão e maior presença de colágeno e células musculares lisas na estrutura das placas, tornando-as menos propensas à ruptura [15-18]. Estudos clínicos também mostram a participação mais direta da via de sinalização CD40/CD40L na formação e ruptura da placa de ateroma em humanos. Aumento dos níveis séricos de CD40L pode ser encontrada em pacientes com fatores de risco conhecidos [19, 20] e, mais importante, em pacientes com angina instável e

infarto agudo do miocárdio [21], sendo, inclusive, um marcador de risco aumentado de novos eventos cardiovasculares [22].

A participação da sinalização pelo CD40 em doenças autoimunes talvez seja a mais estudada, do ponto de vista clínico. Em algumas doenças autoimunes a participação da via de sinalização CD40/CD40L é bem descrita, tais como lúpus eritematoso, artrite reumatóide, doença de Sjögren, artrite induzida por colágeno, encefalomielite alérgica experimental e esclerose múltipla [2, 23]. Novas terapias baseadas no bloqueio dessa sinalização foram tentadas, como veremos mais adiante.

1.2. PPARs

PPARs, acrônimo em inglês para receptores ativados por proliferadores de peroxissomos, são fatores de transcrição pertencentes a uma superfamília de receptores nucleares. Os PPARs foram originalmente identificados em 1990 por Issemann e Green [24] e assim designados em virtude de serem receptores ativados por drogas que induzem a proliferação dos peroxissomos. Esta proliferação é uma resposta celular a uma variedade de compostos químicos e a certas condições fisiopatológicas que envolvem mudanças na morfologia celular e atividades enzimáticas peroxissomais [25, 26].

Estruturalmente, os PPARs são considerados membros da subfamília de receptores que incluem o receptor do hormônio da tireóide (TR), do ácido retinóico (RAR) e da vitamina D3 (VDR) [26]. Existem três

isoformas de PPARs, que possuem estrutura e domínios funcionais similares, porém distribuição e funções diferentes. Em comum, todas as isoformas apresentam quatro domínios, chamados A/B, C, D e E/F. O domínio A/B (também chamado *AF-1 – ligand-independent activation function 1*) localizado na porção N-terminal, contém a porção responsável pela fosforilação do PPAR. A região C ou região de ligação do DNA (*DBD, DNA binding domain*) promove a ligação do PPAR ao seu elemento responsivo (PPRE) – (*peroxissome proliferator response element*) na região de genes alvo. O domínio D é onde ocorre ligação de cofatores. A região E, ou domínio de ligação ao ligante (*LBD, ligand-binding domain*), é responsável pela especificidade do ligante e ativação da ligação do PPAR ao PPRE. O recrutamento de cofatores para assessorar o processo de transcrição gênica é realizado pela região E/F (também chamado de *AF-2 – ligand-dependent activation function-2*) [27, 28].

Uma vez ativados, os PPARs modulam a expressão de diversos genes pela ligação com o PPRE. Para ligar-se ao PPRE com alta afinidade e para uma ativação efetiva da transcrição, o PPAR requer um outro fator protéico adicional, o receptor do ácido 9-cis retinóico (RXR). A atuação simultânea de ambos os ativadores revela que existe um efeito sinérgico na indução da expressão de genes alvo por esses fatores de transcrição [25, 26]. Além disso, a dimerização é essencial para a atividade dos PPARs, como também para a maior parte dos outros membros da superfamília dos receptores nucleares. Os PPARs heterodimerizam-se com os RXR, formando então um complexo capaz de se ligar ao PPRE [25, 26].

Existem três isoformas de PPAR: α , β/δ e γ .

PPAR α é predominantemente expresso em hepatócitos, fibras musculares cardíacas, células renais do túbulo proximal, células endoteliais e eritrócitos [25, 26]. Nos tecidos onde é expresso (fígado, coração, rins) o PPAR α é responsável pelo controle de inúmeros genes importantes no metabolismo lipídico, como por exemplo: acil-CoA-sintetase, HMG-CoA-sintetase, apo-AI e apo-CIII1 [27]. Devido a esses achados, PPAR α foi primeiramente relacionado ao metabolismo de ácidos graxos. São ativadores endógenos de PPAR α alguns eicosanóides, ácidos graxos poliinsaturados como o ácido docosahexanóico (DHA) e o ácido eicosapentaenóico (EPA). Além disso, o PPAR α também é ativado por alguns fibratos, como gemfibrozil ou fenofibrato, usados clinicamente como drogas que promovem a redução de lipídios circulantes [26, 29].

PPAR β (também chamado de PPAR δ ou, em humanos, receptor de hormônio nuclear 1 - *NUC1*) apresenta distribuição ampla nos tecidos [25, 26, 29]. As funções desempenhadas pelo PPAR β/δ são menos estudadas, porém esta isoforma parece ser importante no controle do metabolismo e transporte de lipoproteínas, em especial em macrófagos [30].

O PPAR γ , por sua vez, está presente no tecido adiposo, sendo responsável pela modulação do metabolismo lipídico e adipogênese, regulando a expressão de genes essenciais como: lipase lipoproteica, proteína ligante de ácidos graxos e acil-CoA-sintetase. Ativadores endógenos de PPAR γ são derivados de prostaglandina D2, 15-desoxi- $\Delta^{12,14}$ prostaglandina J2 (15dPGJ2) assim como o ácido linoléico oxidado

(9(s)-e 13(s)-Hode), um componente da lipoproteína de baixa densidade (LDL) oxidada. Existem também ligantes sintéticos, as thiazolidinedionas (TZD), uma classe de drogas que inclui a pioglitazona e a rosiglitazona, de amplo uso no tratamento do diabetes. Estas drogas aumentam a sensibilidade de órgãos peritoniais à insulina, diminuindo a glicemia e muitas vezes aumentando os níveis da lipoproteína de alta densidade (HDL) [27].

Além disso, os PPARs são expressos em diversas células do sistema imune, como monócitos, macrófagos, células dendríticas e linfócitos [25, 26]. Recentemente foi demonstrada a importância dos PPARs no controle de diferentes tipos de resposta inflamatória, seja induzindo a expressão de diversas proteínas com ação anti-inflamatória ou inibindo a atividade de fatores de transcrição como NF- κ B, STATs, AP-1 e NF-AT [26]. Ao inibir estes fatores, há a repressão da expressão de várias moléculas estimulantes da resposta inflamatória, tais como citocinas e moléculas de adesão, assim como enzimas efetoras da resposta inflamatória, como a forma induzível do óxido nítrico sintase (iNOS).

Existem dados sugerindo que o PPAR α pode controlar a duração e intensidade da resposta inflamatória induzindo a expressão de proteínas envolvidas no catabolismo de mediadores lipídicos pró-inflamatórios, como I κ B α , interleucinas, LTB₄, LPS, TNF, TNFR, VCAM1 [26, 31]. Estudos clínicos e laboratoriais mostram que agonistas de PPAR α podem alterar favoravelmente a evolução de doenças vasculares e metabólicas com componente inflamatório importante, como a síndrome metabólica e a aterosclerose [25, 32].

Já o PPAR β/δ pode ter um efeito pró ou anti-inflamatório. Na ausência do ligante, o PPAR β/δ forma um complexo inativo com uma proteína repressora (BCL-6), ficando impedido de exercer qualquer atividade anti-inflamatória. Na presença do ligante, o PPAR β/δ se liberta do repressor BCL-6, gerando efeitos anti-inflamatórios [33].

Agonistas de PPAR γ exercem um efeito importante na prevenção da progressão da placa aterosclerótica. Esse efeito parece ir além da sua atividade nos lipídeos séricos, sendo dependente da capacidade dos ligantes de PPAR γ de inibirem o processo inflamatório na parede vascular acometida pela aterosclerose [25, 29, 34].

Embora os dados citados acima sugiram que agonistas dos PPARs possam ser usados como agentes anti-inflamatórios, sua utilidade parece estar restrita aos processos crônicos [35].

Na verdade, esse efeito dos PPARs como moduladores da inflamação ainda não está completamente esclarecido e seus mecanismos e sua utilidade clínica ainda necessitam ser melhor estudados.

1.3. Interações entre CD40/CD40L e PPARs

Como descrito acima, a via de sinalização CD40/CD40L é um importante efetor da resposta inflamatória, graças à capacidade de ativação da resposta imune adaptativa, seja estimulando a proliferação de linfócitos e produção de anticorpos, seja através da produção aumentada de citocinas

pelas células apresentadoras de antígenos. Em contrapartida, os PPARs funcionam na via contrária, exercendo atividade anti-inflamatória. Entretanto, possíveis interações entre essas duas vias de sinalização ainda não foram profundamente estudadas.

A maioria das publicações envolvendo as vias dos PPARs e do CD40/CD40L baseiam-se no efeito obtido pelos compostos capazes de ativar os PPARs. Por exemplo, foi descrito que plaquetas estimuladas com um ligante de PPAR γ diminuem a expressão de CD40L e conseqüentemente a ativação destas células [36]. Foi também demonstrado que pacientes diabéticos tratados com thiazolidinediona (ligante de PPAR γ) exibem diminuição no CD40L circulante [19]. Em células dendríticas murinas ocorre expressão constitutiva de PPAR γ , cuja ativação com rosiglitazona, embora não impeça o processo de maturação das células dendríticas ou sua capacidade de ativar linfócitos T, é capaz de inibir a expressão de IL-12 induzida pela ligação do CD40, o que poderia inibir a resposta do tipo Th1 [37].

Apesar do conhecimento do papel anti-inflamatório dos ativadores de PPARs, não existem estudos clínicos controlados em que se utilizem agonistas de PPARs no tratamento de doenças autoimunes, onde a resposta inflamatória desempenha um papel crucial. Entretanto, em alguns poucos modelos experimentais dessas doenças, a administração de agonistas de PPAR levam a uma melhora no desenvolvimento da doença, atuando principalmente na modulação do balanço Th1/Th2 da resposta imune [38].

Até então, não foi demonstrado se a ativação do CD40 modula a atividade dos PPARs ou se ocorre algum tipo de interação entre essa vias de sinalização ao nível de segundos mensageiros ou outros fatores de transcrição.

1.4. Lúpus eritematoso sistêmico

Lúpus eritematoso sistêmico (LES) é uma doença auto-imune crônica que possui quadros clínicos extremamente variáveis. Pacientes lúpicos podem apresentar desde quadros clínicos simples que exigem intervenções médicas mínimas, até casos significativos com danos irreversíveis a órgãos vitais como pulmão, coração, rim e cérebro. Mulheres jovens, principalmente na faixa entre 20 a 30 anos, são mais comumente acometidas que homens. A doença possui períodos de atividade intercalados por períodos de remissão que podem durar semanas, meses ou anos [39]. Alguns pacientes nunca desenvolvem complicações severas, porém existem pacientes que necessitam de atenção médica intensiva e constante.

O diagnóstico de LES deve ser suspeitado em mulheres jovens que apresentem fenômenos inflamatórios crônicos. Não existe um único exame laboratorial específico para o diagnóstico da doença e os exames podem mostrar alterações tão variadas quanto o quadro clínico. O achado laboratorial mais específico é a presença de auto-anticorpos circulantes. Esses anticorpos são dirigidos contra os ácidos desoxiribonucleicos (DNAs),

ácidos ribonucleicos (RNAs), antígenos nucleares e citoplasmáticos. Os anticorpos anti-Sm, anti-DNA de dupla hélice (dsDNA) e o anti-P são bastante específicos para LES, porém outros auto-anticorpos não tão específicos para a doença podem ser encontrados e podem auxiliar no diagnóstico, tais como Anti-ssDNA, Anti-RNP, Anti-Ro (SS-A), Anti-La (SS-B) [40].

Durante os períodos de remissão os pacientes permanecem assintomáticos, sem sinais clínicos ou laboratoriais de atividade inflamatória. Quando entram em atividade, esses pacientes podem apresentar sinais e sintomas de inflamação localizada ou sistêmica. Além disso, nessa fase os pacientes apresentam anormalidades do sistema complemento, hemograma alterado, eletroforese de proteínas compatíveis com presença de processo inflamatório em atividade [40].

Pelo exposto acima, fica claro que é sempre um desafio para o médico o encaminhamento correto desses pacientes, pois o diagnóstico diferencial inclui infecções, que podem ser graves e apresentar risco de morte. Além disso, o fato desses pacientes usarem drogas imunossupressoras os torna mais susceptíveis a infecções por germes oportunistas, o que torna o diagnóstico rápido e correto um desafio ainda maior.

A origem do LES não está totalmente esclarecida, mas sabe-se que existem combinações de fatores ambientais, hormonais e genéticos [41, 42]. A doença consiste basicamente, em anormalidades na regulação do sistema imune. Essas anormalidades parecem ser devidas a uma perda da auto-

tolerância. Pacientes afetados (antes ou durante o desenvolvimento dos sintomas) não são mais capazes de permanecer totalmente tolerantes aos seus auto-antígenos e, conseqüentemente, desenvolvem uma resposta autoimune [42]. Os mediadores dessa resposta são auto-anticorpos e os imunocomplexos por eles formados com os antígenos. Esses antígenos podem estar presentes na superfície celular, ou no compartimento intracelular e são variados em sua origem e estrutura [43]. Somado a essa disfunção da imunidade adquirida, a fagocitose e a remoção dos antígenos é deficiente nos pacientes lúpicos, o que permite que sejam continuamente estimulados receptores do sistema imune inato, como os receptores *toll-like*, promovendo a produção de citocinas pró-inflamatórias [43].

É preciso notar que nem todos os auto-anticorpos causam doença. Na verdade, todos os indivíduos normais produzem auto-anticorpos, embora em pequena quantidade. A variabilidade no quadro clínico que existe entre os pacientes lúpicos pode, portanto, refletir a variabilidade na qualidade e quantidade dos auto-anticorpos produzidos [39, 42].

Os linfócitos B são extremamente importantes na resposta imune humoral, interagindo com células apresentadoras de antígenos e linfócitos T, produzindo citocinas e regulando diferenciação celular [44]. Quando estimulados por células apresentadoras de antígenos (APCs), sendo o melhor exemplo as células dendríticas, os linfócitos B são selecionados, proliferam e passam a produzir anticorpos contra os antígenos a elas apresentados [44]. Este mecanismo é complexo e precisamente regulado. As APCs, através do MHCII, apresentam o antígeno para o linfócito B. Essa

ligação é o primeiro estímulo para a ativação do linfócito, embora não seja suficiente. A apresentação do antígeno, por sua vez, estimula a expressão de CD40L na membrana do linfócito, que vai se ligar ao receptor CD40 presente na superfície das APCs. Uma vez ativado o CD40, as APCs expressam CD80/86, que liga-se ao receptor CD28 nos linfócitos B, propiciando o segundo sinal necessário para a ativação dos mesmos [1, 3, 43]. Assim, os linfócitos B, que são peças-chave no desenvolvimento dos auto-anticorpos encontrados no LES, dependem, em parte, da ligação entre o receptor CD40 presente nas APCs ao seu ligante CD40L (CD154) nos linfócitos B [41, 44, 45]. Esta ligação é essencial na diferenciação das populações de células B de memória e células B efetoras.

A partir dessas informações surgiu a idéia de bloquear a ligação CD40-CD40L em pacientes lúpicos, o que diminuiria a diferenciação descontrolada de células B, levando à diminuição na produção de auto-anticorpos [44, 45]. Infelizmente, como veremos adiante, essa estratégia gerou efeitos colaterais indesejáveis. O tratamento dos pacientes diagnosticados com LES é extremamente difícil devido a grande variabilidade de sintomas.

Nos últimos 20 anos a sobrevida da maioria desses pacientes aumentou significativamente [39, 41, 42], provavelmente devido à melhora na eficácia de exames laboratoriais e a introdução de novas drogas, como anti-maláricos, imunossupressores e terapias à base de corticosteróides. Entretanto, esses tratamentos possuem efeitos colaterais que afetam muito a qualidade de vida do paciente. Entre esses efeitos estão o

desenvolvimento de diabetes mellitus, hipercolesterolemia, hipertensão e doenças renais [39, 41, 42].

Baseado no conhecimento adquirido sobre a resposta imune no LES e o papel do CD40/CD40L, foram realizados estudos utilizando um anticorpo anti-CD40L, o qual mostrou eficaz na redução da produção de auto-anticorpos anti-DNA, no controle de doenças renais, e na sobrevivência de camundongos geneticamente modificados para desenvolver uma doença semelhante ao LES [39, 41, 42]. Com base nesses dados em modelo experimental, foi realizado um estudo clínico preliminar fase I utilizando um anticorpo anti-CD40L em 23 pacientes com lúpus. Este estudo mostrou que a droga era bem tolerada e com efeitos colaterais moderados, tais como náusea, dores de cabeça e tontura. A resposta dos pacientes a esse tratamento experimental foi muito boa, com remissão da atividade da doença e melhora do quadro clínico, principalmente nos pacientes que tinham acometimento renal. Ao se expandir o estudo foi notado aumento da mortalidade, devido a fenômenos trombóticos, levando alguns pacientes à morte súbita ou síndromes isquêmicas agudas. Assim, infelizmente, o estudo foi suspenso e a droga nunca chegou a ser usada em larga escala para o tratamento do LES [39, 41, 42].

1.5. Hipótese

A via de sinalização CD40/CD40L é fundamental na resposta imune adequada e participa ativamente da gênese de diversas doenças, inclusive as doenças inflamatórias autoimunes, como o LES. Entretanto, estratégias para bloquear essa via de sinalização na tentativa de tratar doenças inflamatórias foram infrutíferas ou apresentaram efeitos colaterais graves.

Acreditamos que devam existir mecanismos endógenos que modulem a atividade da sinalização pelo CD40 e que um desses mecanismos possa ser através da ativação dos PPARs. Esses fatores de transcrição foram descritos recentemente como capazes de modular a resposta inflamatória. Além disso, agonistas exógenos dos PPARs parecem modificar a atividade da via de sinalização CD40/CD40L.

Assim, nossa hipótese é que a ativação da via de sinalização CD40/CD40L leva a um aumento da expressão e atividade dos PPARs, que por sua vez exerceriam um efeito inibitório na via de sinalização CD40/CD40L, num mecanismo de auto-regulação.

2. OBJETIVOS

Os objetivos do presente estudo são:

- Investigar se a ativação da via de sinalização CD40/CD40L modifica a expressão de PPARs α e γ de maneira específica *in vitro*.
- Determinar se a ativação da via CD40/CD40L modifica a atividade dos PPARs *in vitro*.
- Investigar se em pacientes com diagnóstico de LES (formas ativa e não ativa da doença) existe correlação entre os níveis de expressão de PPARs α e γ e CD40L solúvel.
- Investigar se há modificação na expressão de PPARs α e γ e dos níveis de CD40L solúvel em outras patologias, tais como tuberculose pulmonar e infecções agudas.

3. METODOLOGIA

3.1. Pacientes

Quarenta e quatro mulheres e dois homens portadores de LES (mediana da idade 27 anos, entre 13 e 52) foram recrutados no Ambulatório de Lúpus na Divisão de Reumatologia da Universidade de São Paulo. Todos os pacientes cumpriam 4 ou mais critérios da revisão de reumatologia do *American Collage* para classificação de lúpus [46]. O médico responsável por toda avaliação dos pacientes foi o Dr Eduardo F. Borba que não interferiu no tratamento, mantido de acordo com o protocolo padrão do Departamento de Reumatologia. No momento da coleta foi averiguada a atividade da doença de acordo com o Índice da atividade de lupus eritematoso sistêmico (*Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index*) SLEDAI [47]. Pacientes com LES foram divididos em três grupos: LES INATIVO (n=21) – pacientes com SLEDAI ≤ 4 (mediana = 0, variando entre 0 e 4), LES ATIVO (n=17) – pacientes com SLEDAI ≥ 4 (mediana = 10, variando entre 8 e 20) e LES INATIVO + INFECÇÃO (n=8) – pacientes com SLEDAI ≤ 4 e um processo infeccioso instalado (mediana = 0, sem variação). Doze mulheres saudáveis (CONTROLE) com mediana de idade de 32.5 anos, (variando entre 23 e 38 anos), pacientes com tuberculose (TB) pulmonar (mediana = 39 anos, variando entre 25 e 67, n=8), infecções agudas (INFECÇÃO, pneumonia e infecção urinária, n=8) com mediana de

idade de 51,5 anos, (variando entre 20 e 75) foram selecionadas para comparação e estudadas em paralelo aos pacientes lúpicos.

Pacientes com diagnóstico estabelecido de TB pulmonar foram recrutados no ambulatório de Tuberculose da Divisão de Moléstias Infecciosas e Parasitárias sob consentimento e supervisão do Dr. Antônio Alci Barone. Dr. Francisco José Nigro Mazon e Dr. Eduardo Martins Zincone, preceptores do Pronto Socorro do 4º andar do Hospital das Clínicas foram responsáveis pelo recrutamento de pacientes com infecções agudas previamente diagnosticadas. No setor de Admissão do mesmo Pronto Socorro, os pacientes com mesmo diagnóstico foram selecionados sob supervisão da Dra Suzi Jacon.

Os pacientes não sofreram nenhuma intervenção no tratamento, sendo mantido de acordo com o protocolo de cada departamento. O trabalho teve aprovação pelo Comitê de Ética local (protocolo #165/05) e o consentimento foi obtido de todos os pacientes. A amostra de sangue periférico foi coletada em 4 tubos de coleta a vácuo (cerca de 15 ml) contendo ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) sendo que os pacientes estavam em jejum de no mínimo 12 horas no momento da coleta.

3.2. Isolamento de células do sangue periférico

As células mononucleares foram isoladas a partir de 10 ml de sangue periférico de pacientes e doadores saudáveis por gradiente de Ficoll-

Paque (Amersham Biosciences). As amostras de sangue foram diluídas em igual volume de solução salina tamponada (PBS) e dispensadas sobre o Ficoll-Paque na proporção de 6 ml sangue periférico diluído para 3 ml de Ficoll-Paque. As amostras foram centrifugadas a $200 \times g$ por 30 minutos a 25 °C. A fase em forma de anel que continha os mononucleares foi isolada com o auxílio de uma pipeta pasteur e lavada 3 vezes com PBS. Após a última lavagem as células foram suspendidas em 1 ml de TRIzol (Invitrogen) e mantidas 5 minutos a temperatura ambiente para posterior extração de RNA total.

3.3. Cultura celular

Monócitos de linhagem humana THP-1 foram mantidos em RPMI 1640 (Cultilab) com 10 % de soro fetal bovino (Gibco) e 100 U/ml de penicilina e 100 µg/ml de streptomicina, em uma atmosfera contendo 5 % CO₂ a 37 °C. Para os experimentos, as células foram plaqueadas a 2×10^6 /ml em placas de 6 poços e diferenciadas em macrófagos com o tratamento de 40 nM acetato de forbol miristato (PMA, Sigma) por 24 h. Posteriormente estas foram estimuladas com o recombinante humano de CD40L (rhCD40L; 1 µg/ml; Peprotech), lipopolissacáride (LPS; 10 µg/ml; Sigma) ou permaneceram sem nenhum estímulo (CONTROLE) por diferentes períodos. Para a extração do RNA total das células, o meio de cultura foi retirado e as células foram lavadas com PBS. Posteriormente foi

adicionado 1 ml de TRIzol no frasco de cultura, mantido por 5 minutos a temperatura ambiente.

3.4. Extração de RNA e PCR

A cada amostra ressuspensa em 1 ml TRIzol foi adicionado 200 µl de clorofórmio. Depois de homogenizada e incubada por 3 minutos a temperatura ambiente, a amostra foi centrifugada por 15 minutos a 12.000 X g na temperatura de 4 °C. O sobrenadante foi transferido para um outro tubo que recebeu 500 µl de isopropanol por ml de TRIzol, sendo incubado por 10 minutos a temperatura ambiente. O produto foi centrifugado por 10 minutos na mesma velocidade e temperatura anteriores e o sobrenadante desprezado. Posteriormente foi adicionado 1 ml de etanol 70 % (feito com água DEPC, dietilpirocarbonato) para cada ml inicial de TRIzol, sendo este novamente centrifugado, agora por 5 minutos a 7500 g a 4 °C. O álcool residual foi retirado e a amostra foi ressuspensa em até 50 µl água DEPC. O RNA total extraído foi armazenado a -80 °C por 24 horas antes de ser quantificado por espectrofotometria.

A quantificação foi realizada em uma diluição de 98 µl de água DEPC para 2 µl do RNA em um espectrofotômetro (Eppendorf) lendo-se a absorbância a 260 nm.

Depois de quantificado, o RNA de cada amostra foi submetido a um RT-PCR (transcrição reversa –reação em cadeia da polimerase), no qual a

enzima transcriptase reversa converte o RNA mensageiro em DNA complementar (cDNA). Para tanto, a 1 µg de RNA foi adicionado 1 µl de Oligo dT (0,5 ug/ul - Promega) e as amostras foram incubadas em termociclador MJ Research PTC-200 por 10 minutos a 70 °C e depois 5 minutos no gelo. Posteriormente foram adicionados 6,1 µl de água deionizada estéril; 1 µl de transcriptase reversa Impron II (Promega); 1 µl de dNTP (10 mM – Invitrogen), 6 µl de buffer 5 X; 0,5 µl de RNAsin (Promega), 2,4 µl de Cloreto de magnésio (25 mM) perfazendo volume total de 20 µl. A reação foi incubada em termociclador por 50 minutos a 42 °C e 70 °C por 15 minutos.

Os níveis de transcritos de IL-1 β , PPAR α , γ , CD36 e CD80 foram determinados por *real time* PCR com *primers* específicos para cada gene (Invitrogen) e os resultados expressos como razão da expressão do gene *housekeeping* gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH).

A reação de *real time* PCR foi realizada com 20 µl de volume total contendo 8,7 µl de água deionizada estéril; 10 µl Platinum SYBR Green qPCR superMix-UDG (invitrogen); 0,4 µl de cada *primer* a 10 pmol/µl e 1 µl de cDNA em termociclador Rotor Gene 6000 (Corbett Research).

Todas as reações foram acompanhadas de um controle negativo (todos os componentes da reação, exceto o cDNA).

Genes	<i>Primers</i>	Ciclagem	Tamanho do produto
GAPDH	Sense- 5'-GGT GGT CTC CTC TGA CTT CAA CA-3'; Antisense- 5'- GTT GCT GTA GCC AAA TTC GTT GT-3'.	95°C por 30 s 64°C por 30 s 72°C por 40 s (35 ciclos)	127pb

IL-1 β	Sense- 5'- GGG CCT CAA GGA AAA GGA TC-3'; Antisense- 5'- TTC TGC TTG AGA GGT GCT GA-3'	95°C por 35 s 61°C por 35 s 72°C por 45 s (45 ciclos)	205pb
PPAR α	Sense- 5'- GTT TGA GGG GGT AAC AGC AA -3'; Antisense - 5'- GCT AAC TGC AGA GGG TGA G3'.	95°C por 30 s 64°C por 30 s 72°C por 40 s (45 ciclos)	247pb
PPAR γ	Sense- 5'- CAT TCT GGC CCA CCA ACT TTG G-3'; Antisense- 5'-TGG AGA TGC AGG CTC CAC TTT G-3';	95°C por 30 s 64°C por 30 s 72°C por 40 s (35 ciclos)	229pb
CD36	Sense- 5'-AGA TGC AGC CTC ATT TCC AC-3' Antisense- 5'-GCC TTG GAT GGA AGA ACA AA -3';	95°C por 30 s 62°C por 30 s 72°C por 40 s (45 ciclos)	150pb
CD80	Sense- 5'-GGG AAA GTG TAC GCC CTG TA-3' Antisense- 5'-GCT ACT TCT GTG CCC ACC AT -3';	95°C por 40 s 64°C por 60 s 72°C por 60 s (45 ciclos)	216pb

Tabela1. *Primers* utilizados, ciclagem de *real time* PCR com tempo em segundos e tamanhos do produto em pares de bases (pb).

3.5. Quantificação de IL1- β e CD40L solúvel

A citocina IL-1 β foi dosada em meio de cultura celular e o CD40L solúvel (sCD40L) em plasma de pacientes, com kits de ELISA da BD Biosciences e R&D Systems, respectivamente.

Placas de 96 poços foram adsorvidas com anticorpo de captura monoclonal anti-IL-1 β ou com anti-sCD40L recombinante humano, por 12 horas. Em seguida, as placas foram lavadas com solução de PBS contendo 0,05 % de Tween 20. Os sítios livres do plástico foram bloqueados com PBS contendo 10 % de soro fetal bovino (Gibco) para IL-1 β ou 1 % de BSA

(albumina sérica bovina, Sigma) para sCD40L, por uma hora. A placa foi lavada para remoção da solução de bloqueio. Em seguida, 50 µl das amostras e dos padrões foram colocados nos respectivos poços e incubados por 2 horas. Ao final do período as placas foram lavadas novamente. Adicionou-se o 25 µl do anticorpo de detecção conjugado com a peroxidase e incubou-se por 1 hora (IL-1β) e 2 horas (sCD40L). As placas foram lavadas e ao final delas adicionou-se o substrato da peroxidase, tetrametilbenzidina, deixando-se reagir por 30 minutos. Ao final da incubação adicionou-se a solução de parada (2N H₂SO₄). A quantificação foi realizada pela leitura da absorbância (450 nm) e os resultados expressos em picogramas de antígeno por miligrama de proteína.

3.6. EMSA

A atividade de um fator de transcrição é comumente analisada utilizando ensaio de mobilidade eletroforética retardada em gel (EMSA). Nesse ensaio, o lisado nuclear é incubado com um oligonucleotídeo dupla fita de DNA contendo uma determinada seqüência regulatória marcada radioativamente. O conteúdo dessa reação é então aplicado em um gel de poliacrilamida contendo tampão não desnaturante. Caso o fator de transcrição esteja ativado, ele se liga ao oligonucleotídeo e este complexo proteína-DNA migra com velocidade menor que o oligonucleotídeo não ligado.

Este ensaio foi utilizado para avaliar a ativação de dois fatores de transcrição, PPAR/RXR e NF- κ B. A seqüência dupla fita a qual esses fatores de transcrição se ligam estão descritas abaixo:

PPAR/RXR: 5'-AGCTACCAGGACAAAGGTCACGT-3'

NF- κ B: 5'-AGTTGAGGGGACTTTCCCAGGC-3'

Estes oligonucleotídeos foram marcados por fosforilação da extremidade 5' com [γ^{32} P]-ATP (GE Healthcare Life Sciences) catalisada pela enzima T4 polinucleotídeo quinase (Life Technologies). A reação, que continha 10 pmol de oligonucleotídeo, 15 pmol de [γ^{32} P]-ATP, 1 U de T4 quinase e tampão de enzima 1X, foi incubada a 37 °C por 1 hora. A reação foi interrompida pela adição de tampão TE (Tris HCl 10 mM; EDTA 1 mM; pH 8,0) contendo NaCl (0,1 M) e o excesso de [γ^{32} P]-ATP foi removido por centrifugação do volume da reação utilizando colunas MicroSpin S-300 HR (GE Healthcare Life Sciences).

Para o preparo do extrato de proteínas nucleares utilizamos, por tratamento, 2 dos 6 poços da placa contendo cerca de 1×10^7 células/poço. As células foram centrifugadas a 700 x g por 10 minutos a 4 °C e o sedimento foi lavado com 1 ml de tampão HBS (Hepes 25 mM; pH 7,6; NaCl 15 mM) duas vezes. Em seguida, o sedimento foi lavado uma vez com tampão RBI (KCl 100 mM; MgCl₂ 5 mM; EGTA 5 mM; Na₄P₂O₇ 5 mM; PMSF 1 mM; aprotinina 2 µg/ml; leupeptina 2 µg/ml) e incubado por 5 minutos com 1 ml do mesmo tampão. Após a incubação, o sedimento foi lavado e incubado por 5 minutos com 1 ml de tampão RBII (KCl 50 mM; MgCl₂ 5 mM; EGTA 1 mM; Na₄P₂O₇ 1 mM; PMSF 1 mM; aprotinina 2 µg/ml; leupeptina 2

µg/ml). Em seguida, incubamos o sedimento com tampão LBS (Tris 25 mM pH 7,5; MES 25 mM; Triton X-100 0,1 %; DTT 1 mM; PMSF 1 mM; aprotinina 2 µg/ml; leupeptina 2 µg/ml) por 30 minutos no gelo. O lisado foi centrifugado a 900 x g por 10 minutos e o sedimento restante contendo as proteínas nucleares foi ressuspensão em tampão de extração (Hepes 20 mM pH 7,6; NaCl 0,45 M; EDTA 2,5 mM; glicerol 25 %; DTT 2,5 mM; PMSF 1 mM; aprotinina 2 µg/ml e leupeptina 2 µg/ml). Após incubação por 30 minutos a 4 °C sob agitação, a suspensão foi centrifugada por 10 min a 4 °C na rotação máxima e o sobrenadante contendo as proteínas nucleares foi armazenado a -80 °C. As proteínas nucleares foram quantificadas conforme descrito por Bradford (1976).

Para a formação dos complexos proteína-DNA, as reações (volume final 20 µl) foram preparadas em gelo, contendo 10 µg de extrato nuclear, 1,5 µg de Poli dI-dC, 1 pmol de oligonucleotídeo marcado e 6 µl de tampão de ligação (Hepes 60 mM pH 7,6; glicerol 10 %; KCl 150 mM; EDTA 0,6 mM, DTT 3 mM). As reações foram incubadas à temperatura ambiente por 20 minutos. A seguir, as amostras foram aplicadas em um gel contendo 6 % de poliacrilamida em tampão TBE (Tris base 45 mM; ácido bórico 45 mM; EDTA 1 mM) e submetidas a eletroforese a 150 V por 1 a 2 horas. Após a eletroforese, o gel foi seco a vácuo a 80 °C e exposto em um filme de raio-X por 24-72 horas. Os resultados foram analisados por densitometria das bandas utilizando o equipamento STORM 840 (Dynamic Molecular, Sunnyvale, USA).

Para avaliarmos a ativação de PPAR e NF- κ B, a linhagem monocítica THP-1 foi diferenciada em macrófago com o tratamento de 40 nM de PMA por 24 h. Posteriormente estas foram estimuladas por 3 e 5 horas com o recombinante humano de CD40L (rhCD40L, 1 μ g/ml, Peprotech).

3.7. Silenciamento por RNA de interferência

O RNA de interferência (RNAi) é um potente e altamente específico silenciador de genes que é gerado por um RNA dupla fita (dsRNA). Existem diversos tipos destes RNAs mas o mais utilizado em pesquisas laboratoriais é o siRNA (*small interference RNA*) [48].

Foram utilizadas as seguintes seqüências complementares para silenciamento de PPAR γ :

Sense: 5'GGAUCUCUCCGUAAUGGAATT3'

Antisense: 5'UUCCAUUACGGAGAGAUCCCTT3'

Primeiramente as duas fitas foram aneladas para maior estabilidade quando estocadas. Para isso, 20 μ M de cada fita foi ressuspensa em *annealing buffer* (HEPES-KOH 60 mM pH 7.4; KCl 200 mM; MgCl₂ 4 mM) e colocadas em mesmo recipiente. A solução foi colocada em termociclador por 1 minutos a 90 °C e uma hora a 37 °C sendo posteriormente estocada a -20 °C. Foi utilizado também um controle negativo para siRNA (*silencer negative control #1siRNA* Ambion) que possui uma seqüência que não produz efeitos inibitórios.

Monócitos THP-1 foram plaqueados em placas de 6 poços, contendo 10^5 células/ml o que representa cerca de 30 % de confluência. Estas células foram ativadas com PMA por 24 horas e posteriormente seu meio de cultura foi trocado para RPMI sem soro e antibiótico por 2 horas. O siRNA ou o controle negativo para siRNA (200 pmol/ml) foram diluídos em um pequeno volume de OPTI-MEM (Gibco; meio de cultura propício para transfecção) sob agitação durante 10 minutos. Em seguida foi inserida a *LipofectamineTM 2000 reagent* (Invitrogen; 5 μ l/ml) e a solução se manteve em agitação por mais 15 minutos. O volume foi completado para 2 ml por poço e colocado na placa. Após 6 horas o meio de cultura foi retirado sendo recolocado o RPMI com 10 % de soro e 1 % de antibiótico. Após 24 horas as células foram estimuladas com rhCD40L por 2 horas, o meio de cultura foi retirado e as células foram preparadas para a extração de RNA e execução de *real time* PCR (como descrito anteriormente). No *real time* PCR foi analisado os genes PPAR γ e CD80

3.8. Análise estatística

Os resultados foram apresentados como média $\pm$ erro padrão da média (EPM). Para análise dos dados obtidos *in vitro* e PPAR γ de pacientes e controles, foi utilizada a análise de variância (ANOVA) com pós teste de Student-Newman-Keuls. O ANOVA não paramétrico com pós teste de Dunn foi realizado para os níveis de sCD40L e PPAR α de todos os pacientes e controles. Diferenças com $p < 0,05$ foram consideradas como significativas.

4. RESULTADOS

4.1. Citocina IL-1 β

Para verificar se o estímulo da via CD40-CD40L gera uma resposta inflamatória no modelo *in vitro*, os níveis de IL-1 β produzidos por macrófagos THP-1 estimulados com rhCD40L foram avaliados medindo-se a expressão de mRNA por *real time PCR* e citocina secretada por ELISA. Os transcritos de IL-1 β apresentaram um aumento após 2 horas de exposição ao rhCD40L comparado ao seu respectivo controle (n=5, p<0,05), retornando posteriormente aos seus níveis basais analisados até 24 horas (Figura 1A). Posteriormente foi analisada a produção desta citocina no meio de cultura no qual se observou um aumento durante todos os períodos analisados (2, 4, 6, 16 e 24 h) sendo que apenas os horários 6 e 16 horas de estímulo exibiram diferença estatística em relação aos respectivos controles (n=5, p<0,05, Figura 1B). Esses dados mostram que a exposição dos macrófagos em cultura ao ligante rhCD40L induz uma resposta pró-inflamatória nessas células.

Figura 1A

B

(A) Macrófagos derivados da linhagem monocítica THP-1 mostram aumento de transcritos de IL-1 β após 2 h de estímulo com rhCD40L. A expressão de IL-1 β foi determinada por *real time* PCR. n=5 experimentos. * p<0,05 vs respectivo controle.

(B) O meio de cultura dos macrófagos THP-1 apresentam aumento dos níveis de IL-1 β em 6 e 16 h após estímulo com rhCD40L. Níveis de IL-1 β determinados por ELISA. n=5 experimentos. * p<0,05 vs respectivo controle.

4.2. Expressão de PPARs α e γ em células estimuladas com rhCD40L

Para investigar se a ativação da via de sinalização CD40/CD40L modifica a expressão de PPARs α e γ *in vitro*, macrófagos THP-1 foram estimulados rhCD40L por 2, 4, 6, 16 e 24 horas e os transcritos de mRNA foram analisados por *real time* PCR. PPAR α apresentou um aumento tardio e discreto, após 16 horas de estímulo com rhCD40L em relação ao seu controle (n=5, p<0,05). Nenhum aumento foi detectado nos outros horários medidos (Figura 2A). PPAR γ apresentou um padrão diferente, apresentando um aumento precoce, após 2 horas de estímulo com o ligante, retornando depois aos níveis basais de expressão, semelhantes aos valores obtidos em células que não foram expostas ao rhCD40L (Figura 2B). Existe também uma diferença quantitativa importante entre a transcrição destes PPARs. Além de mais precoce, a expressão de PPAR γ é muito maior que PPAR α .

Figura 2A

B

(A) Macrófagos derivados da linhagem monocítica THP-1 mostram aumento de transcritos de PPAR α após 16 h de estímulo com rhCD40L. Expressão de PPAR α determinada por *real time* PCR. n=5 experimentos. *P<0,05 vs respectivo controle.

(B) Macrófagos derivados da linhagem monocítica THP-1 mostram aumento de transcritos de PPAR γ após 2 h de estímulo com rhCD40L. Expressão de PPAR γ determinada por *real time* PCR. n=5 experimentos. *P<0,05 vs respectivo controle.

4.3. Expressão de PPARs α e γ em células estimuladas com LPS

A fim de determinar se a modificação na expressão de PPARs α e γ está acoplada especificamente ao estímulo da via de sinalização CD40/CD40L *in vitro*, macrófagos THP-1 foram expostos ao LPS, que induz uma resposta pró-inflamatória ao se ligar ao *toll-like* receptor 4 (TLR4) na membrana das células [49].

Os macrófagos foram estimulados com LPS ou LPS juntamente com rhCD40L nas condições em que se observou aumento de PPARs α (16 h) e γ (2 h) relatadas acima. Os resultados mostraram que os tratamentos com LPS ou com LPS juntamente com rhCD40L induziram diminuição na expressão de PPARs α (Figura 3A) e γ (Figura 3B) em relação ao controle e após o tratamento com LPS ou com LPS e rhCD40L comparados com às células tratadas somente com rhCD40L (n=5, p<0,05).

A ativação do TLR4 induz um aumento na expressão de IL-1 β , similar à observada com a exposição ao rhCD40L [49]. Para verificar se o LPS utilizado estava produzindo uma resposta inflamatória, foi medido mRNA para IL-1 β nas mesmas amostras do ensaio anterior. A figura 3C apresenta um aumento na expressão de IL-1 β nas células tratadas com LPS ou LPS e rhCD40L em comparação com o controle (n=5, p<0,05).

Figura 3A

B

C

(A) O estímulo de 16 h com LPS ou com LPS+rhCD40L mostram uma diminuição no mRNA para PPAR α em macrófagos THP-1 quando comparados com células tratadas apenas com rhCD40L. Expressão de PPAR α determinada por *real time* PCR. n=5 experimentos. *p<0,05 vs controle. # p<0,05 vs. LPS. \$p<0,05 vs. LPS+rhCD40L.

(B) O estímulo de 2 h com LPS ou com LPS+rhCD40L mostram uma diminuição no mRNA para PPAR γ , em macrófagos THP-1, quando comparados com células tratadas apenas com rhCD40L. Expressão de PPAR γ determinada por *real time* PCR. n=5 experimentos. *p<0,05 vs controle. # p<0,05 vs. LPS. \$p<0,05 vs. LPS+rhCD40L.

(C) Em macrófagos THP-1 o estímulo de 2 h ou 16 h com LPS mostram um aumento na expressão de IL-1 β em relação ao seu respectivo controle. Expressão de IL-1 β determinada por *real time* PCR. n=5 experimentos. *p<0,05 vs respectivo controle.

4.4. Expressão de CD36 em células estimuladas com LPS

CD36 é um receptor *scavenger* presente em monócitos e macrófagos que participa da remoção da LDL oxidada do plasma, atua na indução de apoptose e pode ainda funcionar como molécula de adesão capaz de interagir com colágeno I e IV. Sua expressão está vinculada ao aumento da atividade de PPARs, principalmente o γ [50]. Assim, com o objetivo de mostrar que o aumento na expressão de PPARs em resposta à ativação da via de sinalização CD40/CD40L é biologicamente relevante, fomos verificar a expressão de CD36, que é induzida por PPARs. Células THP-1 foram tratadas com rhCD40L por 2 e 16 horas. O resultado mostra um aumento de CD36 em ambos os horários em relação ao seu respectivo grupo controle (Figura 4, n=5, p<0,05). Uma vez que a transcrição de CD36 depende especificamente de aumento da ligação do PPAR γ ao promotor desse gene, esses dados sugerem que o aumento de expressão de PPAR γ detectada após estimulação com rhCD40L é funcionalmente importante.

Figura 4

Em macrófagos THP-1, o estímulo de 2 h ou 16 h com rhCD40L geram um aumento na expressão de CD36 em relação ao seu respectivo controle. Expressão de CD36 determinada por *real time* PCR. n=5 experimentos. *p<0,05 vs. respectivo controle.

4.5. Atividade de NF- κ B e PPARs

Para analisarmos se os fatores de transcrição NF- κ B e os três tipos de PPAR estão em atividade quando há a ativação dos macrófagos com CD40L, foi realizado o ensaio EMSA.

Para NF- κ B (Figura 5A) obtivemos o resultado contundente com a literatura, que diz que o estímulo com CD40L aumenta a atividade deste fator de transcrição [1, 2]. Devido às características pró-inflamatórias, o NF- κ B, juntamente com os dados da produção de IL-1 β (Figura 1A e B) mostrou-se extremamente importante para este estudo indicando que o estímulo com rhCD40L utilizado neste trabalho foi eficaz em termos da ativação da via CD40 (n=2).

No caso de PPAR/RXR (Figura 5B), não houve diferença entre os grupos controle e CD40L 3 e 5 horas (n=3).

Figura 5A

B

(A) Em macrófagos THP-1, o estímulo de 3 h ou 5 h com rhCD40L geram um aumento na atividade de NF- κ B em relação ao seu respectivo controle. Figura com bandas em duplicata para cada tratamento, sendo as duas últimas o controle negativo da reação. Atividade de NF- κ B determinada por EMSA. n=2 experimentos.

(B) Atividade de PPAR/RXR em macrófagos THP-1 determinada por EMSA. Figura mostra bandas em triplicata para cada tratamento, sendo as duas últimas o controle negativo da reação. O gráfico de barras mostra que não houve diferença entre os grupos.

4.6. Efeito do silenciamento de PPAR γ na Via CD40/CD40L

Para verificar se o silenciamento do PPAR γ altera o perfil pró-inflamatório causado pelo estímulo do macrófago com CD40L, avaliamos a expressão de CD80. O CD80 é um receptor de diversos tipos celulares, como por exemplo, as APCs, e sua expressão é estimulada quando se ativa a via via CD40/CD40L [51]. Assim, o CD80 foi escolhido devido a sua especificidade em relação à via de sinalização do CD40, diferentemente de outros produtos compartilhados por outras vias de sinalização.

Para verificar se o silenciamento do PPAR γ por siRNA foi bem sucedido, foi realizado um *real time* PCR que, segundo a literatura, é um dos métodos que pode ser utilizado para se verificar a eficácia desta técnica [52]. A Figura 6A mostra o mesmo padrão da figura 2B em que, após o estímulo de 2 horas com rhCD40L, há um significativo aumento de PPAR γ em relação ao seu respectivo controle. A transfecção com uma sequência inerte de RNA (controle negativo para siRNA) apresentou o mesmo comportamento do controle, o que mostra que a transfecção *per se* não interfere no experimento. O tratamento com siRNA juntamente com o estímulo com rhCD40L gerou uma redução de 73,3% na expressão do mRNA de PPAR γ .

Figura 6A

B

(A) Verificação da efetividade do silenciamento de PPAR γ por siRNA. Macrófagos THP-1 mostram aumento de transcritos de PPAR γ após 2 h de estímulo com rhCD40L quando comparados com os grupos controle, controle negativo de siRNA e siRNA com o estímulo com rhCD40L, mostrando a efetividade do silenciamento que é de 73,3%. Expressão de PPAR γ determinada por *real time* PCR. n=4 experimentos. *P<0,05 vs controle. #P<0,05 vs rhCD40L. \$ P<0,05 vs controle negativo siRNA.

(B) Macrófagos derivados da linhagem monocítica THP-1 mostram aumento de transcritos de CD80 após de estímulo de 2 h com rhCD40L quando comparados ao controle e ao controle negativo siRNA. No grupo estimulado com rhCD40L com concomitante silenciamento de PPAR γ , o CD80 se mostra aumentado em relação a todos os grupos analisados. Expressão de CD80 determinada por *real time* PCR. n=4 experimentos. *P<0,05 vs controle. #P<0,05 vs rhCD40L. \$ P<0,05 vs controle negativo siRNA.

4.7. Níveis de sCD40L em plasma de pacientes lúpicos

A fim de verificar se os achados encontrados em células *in vitro* poderiam ser observados *in vivo*, foram selecionados pacientes com diagnóstico de Lúpus eritematoso sistêmico, nos quais a literatura descreve alta atividade da via CD40/CD40L [45].

Para confirmar este achado da literatura foram verificados os níveis de sCD40L no plasma destes pacientes (Figura 7). Os dados obtidos mostram um aumento apenas em pacientes com a doença em atividade (n=8), comparando-se tanto com o controle (n=4, $p<0,05$) quanto com pacientes com lúpus inativo (n=9, $p<0,05$). Não foi encontrada diferença entre os doadores saudáveis e os pacientes com a doença sem atividade.

Figura 7

Níveis de CD40L solúvel no plasma de pacientes lúpicos e doadores saudáveis. Pacientes com lúpus em atividade apresentam aumento nos níveis de sCD40L comparados com controle e pacientes com lúpus inativo. Níveis de sCD40L medidos por ELISA. * $p < 0,05$ vs controle. # $p < 0,05$ vs LES inativo.

4.8. Expressão de PPARs α e γ em células de pacientes lúpicos

Assim como nas células em cultura, foi verificada a expressão de PPARs α e γ em células de pacientes lúpicos com a via CD40/CD40L ativada.

PPAR α apresentou um aumento na sua expressão em pacientes com lúpus ativo (n=17) e inativo (n=21) em comparação aos controles (n=12, $p<0,05$). Não houve diferença entre pacientes com a doença ativa ou inativa (Figura 8A). PPAR γ mostrou um aumento em lúpicos em atividade em comparação a doadores saudáveis e pacientes com lúpus inativo (Figura 8B). Não foi encontrada diferença entre os controles e lúpicos sem atividade (o n é o mesmo de PPAR α , $p>0,05$).

Figura 8A

B

(A) Fração de células mononucleares de pacientes lúpicos e doadores saudáveis mostram aumento de transcritos de PPAR α em pacientes com LES ativo e inativo quando comparados com o controle. Expressão de PPAR α determinada por *real time* PCR. *P<0,05 vs controle.

(B) Fração de células mononucleares de pacientes lúpicos e doadores saudáveis mostram aumento de transcritos PPAR γ apenas em pacientes com LES ativo quando comparados com LES inativo e grupo controle. Expressão de PPAR γ determinada por *real time* PCR. *P<0,05 vs controle. #P<0,05 vs LES inativo.

4.9. Expressão de PPARs α e γ em células de pacientes lúpicos sem medicação

A literatura mostra que os corticosteróides podem alterar a expressão de PPARs [53]. Com isso, para determinar se o corticosteróide dado à maioria dos pacientes não influenciou na expressão dos PPARs foi realizada uma análise onde todos os pacientes que estavam utilizando este tipo de droga foram excluídos, restando apenas aqueles que não estavam com nenhuma medicação ou que estavam utilizando cloroquina .

PPAR α apresentou-se aumentado em LES ativo e inativo em relação ao controle (Figura 9A). Na Figura 9B, PPAR γ apresentou o mesmo padrão observado na análise anterior, com pacientes lúpicos em atividade (n=7) exibindo expressão aumentada em relação à lúpicos inativos (n=9) e doadores saudáveis (n=12, $P<0,05$). Não ocorreu diferença entre os últimos dois grupos.

Figura 9A

B

(A) Fração de células mononucleares de pacientes lúpicos sem corticosteróides e doadores saudáveis mostra aumento de transcritos de PPAR α em pacientes com LES ativo e inativo quando comparados com o controle. Expressão de PPAR α determinada por *real time* PCR. *P<0,05 vs controle.

(B) Fração de células mononucleares de pacientes lúpicos sem corticosteróides e doadores saudáveis mostra aumento de transcritos PPAR γ apenas em pacientes com LES ativo quando comparados com LES inativo e grupo controle. Expressão de PPAR γ determinada por *real time* PCR. *P<0,05 vs controle. #P<0,05 vs LES inativo.

4.10. Expressão de PPARs α e γ em pacientes com doenças infecciosas crônicas e agudas

Para evidenciar se o perfil de expressão de PPAR α e, em particular o γ , é específico para a atividade de LES, foram comparados os resultados obtidos com pacientes lúpicos com células de pacientes com infecção crônica (TB), infecções agudas (infecção urinária e pneumonia), e LES sem atividade concomitante a alguma infecção. Este último grupo estava acometido com alguma das seguintes infecções: infecção urinária, herpes zoster, celulite, bacteremia por *Salmonella enteritidis* ou pneumonia.

O PPAR α (Figura 10A) de pacientes com lupus ativo (n=21), inativo (n=17), TB (n=8) e pacientes com infecção aguda (n=7) apresentou aumento de expressão em comparação a doadores saudáveis (n=12) e lúpicos com infecção (n=7, $P<0,05$). Não ocorreu diferença entre os quatro primeiros grupos.

PPAR γ (Figura 10B) mostrou diferença entre pacientes lúpicos ativos e todos os outros grupos ($p>0,05$).

Figura 10A

B

(A) Fração de células mononucleares de doadores saudáveis, pacientes lúpicos, pacientes com TB e pacientes com infecções agudas. Transcritos de PPAR α em pacientes com LES inativo, LES ativo, TB e infecção apresentam aumento quando comparados com o controle e LES + infecção. Expressão de PPAR α determinada por *real time* PCR. *P<0,05 vs controle. #P<0,05 vs LES + infecção.

(B) Em mesmos grupos de **(A)**, transcritos de PPAR γ mostraram aumento entre pacientes lúpicos ativos e todos os outros grupos. *P<0,05 vs controle. #P<0,05 vs LES inativo. \$ P<0,05 vs LES + infecção. @ P<0,05 vs TB. & P<0,05 vs infecção.

4.11. Níveis de sCD40L em plasma de pacientes

A fim de se verificar se os pacientes estudados em paralelo aos portadores de LES tinham os mesmos níveis de CD40L circulante, foi realizado um ELISA em amostras de plasma.

A Figura 11 mostra que há um aumento de sCD40L no LES ativo (n=7) em relação aos grupos controle (n=4), LES inativo (n=5) e TB (n=6, $p<0,05$), não havendo diferença entre os grupos LES ativo, LES com infecção (n=6) e pacientes apenas com infecção (n=5).

Figura 11

Níveis de CD40L solúvel no plasma de doadores saudáveis, pacientes lúpicos, pacientes com TB e com infecções agudas. Pacientes com lúpus em atividade apresentam aumento nos níveis de sCD40L comparados com controle, pacientes com lúpus inativo e TB. Não houve diferença entre LES ativo, LES + infecção e infecção. Níveis de sCD40L medidos por ELISA. * $p < 0,05$ vs controle. # $p < 0,05$ vs LES inativo. \$ $p < 0,05$ vs TB.

5. DISCUSSÃO

O desenvolvimento da resposta imune adquirida adequada é dependente da via de sinalização do CD40 e seu ligante CD40L. Essa via de sinalização participa tanto da imunidade humoral quanto da mediada por células [5]. A interação entre CD40 e CD40L pode regular outras moléculas co-estimulatórias, ativar células apresentadoras de antígenos (APCs), influenciar as funções de células T e B assim como participar no processo de doenças inflamatórias crônicas [3]. Apesar desse papel essencial, ainda não se conhece um método descrito que seja seguro e efetivo para controlar a atividade desta via de sinalização. Neste estudo, demonstramos que a ativação da via de sinalização CD40/CD40L leva ao aumento da expressão e atividade de PPAR α e γ , atuando na de modulação da resposta inflamatória induzida pela ativação da via de sinalização CD40/CD40L.

Inicialmente, mostramos que a ligação de CD40 leva a uma resposta inflamatória em macrófagos humanos *in vitro*, evidenciado pelo fato do estímulo destas células com rhCD40L levar a um aumento da expressão e secreção de IL-1 β . Os níveis desta citocina ocorrem logo depois da ligação do CD40L e se mantém por algumas horas. Apesar das células utilizadas serem de linhagem monocítica, que necessita do tratamento com PMA para sua diferenciação em macrófagos, está descrito que estas células possuem uma resposta semelhante à de macrófagos recém isolados de sangue periférico humano [54].

No mesmo modelo experimental, foi demonstrado que o estímulo com rhCD40L aumenta a expressão de PPAR α e γ . É interessante observar que a transcrição de PPAR γ começa logo após a ativação do CD40 (2 horas), enquanto PPAR α mRNA aparece apenas após 16 horas. Esta diferença pode sugerir que a transcrição de PPAR γ ocorre diretamente após a ativação da via CD40/CD40L e a de PPAR α , aparentemente, necessita de um intermediário, como por exemplo, uma citocina. Esta hipótese ainda se mantém sem confirmação. Além disso, a quantidade de PPAR γ expresso é muito maior que a de PPAR α . Este achado indica que possivelmente PPAR γ é mais importante no início do processo inflamatório, e que ambos PPARs participam de fases diferentes da resposta imune associada a ativação da via do CD40.

O controle da expressão de PPARs é um fenômeno complexo em que vários estímulos afetam sua transcrição gênica. Em nosso modelo experimental, a regulação dos PPARs parece estar especificamente relacionada à interação do CD40 com CD40L. As células estimuladas a um outro insulto capaz de desencadear resposta pró-inflamatória não foi capaz de aumentar a expressão de PPARs. Macrófagos estimulados com LPS ou LPS+rhCD40L mostraram uma diminuição na expressão de PPAR α e γ quando comparados com o estímulo do rhCD40L sozinho. Este dado é corroborado por outros autores que mostram que macrófagos estimulados com LPS aumentam a expressão de PPAR γ , mas apenas na presença de interferon- γ ou algum agonista de PPAR γ [55, 56]. É necessário notar que a exposição ao LPS foi capaz de induzir outros efeitos pró-inflamatórios nas

células em cultura, como a secreção de citocinas. Além disso, os efeitos na célula tratada com LPS e LPS+rhCD40L são os mesmos, em concordância aos achados da literatura. Segundo Sinistro *et al* 2007, o LPS interfere na regulação de CD40, CD80 e CD86 em monócitos *in vitro* estimulados com CD40L. O efeito do LPS em monócitos estimulados com CD40L é similar às células estimuladas somente com LPS, indicando que os fatores solúveis gerados pelo estímulo com LPS podem levar a uma tolerância ao CD40L [57].

Estes achados ilustram a complexidade do controle da expressão dos PPARs. Por exemplo, em um trabalho recente com um modelo experimental de encefalomielite autoimune, a expressão de PPAR α se mostra mais abundante em machos, demonstrando que hormônios sexuais podem interferir na expressão deste PPAR. Neste trabalho é sugerido que esta seja uma das razões para que as fêmeas desenvolvam mais doença autoimunes [58].

A seguir, procuramos determinar se, paralelamente ao aumento de expressão de PPARs existia também um concomitante incremento em sua atividade. Assim, demonstramos que células estimuladas com rhCD40L apresentaram aumento na expressão de CD36 quando comparadas com seu respectivo controle. Existe consenso na literatura que a expressão de CD36 depende da ligação dos PPARs, principalmente o gama, ao promotor desse gene [50]. Assim, nossos dados experimentais sugerem, indiretamente, que a ativação da via de sinalização CD40/CD40L leva ao aumento da atividade de PPARs.

Procuramos analisar a ativação dos PPARs de forma direta e não conseguimos observar diferença na ligação dos PPARs ao DNA entre os grupos controle e tratados com rhCD40L. Na verdade, o ensaio de mobilidade eletroforética retardada em gel (EMSA) utilizado detecta proteínas presentes no espaço nuclear, capazes de se ligar a seqüências específicas do DNA. Assim, esses experimentos nos mostraram que a presença dos PPARs no espaço nuclear independe do estímulo da célula com CD40L.

Para evidenciarmos se realmente existe uma interação entre estas duas vias de sinalização, optamos por observar a resposta ao CD40L em células *in vitro*, onde o gene do PPAR γ foi silenciado através do RNA de interferência. Este método é específico e atualmente muito utilizado para silenciar genes de interesse [48]. O CD80 (B7-1) é um receptor de membrana encontrado em linfócitos B, células dendríticas, macrófagos, linfócitos T ativados e grande variedade de células tumorais [51]. Este receptor está associado à especificidade e regulação da resposta imune, funcionando como co-estimulador para a amplificação desta resposta. O controle da expressão do CD80 é dependente da ativação da via do CD40/CD40L, sendo regulado por esta [51].

Em nossos experimentos, a ativação do CD40 em células onde o PPAR γ foi silenciado levou a uma maior expressão de CD80. Este achado evidencia que o PPAR γ age como um mecanismo de modulação negativa da via de sinalização CD40/CD40L.

Em resumo, nossos achados *in vitro* mostram que a ativação da via de sinalização CD40/CD40L induz a um aumento da expressão e atividade de PPARs, principalmente PPAR γ , que pode, subsequente, agir como modulador negativo dessa via pró-inflamatória.

Para determinar se nossos achados poderiam ser observados *in vivo*, foram examinados pacientes com diagnóstico de lúpus eritematoso sistêmico (LES). A razão para a escolha deste modelo é que o LES é uma doença autoimune caracterizada pela expressão e atividade de diversos mediadores inflamatórios [41, 43]. Além disso, pacientes lúpicos apresentam altos níveis séricos de CD40L solúvel, indicando um aumento na atividade de CD40/CD40L nestes indivíduos [59, 60].

Inicialmente selecionamos pacientes com diagnóstico de LES com diversos graus de atividade. Corroborando os dados da literatura, os pacientes com a doença em atividade apresentaram níveis plasmáticos de CD40L solúvel mais elevados que indivíduos saudáveis ou pacientes com diagnóstico de LES, mas sem atividade. Em seguida, demonstramos que células mononucleares de pacientes lúpicos com a doença em atividade apresentam um aumento de transcritos de PPAR γ quando comparados com doadores saudáveis e pacientes com lúpus inativo. Não houve diferença entre os doadores saudáveis e pacientes com lúpus inativo, um padrão similar ao do CD40L circulante descrito acima. Por outro lado, os transcritos de PPAR α estavam aumentados em ambos os grupos de pacientes em comparação com o controle, não havendo diferença entre os grupos com a doença. Estes resultados sugerem que a relação entre a ativação de

CD40/CD40L e PPAR γ pode ser direta, o que pode não ser verdadeiro para PPAR α .

Pacientes com lúpus, em sua maioria, utilizam imunossupressores ou corticosteróides para controle da doença [39, 42, 43]. Alguns trabalhos publicados mostram que os corticosteróides modulam a expressão de PPARs [61, 62]. Assim, excluimos desta análise o grupo de pacientes em tratamento com corticosteróides, porém o padrão de expressão de PPAR α e γ continua o mesmo, sugerindo que o uso de corticosteróides não é fator determinante no controle da transcrição desses PPARs, neste modelo. Os indivíduos lúpicos mantidos nesta última análise estavam sem medicação ou com ingestão de cloroquina, sendo esta um anti-malárico utilizado para tratar graus mais leves da doença [38, 41, 42]. [39, 42, 43]. Não há na literatura trabalhos que mostrem existir alguma relação entre o uso de cloroquina e expressão de PPARs. Os dados obtidos aqui mostram que aparentemente não há interferência da administração de cloroquina na expressão de PPARs α e γ em células mononucleares de sangue periférico.

Baseados nesses dados iniciais dos pacientes e no fato de LPS não interferir na transcrição dos PPARs, levantamos a hipótese que a determinação de transcritos para PPAR γ poderia ser um instrumento válido para diferenciação entre pacientes lúpicos em atividade e pacientes com doenças inflamatórias e/ou infecciosas de outra origem. O diagnóstico de atividade em paciente com lúpus é um desafio para o clínico ou reumatologista. Os sintomas e sinais da atividade mimetizam os de um quadro infeccioso e a maior probabilidade de infecções atípicas adiciona

complicações ao quadro. Atualmente, o diagnóstico diferencial entre atividade lúpica e infecção é feito através da eliminação da possibilidade do paciente possuir qualquer foco infeccioso, seja localizado ou sistêmico. Esse método obriga a realização de múltiplos exames, muitas vezes de alto custo, além de causar desconforto adicional ao paciente. Não existe um exame único que diagnostique atividade lúpica ou faça essa diferença entre atividade e infecção.

Assim, foram inseridos novos grupos de pacientes com diferentes patologias inflamatórias ou infecciosas a fim de responder a esta nova pergunta. Basicamente, comparamos a expressão de PPAR α e γ de pacientes lúpicos com a de outras doenças crônicas e agudas de base inflamatória. Incluímos ainda pacientes com lúpus sem atividade e com alguma inflamação concomitante.

Os resultados obtidos com PPAR γ apresentam evidências de que é possível que este seja um potencial marcador para atividade de lúpus, pois pacientes com lúpus ativo mostraram maior expressão de PPAR γ em relação a todas demais condições patológicas analisadas. Em comparação com novos grupos de pacientes, o contingente com LES ativo continua apresentando um aumento de CD40L circulante em relação ao controle, LES inativo e agora também em relação ao grupo de pacientes com tuberculose. Os grupos com infecções agudas com ou sem lúpus concomitante não apresentaram diferença nos níveis de CD40L circulante em relação à LES ativo.

Essa abordagem da relação entre as vias dos PPARs e CD40/CD40L é bastante inovadora, já que estudos previamente realizados enfocaram principalmente os efeitos de agonistas de PPARs na atividade ou expressão de CD40/CD40L. Por exemplo, agonistas de PPAR γ reduziram significativamente a síntese de IL-12 induzida por CD40 em células dendríticas (DC) [63]. Em plaquetas e megacariócitos, agonistas de PPAR γ podem bloquear a liberação de trombina induzida por CD40L [36]. O tratamento de células vasculares humanas (células endoteliais, musculares lisas, macrófagos e fibroblastos) com estatinas induz uma diminuição de CD40, mediada pela via de sinalização de PPAR α [64, 65]. Estes dados sugerem a existência de uma relação entre as vias de sinalização de PPAR α e γ e CD40/CD40L em diferentes tipos celulares.

Há também muitos estudos que apontam para a existência de uma relação entre PPARs e a fisiopatologia de doenças autoimunes, embora ainda não haja consenso a este respeito [38, 58, 66-68]. Agonistas de PPAR apresentam efeitos benéficos em modelos animais de doença autoimune. Em um modelo de miocardite autoimune (EAM), o tratamento com o ligante de PPAR γ pioglitazona induziu melhora na evolução da doença [38], efeito que os autores atribuem à modulação do balanço Th1/Th2 e inibição da quimiocina pró-inflamatória MIP-1 α . Da mesma forma, dois ligantes sintéticos de PPAR α , gemfibrozil e fenofibrato, inibiram características clínicas em um modelo de encefalomielite autoimune (EAE) [66, 67]. Neste modelo viu-se que o gemfibrozil alterou o padrão de citocinas secretadas por células T, inibindo IFN- γ (citocina pró-inflamatória Th1) e

promovendo a produção de IL-4 (citocina Th2, anti-inflamatória) [66, 67]. Outro trabalho demonstrou que o aumento de IL-4 induz a expressão de PPAR γ [69]. Em um modelo de LES em camundongos, a administração do agonista natural de PPAR γ ácido linoléico conjugado (CLA) foi benéfica, atrasando os sintomas relacionados ao desenvolvimento de LES. Este efeito foi relacionado à diminuição de NF- κ B, sendo este de uma forma independente de PPAR γ [70]. Em conjunto, os achados experimentais acima sugerem um efeito benéfico dos agonistas de PPARs em doenças autoimunes.

Nossos dados *in vitro* e em pacientes abrem também a perspectiva do uso de agonistas de PPARs como auxiliares no tratamento de doenças autoimunes, especificamente o LES. É importante ressaltar que drogas que ativam PPARs vem sendo utilizadas em outras condições clínicas por um longo período de tempo e, portanto, poderiam ser testadas com mais facilidade em outras patologias. Quanto ao uso do PPAR γ como instrumento para diferenciar a atividade de infecção em pacientes lúpicos, é preciso confirmar nossos resultados em um número maior de pacientes, de tal maneira que o teste seja analisado para aplicação em grandes populações.

Em resumo, demonstramos que o PPAR α e em particular o PPAR γ são regulados positivamente em resposta específica à ativação da via CD40/CD40L em células em cultura. Estes fatores de transcrição exercem um papel de modulação negativa sobre a resposta pró-inflamatória desencadeada pela ligação do CD40. Além disso, o aumento de PPAR γ apenas em pacientes lúpicos com a forma ativa da doença, sugere que este

seja um possível marcador de atividade de LES. Este dado indica que a determinação da transcrição de PPAR γ possa exercer um papel importante e imediato, sendo mais um componente no auxílio do diagnóstico de pacientes lúpicos.

6. CONCLUSÕES

PPAR α e em particular o PPAR γ são regulados em resposta específica à ativação da via CD40/CD40L em células THP-1 em cultura, modulando negativamente a ativação da via do CD40. Em pacientes lúpicos a expressão de PPAR γ se dá somente em células de indivíduos com a doença em atividade; o tratamento com corticosteróides não influencia na expressão deste fator de transcrição. Este aumento de PPAR γ apenas em pacientes lúpicos com a forma ativa da doença (quando comparados com outros pacientes lúpicos, doadores saudáveis e doenças infecciosas crônicas e agudas) sugere que este seja um possível marcador de atividade da doença.

7. REFERÊNCIAS

1. van Kooten, C. and J. Banchereau, CD40-CD40 ligand. *J Leukoc Biol*, 2000. 67(1): p. 2-17.
2. Schonbeck, U. and P. Libby, The CD40/CD154 receptor/ligand dyad. *Cell Mol Life Sci*, 2001. 58(1): p. 4-43.
3. Xu, Y. and G. Song, The role of CD40-CD154 interaction in cell immunoregulation. *J Biomed Sci*, 2004. 11(4): p. 426-38.
4. Bishop, G.A. and B.S. Hostager, Signaling by CD40 and its mimics in B cell activation. *Immunol Res*, 2001. 24(2): p. 97-109.
5. Quezada, S.A., et al., CD40/CD154 interactions at the interface of tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol*, 2004. 22: p. 307-28.
6. Hsing, Y., B.S. Hostager, and G.A. Bishop, Characterization of CD40 signaling determinants regulating nuclear factor-kappa B activation in B lymphocytes. *J Immunol*, 1997. 159(10): p. 4898-906.
7. Ferrari, S. and A. Plebani, Cross-talk between CD40 and CD40L: lessons from primary immune deficiencies. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 2002. 2(6): p. 489-94.
8. Bishop, G.A. and B.S. Hostager, Molecular mechanisms of CD40 signaling. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 2001. 49(2): p. 129-37.
9. Mach, F., et al., Functional CD40 ligand is expressed on human vascular endothelial cells, smooth muscle cells, and macrophages: implications for CD40-CD40 ligand signaling in atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. 94(5): p. 1931-6.

10. Law, C.L., B. Wormann, and T.W. LeBien, Analysis of expression and function of CD40 on normal and leukemic human B cell precursors. *Leukemia*, 1990. 4(11): p. 732-8.
11. McLellan, A.D., et al., Human dendritic cells activate T lymphocytes via a CD40: CD40 ligand-dependent pathway. *Eur J Immunol*, 1996. 26(6): p. 1204-10.
12. Gilliam, A.C., et al., The human hair follicle: a reservoir of CD40+ B7-deficient Langerhans cells that repopulate epidermis after UVB exposure. *J Invest Dermatol*, 1998. 110(4): p. 422-7.
13. Souza, H.P., et al., Angiotensin II modulates CD40 expression in vascular smooth muscle cells. *Clin Sci (Lond)*, 2008.
14. Howard, L.M. and S.D. Miller, Immunotherapy targeting the CD40/CD154 costimulatory pathway for treatment of autoimmune disease. *Autoimmunity*, 2004. 37(5): p. 411-8.
15. Schonbeck, U., et al., Inhibition of CD40 signaling limits evolution of established atherosclerosis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. 97(13): p. 7458-63.
16. Mach, F., et al., Reduction of atherosclerosis in mice by inhibition of CD40 signalling. *Nature*, 1998. 394(6689): p. 200-3.
17. Shimizu, K., et al., Host CD40 ligand deficiency induces long-term allograft survival and donor-specific tolerance in mouse cardiac transplantation but does not prevent graft arteriosclerosis. *J Immunol*, 2000. 165(6): p. 3506-18.

18. Schonbeck, U., et al., CD40 ligation induces tissue factor expression in human vascular smooth muscle cells. *Am J Pathol*, 2000. 156(1): p. 7-14.
19. Varo, N., et al., Elevated plasma levels of the atherogenic mediator soluble CD40 ligand in diabetic patients: a novel target of thiazolidinediones. *Circulation*, 2003. 107(21): p. 2664-9.
20. Garlachs, C.D., et al., Upregulation of CD40 and CD40 ligand (CD154) in patients with moderate hypercholesterolemia. *Circulation*, 2001. 104(20): p. 2395-400.
21. Aukrust, P., et al., Enhanced levels of soluble and membrane-bound CD40 ligand in patients with unstable angina. Possible reflection of T lymphocyte and platelet involvement in the pathogenesis of acute coronary syndromes. *Circulation*, 1999. 100(6): p. 614-20.
22. Heeschen, C., et al., Soluble CD40 ligand in acute coronary syndromes. *N Engl J Med*, 2003. 348(12): p. 1104-11.
23. Toubi, E. and Y. Shoenfeld, The role of CD40-CD154 interactions in autoimmunity and the benefit of disrupting this pathway. *Autoimmunity*, 2004. 37(6-7): p. 457-64.
24. Issemann, I. and S. Green, Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature*, 1990. 347(6294): p. 645-50.
25. Duez, H., J.C. Fruchart, and B. Staels, PPARs in inflammation, atherosclerosis and thrombosis. *J Cardiovasc Risk*, 2001. 8(4): p. 187-94.

26. Daynes, R.A. and D.C. Jones, Emerging roles of PPARs in inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol*, 2002. 2(10): p. 748-59.
27. Marx, N., P. Libby, and J. Plutzky, Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) and their role in the vessel wall: possible mediators of cardiovascular risk? *J Cardiovasc Risk*, 2001. 8(4): p. 203-10.
28. Kota, B.P., T.H. Huang, and B.D. Roufogalis, An overview on biological mechanisms of PPARs. *Pharmacol Res*, 2005. 51(2): p. 85-94.
29. Michalik, L., et al., International Union of Pharmacology. LXI. Peroxisome proliferator-activated receptors. *Pharmacol Rev*, 2006. 58(4): p. 726-41.
30. Oliver, W.R., Jr., et al., A selective peroxisome proliferator-activated receptor delta agonist promotes reverse cholesterol transport. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. 98(9): p. 5306-11.
31. Youssef, J. and M. Badr, Role of Peroxisome Proliferator-Activated Receptors in Inflammation Control. *J Biomed Biotechnol*, 2004. 2004(3): p. 156-166.
32. Stienstra, R., et al., PPARs, Obesity, and Inflammation. *PPAR Res*, 2006. 2007: p. 95974.
33. Lee, C.H., et al., Transcriptional repression of atherogenic inflammation: modulation by PPARdelta. *Science*, 2003. 302(5644): p. 453-7.

34. Li, A.C. and C.K. Glass, PPAR- and LXR-dependent pathways controlling lipid metabolism and the development of atherosclerosis. *J Lipid Res*, 2004. 45(12): p. 2161-73.
35. Glass, C.K. and S. Ogawa, Combinatorial roles of nuclear receptors in inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol*, 2006. 6(1): p. 44-55.
36. Akbiyik, F., et al., Human bone marrow megakaryocytes and platelets express PPARgamma, and PPARgamma agonists blunt platelet release of CD40 ligand and thromboxanes. *Blood*, 2004. 104(5): p. 1361-8.
37. Faveeuw, C., et al., Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activators inhibit interleukin-12 production in murine dendritic cells. *FEBS Lett*, 2000. 486(3): p. 261-6.
38. Hasegawa, H., et al., Pioglitazone, a peroxisome proliferator-activated receptor gamma activator, ameliorates experimental autoimmune myocarditis by modulating Th1/Th2 balance. *J Mol Cell Cardiol*, 2005. 38(2): p. 257-65.
39. Mosca, M., et al., Treatment of systemic lupus erythematosus. *Int Immunopharmacol*, 2001. 1(6): p. 1065-75.
40. Colaboradores, R.F.e., *Manual de reumatologia para graduação em medicina*. primeira ed, ed. P. Editores. 2007, São Paulo. 201
41. Anolik, J.H. and M. Aringer, New treatments for SLE: cell-depleting and anti-cytokine therapies. *Best Pract Res Clin Rheumatol*, 2005. 19(5): p. 859-78.

42. Goldblatt, F. and D.A. Isenberg, New therapies for systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Immunol*, 2005. 140(2): p. 205-12.
43. Ermann, J. and B.L. Bermas, The biology behind the new therapies for SLE. *Int J Clin Pract*, 2007. 61(12): p. 2113-9.
44. Grammer, A.C. and P.E. Lipsky, B cell abnormalities in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther*, 2003. 5 Suppl 4: p. S22-7.
45. Grammer, A.C. and P.E. Lipsky, CD154-CD40 interactions mediate differentiation to plasma cells in healthy individuals and persons with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*, 2002. 46(6): p. 1417-29.
46. Tan, E.M., et al., The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*, 1982. 25(11): p. 1271-7.
47. Bombardier, C., et al., Derivation of the SLEDAI. A disease activity index for lupus patients. The Committee on Prognosis Studies in SLE. *Arthritis Rheum*, 1992. 35(6): p. 630-40.
48. Rana, T.M., Illuminating the silence: understanding the structure and function of small RNAs. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007. 8(1): p. 23-36.
49. Chaudhary, A., T.M. Fresquez, and M.J. Naranjo, Tyrosine kinase Syk associates with toll-like receptor 4 and regulates signaling in human monocytic cells. *Immunol Cell Biol*, 2007. 85(3): p. 249-56.
50. Nicholson, A.C., Expression of CD36 in macrophages and atherosclerosis: the role of lipid regulation of PPARgamma signaling. *Trends Cardiovasc Med*, 2004. 14(1): p. 8-12.

51. Lenschow, D.J., T.L. Walunas, and J.A. Bluestone, CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annu Rev Immunol*, 1996. 14: p. 233-58.
52. Zimmermann, T.S., et al., RNAi-mediated gene silencing in non-human primates. *Nature*, 2006. 441(7089): p. 111-4.
53. Cuzzocrea, S., et al., Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha contributes to the anti-inflammatory activity of glucocorticoids. *Mol Pharmacol*, 2008. 73(2): p. 323-37.
54. Ribbens, C., J.M. Dayer, and C. Chizzolini, CD40-CD40 ligand (CD154) engagement is required but may not be sufficient for human T helper 1 cell induction of interleukin-2- or interleukin-15-driven, contact-dependent, interleukin-1beta production by monocytes. *Immunology*, 2000. 99(2): p. 279-86.
55. Ogawa, S., et al., Molecular determinants of crosstalk between nuclear receptors and toll-like receptors. *Cell*, 2005. 122(5): p. 707-21.
56. Von Knethen, A.A. and B. Brune, Delayed activation of PPARgamma by LPS and IFN-gamma attenuates the oxidative burst in macrophages. *Faseb J*, 2001. 15(2): p. 535-44.
57. Sinistro, A., et al., Lipopolysaccharide desensitizes monocytes-macrophages to CD40 ligand stimulation. *Immunology*, 2007. 122(3): p. 362-70.
58. Dunn, S.E., et al., Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)alpha expression in T cells mediates gender differences in development of T cell-mediated autoimmunity. *J Exp Med*, 2007. 204(2): p. 321-30.

59. Goules, A., et al., Elevated levels of soluble CD40 ligand (sCD40L) in serum of patients with systemic autoimmune diseases. *J Autoimmun*, 2006. 26(3): p. 165-71.
60. Kato, K., et al., The soluble CD40 ligand sCD154 in systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest*, 1999. 104(7): p. 947-55.
61. Poczatкова, H., et al., Dehydroepiandrosterone effects on the mRNA levels of peroxisome proliferator-activated receptors and their coactivators in human hepatoma HepG2 cells. *Gen Physiol Biophys*, 2007. 26(4): p. 268-74.
62. Tamasi, V., et al., Modulation of receptor phosphorylation contributes to activation of peroxisome proliferator activated receptor alpha by dehydroepiandrosterone and other peroxisome proliferators. *Mol Pharmacol*, 2008. 73(3): p. 968-76.
63. Gosset, P., et al., Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activators affect the maturation of human monocyte-derived dendritic cells. *Eur J Immunol*, 2001. 31(10): p. 2857-65.
64. Martin, G., et al., Statin-induced inhibition of the Rho-signaling pathway activates PPARalpha and induces HDL apoA-I. *J Clin Invest*, 2001. 107(11): p. 1423-32.
65. Mulhaupt, F., et al., Statins (HMG-CoA reductase inhibitors) reduce CD40 expression in human vascular cells. *Cardiovasc Res*, 2003. 59(3): p. 755-66.

66. Lovett-Racke, A.E., et al., Peroxisome proliferator-activated receptor alpha agonists as therapy for autoimmune disease. *J Immunol*, 2004. 172(9): p. 5790-8.
67. Racke, M.K., et al., Nuclear receptors and autoimmune disease: the potential of PPAR agonists to treat multiple sclerosis. *J Nutr*, 2006. 136(3): p. 700-3.
68. Crosby, M.B., et al., Inflammatory modulation of PPAR gamma expression and activity. *Clin Immunol*, 2006. 118(2-3): p. 276-83.
69. Huang, J.T., et al., Interleukin-4-dependent production of PPAR-gamma ligands in macrophages by 12/15-lipoxygenase. *Nature*, 1999. 400(6742): p. 378-82.
70. Bergamo, P., et al., Conjugated linoleic acid enhances glutathione synthesis and attenuates pathological signs in MRL/MpJ-Fas(lpr) mice. *J Lipid Res*, 2006. 47(11): p. 2382-91.