

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

Amilóide sérica A: efeitos biológicos sobre células
mononucleares

Silvana Sandri

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientadora:
Profa. Dra. Ana Campa

São Paulo
2008

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

Amilóide sérica A: efeitos biológicos sobre células
mononucleares

Silvana Sandri

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientadora:
Profa. Dra. Ana Campa

São Paulo
2008

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Sandri, Silvana

S219a Amilóide sérica A : efeitos biológicos sobre células mononucleares
/ Silvana Sandri . -- São Paulo, 2008.
164p.

Tese (doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises
Clínicas e Toxicológicas.

Orientador: Campa, Ana

1. Bioquímica clínica 2. Imunologia celular 3. Inflamação
I. T. II. Campa, Ana, orientador.

616.0756 CDD



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Relatório de Defesa

Relatório de defesa pública de Tese do(a) Senhor(a) Silvana Sandri no Programa: Farmácia (Análises Clínicas), do(a) Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

Aos 4 dias do mês de agosto de 2008, no(a) Auditorio realizou-se a Defesa da Tese do(a) Senhor(a) Silvana Sandri, apresentada para a obtenção do título de Doutor em Farmácia - Área: Análises Clínicas, intitulada:

"Amilóide sérica A: efeitos biológicos sobre células mononucleares"

Após declarada aberta a sessão, o(a) Sr(a) Presidente passa a palavra aos examinadores para as devidas arguições que se desenvolvem nos termos regimentais. Em seguida, a Comissão Julgadora proclama o resultado:

Nome dos Participantes da Banca	Vínculo do Docente	Sigla da Unidade	Resultado
Ana Campa	Presidente	FCF - USP	Aprovado
Ligia Ferreira Gomes	Titular	FCF - USP	Aprovado
Suzana Beatriz Verissimo de Mello	Titular	FM - USP	Aprovado
Cristoforo Scavone	Titular	ICB - USP	Aprovado
Sandro Rogerio de Almeida	Suplente	FCF - USP	Aprovado
Resultado Final: Aprovado			
Parecer da Comissão Julgadora *			

Comentários da Defesa (opcional)

Eu, Ana Maria Dias Dantas _____, Secretária, lavrei a presente ata, que assino juntamente com os(as) Senhores(as). São Paulo, aos 4 dias do mês de agosto de 2008.

Ligia Ferreira Gomes

Suzana Beatriz Verissimo de Mello

Cristoforo Scavone

Sandro Rogerio de Almeida

Ana Campa
Orientador(a)

* Obs: Se o candidato for reprovado por algum dos membros, o preenchimento do parecer é obrigatório.

Nos termos do artigo 110, do RG-USP, encaminhe-se o presente relatório à CPG, para homologação.

Impresso em: 28/08/2008

*E todo impulso é cego, exceto quando há saber.
E todo saber é vão, exceto quando há trabalho.
E todo trabalho é vazio, exceto quando há amor."*

Gibran Khalil Gibran

*À Ana, pela confiança depositada em mi,
por ter me ensinado o que é pesquisa e
principalmente pela sua contribuição no
meu crescimento pessoal.*

Muito obrigada!!!

Aos meus pais, Rineo e Antonia por serem a base de tudo em que a minha vida está construída e pelo amor incondicional. Às minhas irmãs, Fabiana e Fernanda pela união, apoio, carinho e deliciosa convivência.

*Ao meu "namorado", Décio pelo seu
amor, momentos de alegria e por
ser meu porto seguro durante todo
esse período.*

*À minha irmã de coração, Cris pela
amizade durante esses dez anos e
pelo seu apoio em momentos
importantes.*

AGRADECIMENTOS

Aos meus colegas de laboratório, Andressa, Franciele, Mariana, Melissa, Kátia, Sabrina, Sidharta, Silene, Talita e Wilton pela convivência maravilhosa, pela amizade e pelo constante apoio durante todo o desenvolvimento deste trabalho.

Aos nossos colaboradores, Pro. Dr. Momtchilo Russo e Prof. Dr. Hugo P. Monteiro pela valiosa contribuição dada a este trabalho.

Aos colegas do laboratório do Prof. Momtchilo pela amizade e colaboração.

Aos colegas de laboratório do Prof. Hugo Monteiro, Roberto Jun Arai e Miriam pela amizade e pelo suporte técnico durante minha passagem pelo laboratório.

Aos funcionários, estagiários e pós graduando do Departamento de Análises Clínicas pela colaboração e convivência durante este período.

À Elaine, Maria Rita, Cristiani pela amizade durante esses anos.

CAPES e FAPESP pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

1	LISTA DE ABREVIATURAS	12
2	RESUMO	14
3	ABSTRACT	15
4	INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	17
5	REVISÃO DA LITERATURA	20
5.1	- Amilóide Sérica A	20
5.2	- Células Mononucleares e ativação por LPS	23
5.3	- Receptores Toll-Like	25
5.4	- Óxido Nítrico	26
5.5	- Quimiocinas e Fatores de Crescimento	28
5.6	- Vias de Sinalização	30
6	OBJETIVOS	33
7	MATERIAL E MÉTODOS	35
7.1	- Reagentes.....	35
7.2	- Métodos	35
7.2.1	Isolamento de células mononucleares de sangue periférico humano	35
7.2.2	Cultura de células mononucleares para determinação de CCL20.....	36
7.2.3	Cultura de células mononucleares para extração de RNA	36
7.2.4	Células THP-1	37
7.2.5	Descongelamento de células THP-1	37
7.2.6	Congelamento de células THP-1	37
7.2.7	Cultura de THP-1 para ensaios de Western Blot	37
7.2.8	Animais.....	38
7.2.9	Administração de Concanalina A (Con A)	38
7.2.10	Obtenção de células de peritônio.....	38
7.2.11	Cultura de macrófagos de peritônio	39
7.2.12	Incubação de células mononucleares e macrófagos de peritônio com SAA e inibidores imidazólicos	39
7.2.13	Incubação de células mononucleares humanas com actinomicina D (ACTD) e ciclohexemida (CHX).....	40
7.2.14	Incubação de células mononucleares humanas com toxina pertussis e SAA	40
7.2.15	Tratamento de SAA e LPS com proteinase K e polimixina B	40
7.2.16	Remoção de endotoxina da SAA	40
7.2.17	Isolamento de RNA.....	41
7.2.18	Ensaio Protegido pela Ribonuclease (RPA).....	41
7.2.18.1	<i>Síntese da Sonda Radioativa</i>	41
7.2.18.2	<i>Preparação do RNA e hibridização</i>	42
7.2.18.3	<i>Tratamento com RNase</i>	43
7.2.19	Lise Celular.....	43
7.2.20	Western Blot	44
7.2.20.1	<i>Western Blot para ERK e ERK fosforilada</i>	44
7.2.20.2	<i>Western Blot para p38 total e p38 fosforilada</i>	44
7.2.20.3	<i>Western Blot para Tirosina quinase fosforilada</i>	45
7.2.20.4	<i>Western Blot para iNOS</i>	45

7.2.20.5	Western Blot para β -Actina	46
7.2.21	ELISA	46
2.1.1.1	Preparo da Placa	47
7.2.22	Determinação de Óxido Nítrico	48
7.2.23	Análise Estatística.....	48
8	RESULTADOS E DISCUSSÕES	50
8.1	- Efeitos da SAA na produção de NO em macrófagos peritoneais de camundongos	52
8.1.1	Resultados.....	52
8.1.1.1	Produção de NO induzida pela SAA por macrófagos de peritônio	52
8.1.1.2	Efeitos de anti-TNF- α na produção de NO induzida pela SAA	54
8.1.1.3	Produção de NO estimulada pela SAA em macrófagos primados com Concanavalina A (Con A).....	55
8.1.1.4	Envolvimento de alguns membros da via de sinalização das MAPKs na produção de NO e indução da iNOS promovida pela SAA em macrófagos.....	57
8.1.1.5	Participação do receptor Toll-like 4 na produção de NO induzida pela SAA	58
8.1.1.6	Produção de NO induzida pela SAA por macrófagos de camundongos deficientes em MyD88 ⁻	62
8.1.1.7	Determinação de endotoxina e purificação da SAA	63
8.1.1.8	LPS não induz produção de NO similar ao da SAA.....	65
8.1.1.9	Efeitos de Polimixina B e Proteinase K na produção de NO induzida pela SAA e LPS	67
8.1.2	Discussão	69
8.2	Efeitos da SAA na expressão e na liberação de CCL20 e expressão de fatores de crescimento por células mononucleares	77
8.2.1	Resultados.....	77
8.2.1.1	SAA induz a liberação de CCL20 por células mononucleares.....	77
8.2.1.2	Liberação de CCL20 induzida pela SAA é regulada a nível transcricional e translacional	80
8.2.1.3	Efeitos dos inibidores SB203580, PD98059 e toxina pertussis na expressão e liberação de CCL20 induzida pela SAA por células mononucleares	82
8.2.1.4	Expressão de M-CSF e VEGF induzida pela SAA	84
8.2.2	Discussão	86
8.3	Efeitos da SAA na fosforilação de proteínas tirosina quinases e MAPK	93
8.3.1	Resultados.....	93
8.3.1.1	Cinética de fosforilação de Tirosina Quinase e MAPK estimulada pela SAA e LPS em células THP-1	93
8.3.1.2	Efeitos da SAA na fosforilação das MAPK	98
8.3.2	Discussão	100
9	CONCLUSÕES.....	103
10	REFERÊNCIAS	10611
	ANEXOS.....	125
11.1	Anexo I - Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de Mestrado/Doutorado	125
11.2	Anexo II - Aprovação do Comitê de Ética FCF-USP	126
11.3	Anexo III – Aprovação do Comitê de Ética em Experimental Animal	127
11.4	Anexo IV - Ficha do Aluno	128
11.5	Anexo V - Curriculum Lattes.....	133
11.6	Anexo VI – Trabalhos	150

1 LISTA DE ABREVIATURAS

Células NK: célula *natural killer*

CLA-1: CD36 and LIMPII analogous-1 receptor

COX-2: ciclooxigenase-2

DDT: dithiothreitol

DMSO: dimetil sulfóxido

EDTA: ácido etileno diamino tetraacético

ELISA: Enzyme – Linked Immunosorbent Assay

e-NOS: óxido nítrico sintase endotelial

ERK: proteína regulada por sinais extracelulares

ERO: espécies reativas de oxigênio

fMLP: formil-metionil-leucil-phenilalanina

FPRL-1: receptor de baixa atividade ao fMLP like 1

G-CSF: fator estimulador de colônia de granulócitos

GM-CSF: fator estimulador de colônia de macrófagos e granulócitos

H4B: tetrahidrobiopterina

HDL: lipoproteína de alta densidade

HIF: fator induzido pela hipóxia

HRP: peroxidase de raiz forte

IFN- α : interferon-alfa

IFN- β : interferon-beta

IFN- γ : interferon-gama

IL-1: interleucina-1

IL-10: interleucina-10

IL-12: interleucina-12

IL-1ra: receptor antagonista para interleucina 1

IL-1 β : interleucina-1beta

IL-23: interleucina-23

IL-4: interleucina-4

IL-6: interleucina-6

IL-8: interleucina-8

iNOS: óxido nítrico sintase indutível

IRF: fator regulatório de interferon

JNK: c-jun N-terminal quinase
LCAT: lecitina colesterol acil transferase
LDL: lipoproteína de baixa densidade
Linfócitos Th1: linfócitos T helper 1
LPS: lipopolissacarídeo
MAPK. Proteínas quinases ativadas por mitógenos
M-CSF: fator estimulador de colônia de macrófagos
MyD88: fator de diferenciação mielóide 88
NF κ B: fator nuclear κ B
n-NOS: óxido nítrico sintase neuronal
NO: óxido nítrico
NOS: óxido nítrico sintases
PGE2: prostaglandina E2
PK: proteinase K
PKC: proteína quinase C
PMA: acetato de forbol miristato
Poly B: Polimixina B
RNOS: espécies reativas de nitrogênio
RPA: Ensaio Protegido pela Ribonuclease
SAA: amilóide sérica A
TLR: receptor *Toll-like*
TLR4: receptor *Toll-like -4*
TNF- α : fator de necrose tumoral-alfa
VEGF: fator de crescimento vascular endotelial

2 RESUMO

Nos últimos anos, nosso grupo de pesquisa vem descrevendo vários efeitos da SAA em células do sistema imune no que diz respeito à expressão e liberação de citocinas pró-inflamatórias. Neste estudo centramos nossa atenção na verificação dos efeitos da SAA sobre células mononucleares. Para isto, usamos três modelos experimentais. Em murinos, descrevemos a habilidade da SAA induzir a produção de NO por macrófagos peritoneais e, com uso de animais *knockout* para TLR4, sugerimos que SAA seja um ligante endógeno do TLR4. Em células mononucleares de sangue periférico humano, a SAA induz a expressão e liberação de CCL20, uma quimiocina importante na transição da resposta imune inata para adaptativa, bem como a expressão dos fatores M-CSF e VEGF. Em células THP-1, mostramos a cinética de fosforilação de proteínas tirosina quinases promovida pela SAA e comparamos com LPS, um estímulo pró-inflamatório clássico. Ainda em células THP-1 mostramos que a SAA induz a fosforilação de duas proteínas importantes no processo inflamatório por induzirem a ativação de NFκB; a p38 e a ERK1/2. Com este estudo contribuimos com o conhecimento a respeito do papel regulatório da SAA em células mononucleares. A ação da SAA sobre estas células torna-se importante, pois estas são cruciais na resposta imune inata e também atuam como células acessórias na resposta imune adaptativa. Desta forma, evidencia-se que, no processo de fase aguda, a expressão e a síntese de SAA resultam na modulação de etapas que controlam este processo e sua progressão.

Palavras-chaves: *Amilóide sérica A (SAA). Células mononucleares. Inflamação. Quimiocinas. Óxido nítrico (NO).*

Serum amyloid A: biological effects on mononuclear cells

3 ABSTRACT

In the past few years, our research group has described various effects of serum amyloid A (SAA) on cells of the immune system regarding the expression and release of pro-inflammatory cytokines. In this study we have focused on the effects of SAA on mononuclear cells. In order to do this, we have used three experimental models. In the murine experimental model, we described SAA's ability to induce the production of NO through peritoneal macrophages and, by using knockout animals for TLR4, we suggested that SAA is an endogenous agonist of TLR4. In mononuclear cells of peripheral human blood, SAA induced the expression and release of CCL20, an important chemokine in the transition from the innate to the adaptive immune response, as well as the expression of M-CSF and VEGF-factors. In THP-1 cells, we showed the phosphorylation kinetics of tyrosine protein kinases induced by SAA, and we compared it to LPS, a classic pro-inflammatory stimulus. We also demonstrated, in THP-1 cells, that SAA induced the phosphorylation of two proteins, namely p38 and ERK1/2, that are crucial in the inflammatory process because they induce the activation of transcription factors. With this study, we contributed to the knowledge of the regulatory role of SAA in mononuclear cells. Activity of SAA on these cells is highly important, for they are crucial in the innate immune response and act as accessory cells in the adaptive immune response. Hence it is evident that, in the acute phase process, the expression and synthesis of SAA result in the modulation of the phases that control this process and its progression.

Key words: Serum Amyloid A (SAA). Mononuclear cells. Inflammation. Chemokynes. Nitric oxide (NO).

Introdução

4 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A resposta inflamatória aguda se caracteriza por uma série de eventos locais e sistêmicos. Dentre os eventos locais incluem-se o acúmulo e ativação de células do sistema imune como leucócitos polimorfonucleares e mononucleares. A presença dessas células é importante para os eventos iniciais, bem como para a progressão e resolução do processo inflamatório. Em relação aos eventos sistêmicos, destaca-se o aumento da síntese das proteínas de fase aguda pelo fígado. Durante a resposta inflamatória, o aumento da concentração plasmática destas proteínas varia de 1.5 até 1000 vezes como é o caso da proteína C reativa e da amilóide sérica A (SAA).

A SAA é uma proteína altamente conservada entre as espécies, porém a sua função não é totalmente conhecida. Além disso, o que chama a atenção em relação à SAA é que as tentativas feitas até o momento para o desenvolvimento de animais *knockout* não foram bem sucedidas.

Inicialmente, imaginava-se que o principal papel da SAA durante a inflamação seria a sua influência sobre o metabolismo de colesterol. Entretanto, devido à coincidência temporal entre o aumento da concentração plasmática da SAA e a migração de células para o foco inflamatório, nosso grupo de pesquisa tem trabalhado com a hipótese de que um dos principais alvos para os efeitos biológicos da SAA seriam células do sistema imune. Assim, o nosso grupo de pesquisa descreveu algumas atividades imunomodulatórias da SAA como o aumento da expressão e liberação de citocinas pró-inflamatórias e do “pool” de espécies reativas de oxigênio (ERO) geradas por neutrófilos e células mononucleares (1, 2, 3, 4). Em adição, nosso grupo propõe que a ação da SAA sobre os neutrófilos seja um fator importante na progressão de doenças crônicas, por exemplo, diabetes (5). Através de estudos clínicos, nosso grupo mostrou que a SAA pode ser um excelente marcador diagnóstico para exsudatos (6) e processos inflamatórios em neonatos (7).

No sentido de ampliarmos o quadro de efeitos biológicos da SAA sobre células do sistema imune, neste estudo tivemos como objetivo reconhecer novas

atividades da SAA sobre células mononucleares, através da produção de NO, da expressão e da liberação da quimiocina, CCL20, da expressão de fator estimulador de colônia (M-CSF) e da expressão do fator de crescimento (VEGF). Além disso, observar se a produção de NO induzida pela SAA depende da ativação do receptor TLR4. Como não se conhece muito sobre vias de sinalização intracelular ativadas pela SAA temos também como objetivo reconhecer o perfil de fosforilação de proteínas tirosina quinases promovido pela SAA e comparar os padrões temporais de resposta desencadeados pela SAA com o lipopolissacarídeo (LPS), um estímulo inflamatório exógeno clássico. O reconhecimento de novas atividades da SAA é importante para o conhecimento do papel desta proteína na resposta de fase aguda, assim como na progressão do processo inflamatório que acompanha a maioria das doenças crônicas.

Revisão da Literatura

5 REVISÃO DA LITERATURA

5.1 - Amilóide Sérica A

As SAA são apolipoproteínas de 12 kDa encontradas na circulação em concentrações basais que variam de 1-10µg/mL. Durante processos inflamatórios seus valores aumentam cerca de 1000 vezes, podendo chegar a 1mg/mL (8). Há fortes indícios que a SAA desempenha uma importante função biológica, uma vez que é uma proteína altamente conservada, está presente em várias espécies de vertebrados e não há descrição de indivíduos deficientes nesta proteína (9).

Em humanos, os genes homólogos *SAA1* e *SAA2* codificam as proteínas *SAA1* e *SAA2*, as quais estão aumentadas durante a resposta de fase aguda. Enquanto que o gene *SAA4* codifica a proteína *SAA4*, a qual é expressa de forma constitutiva. O *SAA3* denominado de pseudogene não codifica RNA mensageiro ou proteína (9). Apesar da SAA ter sido seqüenciada em várias espécies, não há um número considerável de estudos referentes à sua estrutura. Sabe-se que a SAA apresenta uma região α -hélice na região amino terminal o que permite sua ligação com a HDL (8). Além da associação da SAA com a HDL ser uma forma de transporte da SAA, acredita-se que essa ligação seja importante para manter a SAA inativa durante o seu transporte pelo compartimento circulatório. Sabe-se que a SAA não associada à HDL atua como um potente estímulo para células inflamatórias, enquanto que o mesmo não acontece quando a proteína está associada à HDL (10). Desta forma, a HDL parece ser um transportador seguro da SAA para sítios específicos, por exemplo, o foco inflamatório.

A associação da SAA com a HDL leva o deslocamento da apolipoproteína AI e durante a resposta de fase aguda, a SAA, por estar elevada, passa a ser a apolipoproteína predominante da HDL, compondo 87% da fração protéica. Dentre as lipoproteínas, a HDL é aceptor preferencial da SAA, porém a SAA também pode ligar-se a outras lipoproteínas em menor grau de afinidade (11, 12).

A SAA é sintetizada principalmente pelo fígado na presença dos estímulos inflamatórios como TNF- α , IL-1 e IL-6 (9). Os fatores de transcrição envolvidos na

transcrição gênica da SAA são NFκB e C/EBP (13). Além disso, a indução da síntese da SAA pode ocorrer devido ao efeito sinérgico entre IL-1 e IL-6, os quais promovem a formação do complexo entre a STAT3 com a subunidade p65 do NFκB (14). Além do tecido hepático, a SAA pode também ser produzida por sítios extra-hepáticos como monócitos, adipócitos, microglia de pacientes com doença de Alzheimer, lesões ateroscleróticas entre outros (15 - 18).

Inicialmente, acreditava-se que os efeitos biológicos da SAA se restringiam à modulação do metabolismo de lípidos durante a inflamação. Nesta linha foi descrito que a SAA regula o papel da HDL no transporte reverso do colesterol pela modulação da LCAT (19), modula o efluxo de colesterol (20, 21) entre outros efeitos.

Nos últimos anos tem-se observado um avanço na descrição dos efeitos biológicos da SAA sobre diversos tipos celulares, principalmente sobre células do sistema imune. Como por exemplo, sua atividade quimiotática para monócitos, leucócitos polimorfonucleares, mastócitos e linfócitos T, em concentrações que são encontradas durante a resposta de fase aguda, e o aumento influxo de cálcio intracelular. Estas atividades se devem a associação da SAA a receptores acoplados à proteína G (22 - 25).

O nosso grupo de pesquisa também tem contribuído com a descrição dos efeitos da SAA sobre células do sistema imune. Neutrófilos e monócitos estimulados com SAA aumentam a expressão de RNA mensageiro e liberação de citocinas importantes para os eventos iniciais da resposta inflamatória, como TNF- α , IL-1 β , IL-1ra e IL-8 (1, 2, 3). A liberação de TNF- α promovida pela SAA, em neutrófilos, requer a participação de sinalizadores intracelulares como p38, ERK1/2, PI3K e da ativação de fator de transcrição, NFκB (3). Em neutrófilos, nosso grupo descreveu a atividade de *priming* da SAA na produção de ERO frente a partículas opsonizadas (4), e recentemente, foi mostrado que esta atividade da SAA induzir a produção de ERO é independente do receptor FPRL-1 (26).

Ainda, sobre suas atividades imunomodulatórias descreveu-se que a SAA induz: (i) a expressão e a liberação das citocinas IL-10, IL-12 e IL-23 (27, 28), (ii) a expressão da integrina (CD18/CD11b) (22), (iii) a liberação de metaloproteinase-9

(MMP-9) (29), (iv) a expressão de COX-2 e a PGE2 (30), (v) a inibição da apoptose de neutrófilos (31) e (vi) a liberação de *tissue factor* (32). Além disso, da mesma forma que a proteína C reativa, a SAA apresenta atividade de opsonina (33).

Acredita-se que a ação da SAA não esteja restrita somente a processos inflamatórios agudos, mas também a processos inflamatórios crônicos onde seus níveis plasmáticos estão permanentemente aumentados, porém inferiores àqueles encontrados durante uma resposta aguda. Sabe-se que há um aumento da expressão da SAA na aterosclerose e na artrite (34, 35). Nessa linha, o nosso grupo descreveu recentemente, que na presença da SAA, neutrófilos e monócitos de pacientes diabéticos aumentam a liberação de citocinas e migração quando comparados às células de indivíduos hígidos. Este aumento das atividades dos leucócitos e a acumulação destas células podem estar associados a complicações vasculares encontradas nestes pacientes (5). Além disso, adipócitos tem a habilidade de secretar mediadores pró-inflamatórios, incluindo a SAA (36). Como a obesidade é considerada um processo inflamatório crônico e acredita-se que a SAA possa ter um papel importante na inflamação local e sistêmica e na produção de ácidos graxos livres (37).

Além da busca pelo reconhecimento sobre os efeitos biológicos da SAA, tem-se investigado os receptores utilizados por esta proteína. Até momento foram descritos quatro receptores: (i) FPRL-1, um receptor transmembrana, associado à proteína G que apresenta baixa afinidade por fMLP e alta afinidade para lipoxina A4, e através desse receptor a SAA atua como quimiotática para células fagocíticas (23) e induz a produção de citocinas (38, 39) (ii) *Tanis*, um receptor expresso pelo fígado e regulado por concentrações de glicose, o qual a SAA é o ligante exclusivo (40), (iii) CLA-1, receptor *scavenger* de HDL expresso por monócitos, e através do qual a SAA promove liberação de IL-8 (41) e (iv) RAGE, receptor multiligante encontrado em células mononucleares, a sua ativação pela SAA está envolvida na indução da liberação de *tissue factor* (32) e na ativação de NFκB em sinoviócitos (42).

Além dos avanços na compreensão dos efeitos biológicos da SAA, através

de estudos clínicos, foi descrito que a SAA pode ser importante marcador para distinção de exudatos (6), inflamação em neonatos (7) e no prognóstico de doença coronariana (43).

5.2- Células Mononucleares e ativação por LPS

No sangue periférico de humanos as células mononucleares compreendem cerca de 70% de linfócitos e 30% de monócitos. Os monócitos circulam no sangue periférico em torno de 18 a 72 horas, após este período os monócitos migram para diferentes tecidos e se diferenciam em macrófagos teciduais (44). Dentre os fatores responsáveis pela sua diferenciação se destacam o fator estimulador de colônia de macrófagos (M-CSF) e o fator estimulador de colônia de granulócitos-macrófagos (GM-CSF) (45). Os macrófagos teciduais apresentam denominações de acordo com o local onde são encontrados, por exemplo, célula de Kupfer (fígado), macrófago alveolar (pulmão) e microglia (sistema nervoso central) (44).

As integrinas controlam a passagem dos monócitos do sangue através do endotélio, do interstício e do epitélio (44). Uma vez no tecido estas células diminuem a proliferação, porém é mantida ativa a síntese de RNA mensageiro e de proteínas (46). Embora os macrófagos possam morrer *in situ*, estes também podem migrar para os linfonodos para serem drenados. Existe a possibilidade dessas células voltarem para a corrente circulatória, e macrófagos derivados de monócitos podem se diferenciar em células dendríticas dependendo do estímulo encontrado no local, como a fagocitose e a presença de leucotrienos (47).

Os macrófagos têm um importante papel na defesa do hospedeiro. Estas células juntamente com os neutrófilos formam a primeira linha de defesa, assim se caracterizam como um importante componente da resposta imune inata. Além disso, os macrófagos atuam como moléculas acessórias na resposta imune adaptativa (44).

A ativação dos macrófagos é classificada em clássica e alternativa. A ativação clássica dos macrófagos depende de produtos provenientes da ativação

de células T helper 1 (Th1) e de *natural killer* (NK). Entre os produtos secretados por estas células, está o IFN- γ (44) e as citocinas IL-12 e IL-18. Por outro lado, a ativação alternativa dos macrófagos envolve a presença das citocinas IL-4 e IL-13, que são produtos de células T helper 2 (Th2) ativadas em reposta alérgica, celular e humoral frente a parasitas e patógenos extracelulares (48).

Um exemplo de ativação clássica de macrófagos é o que ocorre com o LPS. O LPS é um complexo glicolípido que faz parte da parede de bactérias gram-negativas. É composto de uma região hidrofílica e de uma região hidrofóbica, conhecida como lípido A (49).

O processo de ativação celular induzido pelo LPS se deve ao reconhecimento desta molécula pelo receptor de membrana TLR4. Para que o LPS ative este receptor é necessário que ocorra a interação do LPS com a proteína ligadora de LPS (LPB), seguida da interação do complexo LBP-LPS com o CD14, que pode estar ancorado a membrana ou solúvel, desta forma, formando um composto ternário que então será reconhecido pelo TLR4. Por fim, ocorre a transdução de sinal para o meio intracelular com o auxílio da proteína MD2, uma proteína específica para TLR4, seguida pela ativação de uma via dependente de MyD88 ou independente de MyD88 (50).

Monócitos/macrófagos ativados por LPS expressam e produzem vários mediadores inflamatórios, como prostanóides, leucotrienos, espécies reativas de oxigênio, NO, IL-1, IL-6, TNF- α e IFN- α/β . Esta ativação é seguida de uma resposta antiinflamatória pela indução da citocina antiinflamatória IL-10. Além disso, os macrófagos durante a ativação expressam moléculas de superfície celular do complexo de histocompatibilidade principal da classe II (MHC II), moléculas co-estimulatórias como o B7.1, receptores *scanveger* e receptores de manose. Este conjunto de efeitos desencadeados pelo LPS promove ações como fagocitose, endocitose e apresentação de antígenos, que contribuem para a disseminação de patógenos invasores (51). Entretanto, a produção excessiva e descontrolada destes efeitos pode levar a sérias complicações sistêmicas como a disfunção microvascular, o dano tecidual e o choque séptico (52).

5.3- Receptores Toll-Like

A descrição dos receptores *Toll-like* surgiu a partir da descoberta do receptor *Toll* feita em *Drosophila*, considerado um fator crucial para produção de peptídeos antimicrobianos e também para o desenvolvimento do inseto (53, 54). A partir desse achado, descobriu-se uma família de receptores homólogos em humanos, os quais foram denominados de receptores *Toll-like*. Estes receptores estariam envolvidos na ativação do NFκB e na expressão de genes controlados por este fator de transcrição (55). Até o momento foram descobertos em humanos 13 receptores *Toll-like* (56), que são expressos por uma grande variedade de tipos celulares, como os macrófagos e as células dendríticas (57).

A estrutura básica dos receptores *Toll-like* consiste em um domínio transmembrana, uma região extracelular constituída por seqüências repetidas de leucina, que permitem o reconhecimento de seus ligantes, e uma região intracelular, que apresenta homologia com o receptor de interleucina-1 (55).

A sinalização desencadeada pela ativação de receptores *Toll-like* depende do recrutamento de proteínas sinalizadoras, que são responsáveis pela transdução de sinal intracelular até a ativação de fatores de transcrição, como NFκB e membros da família de fatores regulatórios de interferon (IRF). As proteínas sinalizadoras envolvidas na ativação dos receptores *Toll-like* são: MyD88, MAL conhecida como TIRAP, TRIF, TRAM e SARM (58). O recrutamento dessas proteínas sinalizadoras pelos receptores é complexo e depende da natureza do estímulo e do receptor ativado, um exemplo disso é o que ocorre com o LPS.

A ativação celular induzida pelo LPS se deve ao reconhecimento desta molécula pelo receptor de membrana TLR4, seguido do recrutamento da proteína MD2, sendo que os eventos subseqüentes podem ser dependentes ou independentes de MyD88. A ativação dependente de MyD88 envolve a ativação de uma série de proteínas que culmina na translocação do NFκB e conseqüente produção de mediadores como TNF-α e IL-6, por exemplo (59). Por outro lado, a via independente de MyD88 tem o envolvimento da proteína sinalizadora TRIF e

ativação de IRF3 (60). Esta via leva a produção de mediadores pró-inflamatórios de forma mais lenta, como a produção de NO e de IP-10.

Além do TLR4, há outros receptores *Toll-like* que reconhecem diferentes tipos de moléculas específicas de bactérias, de fungos e de vírus. Para o reconhecimento de moléculas, os receptores *Toll-like* atuam na forma de homodímeros ou heterodímeros (61). De forma resumida segue uma lista de vários ligantes de origem bacteriana para os receptores *Toll-like*.

Receptor	Ligante
TLR1/2	Lipoproteína triacilada
TLR2	<i>Lipoteichoic acid</i> , zimozan, peptídeoglicano
TLR2/6	Lipoproteína diacilada
TLR4	Lipopolissacarídeo
TLR5	Flagelina
TLR9	Nucleotídeos (CpG)

Fonte: *Immunology and Cell Biology* (2007)85,411-419

Tabela 1: Lista de ligantes dos receptores *Toll-like*.

Além de reconhecer moléculas exógenas, os receptores *Toll-like* estão envolvidos também no reconhecimento de moléculas endógenas, sendo que grande parte das moléculas reconhecidas como ligantes endógenos desses receptores são produtos de injúria tecidual. Dentre os receptores que reconhecem estas moléculas está o TLR4. Até o momento, várias moléculas endógenas são agonistas de TLR4, como é caso de *heat shock proteins* 60 (HSP60), do ácido hialurônico, da HMGB1, do heparan sulfato e da fibronectina (62).

5.4- Óxido Nítrico

O NO é um radical livre sintetizado a partir da reação entre o aminoácido L-arginina e o oxigênio molecular, utilizando NADPH como doador de elétrons e o grupamento heme, FMN, FAD e a tetrahydrobiopterina (H₄B) como cofatores, numa reação que consome cinco elétrons (63). A reação consiste na conversão de L-arginina a NO e L-citrulina via um composto intermediário, N^w-hidroxila-L-arginina (64). A produção de NO é catalisada por um grupo de enzimas

denominadas NOS que podem ser diferenciadas em três isoformas: eNOS, iNOS e nNOS (65).

Embora essas três isoformas catalisam a mesma reação, elas diferem entre si na regulação, na amplitude e na duração da produção de NO. A eNOS e a nNOS são expressas de forma constitutiva nas células e reguladas pelo influxo de cálcio e da sua ligação a calmodulina. A quantidade de NO sintetizado pelas NOS constitutivas é pequena e ocorre de forma transiente. O NO produzido por estas enzimas reage com átomos de ferro no grupamento heme da guanilato ciclase, levando a produção de GMP cíclico, segundo mensageiro, que contribui para o relaxamento da musculatura lisa (66).

De forma diferente das outras isoformas, a expressão da iNOS é modulada por citocinas (por exemplo, IL-1, IFN- γ , TNF- α) e produtos bacterianos (por exemplo LPS) (67 - 69). A expressão desta isoforma enzimática se deve principalmente pela síntese *de novo* e pela estabilidade do RNA mensageiro (70 - 73).

Os fatores de transcrição que participam da ativação da expressão da iNOS são NF κ B, AP-1, STAT-1 α , IRF1 e outros (65). Dependendo da origem do estímulo, diferentes vias de sinalização estão envolvidas na expressão da iNOS. Além disso, a própria produção de NO regula a transcrição da iNOS, visto que baixas concentrações de NO ativam a translocação de NF κ B para o núcleo, e conseqüentemente, aumenta a expressão da iNOS. Da mesma forma, altas concentrações de NO inibem a sua própria produção, prevenindo assim que ocorra uma produção descontrolada de NO (74, 75).

As altas concentrações de NO produzidas pela ativação da iNOS estão associadas aos efeitos indiretos do NO. O NO, em condições anaeróbicas, é rapidamente oxidado formando espécies reativas de nitrogênio (RNOS) (76). As RNOS promovem a nitrosilação de grupamentos tióis na glutathiona e nas proteínas. A reação de nitrosilação inibe muitas proteínas e dentre elas se destacam as enzimas mitocondriais e os fatores de transcrição. Em altas concentrações, o NO pode reagir com ânion superóxido (O_2^-), gerando ânion peroxinitrito ($OONO^-$) que é altamente tóxico (77, 78).

O NO apresenta diversas atividades biológicas. Em concentrações fisiológicas, o NO atua como inibidor da agregação plaquetária, como agente vasodilatador e como neurotransmissor (66). Além disso, é reconhecido que NO exerce um importante papel no sistema imune. Isto se deve ao fato de que a produção de NO ocorre em um grande número de células que compõem este sistema, e devido a sua atividade citotóxica e citostática para patógenos e células tumorais (65). Essas ações são mediadas pela inibição de várias enzimas dentro da célula alvo, incluindo o complexo I e IV da cadeia respiratória das mitocôndrias (79, 80) e pela modificação do DNA (81). Adicionalmente, o NO apresenta uma atividade pró e anti-apoptótica. A atividade pró-apoptótica do NO se deve à ativação das caspases, por liberar o citocromo c mitocondrial para o citosol, por aumentar a expressão de p53 e alterar a expressão de proteínas associadas a apoptose, dentre as quais Bcl-2 e família Ho (82). A ação anti-apoptótica do NO se deve a mecanismos como a inibição das caspases via reação de nitrosilação (83).

5.5- Quimiocinas e Fatores de Crescimento

As quimiocinas representam uma família de proteínas de peso molecular entre 8 a 15 kDa, que se caracterizam pela síntese *de novo* por diversos tipos celulares frente a diferentes estímulos (84).

Dentre os efeitos das quimiocinas está o controle do recrutamento de leucócitos durante a homeostasia e a inflamação e a participação na transição da resposta imune inata para adaptativa. Sobre os efeitos no recrutamento de leucócitos, as quimiocinas atuam em duas etapas do processo. Na primeira etapa, as quimiocinas estão envolvidas no extravasamento de leucócitos do sangue para linfonodos e tecidos inflamados. Na segunda etapa, estas moléculas controlam a direção e posicionamento de leucócitos dentro de órgãos linfóides secundários e tecidos (85). Além destes efeitos, as quimiocinas exercem efeitos na angiogênese, na diferenciação celular e no crescimento e metástase de tumores (84).

Dentre as quimiocinas destaca-se a CCL20 que é objeto de nosso estudo.

CCL20 também é conhecida como proteína inflamatória de macrófago-3alfa (MIP-3 α), LARC ou *Exodus* (86). *In vivo*, a expressão de CCL20 é restrita a mucosa e tecido inflamado (86). *In vitro*, a CCL20 é expressa por células granulocíticas, monocíticas e linfócitos B e T frente a estímulos como PMA, ionomicina, TNF- α e LPS (87). Outros tipos celulares secretam de CCL20 como é o caso de células eritróides e células epiteliais de intestino (88). Além de estímulos inflamatórios, a CCL20 pode ser induzida pela a concanavalina A (89) e por condições de hipóxia (90).

A cinética de expressão de RNA mensageiro para CCL20 depende do tipo celular e do estímulo utilizado. Células HUVEC estimuladas com TNF- α , expressam CCL20 em 3 horas. Neutrófilos expressam RNA mensageiro para CCL20, em 3 horas de incubação, quando estimulados somente com LPS (91), e em 21 horas, quando estimulados com a combinação fMLP /LPS ou IFN- γ /LPS (92).

CCL20 tem como principal função recrutar células dendríticas imaturas e linfócitos T e B (87). Diferente de outras quimiocinas, CCL20 atua via ativação de um único receptor, o CCR6, o qual é expresso por células dendríticas imaturas e células T (93). Como as outras quimiocinas, a CCL20 também apresenta atividade microbicida para bactérias gram-negativas (94).

Além disso, a CCL20 é associada a certas doenças. No câncer de pâncreas, por exemplo, a sua expressão está envolvida na invasão das células tumorais pela indução de MMP-9 (95) e, recentemente, foi descrita que a presença de CCL20 é um dos elementos responsáveis pelo escape de células tumorais (96).

Além das citocinas, foi de nosso interesse avaliar o efeito de SAA sobre fatores estimuladores de colônia como M-CSF e o fator de crescimento VEGF.

O M-CSF também conhecido por CSF-1, além de ser importante para formação de monócitos a partir células pluripotentes, promove a diferenciação de monócitos em macrófagos, o aumento da produção de ânion superóxido, a fagocitose, a quimiotaxia e a produção de citocinas. (97). Adicionalmente, o M-

CSF pode amplificar ou diminuir algumas repostas do sistema imune. A amplificação da resposta imune via M-CSF se deve ao aumento da expressão de CD14, que contribui para o aumento da produção de citocinas na presença de LPS, enquanto que a diminuição da resposta se deve a inibição da expressão dos receptores TLR1, TLR2, TLR6 e TLR9 (98). O M-CSF está associado a doenças como aterosclerose, obesidade e câncer (99). Neste último caso, por exemplo, o M-CSF induz a expressão de VEGF via HIF, que leva o seu envolvimento na angiogênese de tumores sólidos (100).

VEGF é uma potente molécula vasoativa, angiogênica e moduladora da permeabilidade vascular (101). A sua expressão é modulada por citocinas, LPS, hormônios e hipóxia (102). Células mononucleares estimuladas com LPS, durante 4 horas, aumentam a expressão de RNA mensageiro para VEGF, sendo que parte deste aumento se deve ao efeito de LPS na estabilidade do RNA mensageiro (103, 104). Outras condições, como LDL oxidada incubada com macrófagos, promovem o aumento de expressão de VEGF em um intervalo de 24 a 48 horas (105). O VEGF atua tanto em condições fisiológicas quanto em patológicas. Em condições fisiológicas, o VEGF, em conjunto com a hipóxia, é responsável pela angiogênese no músculo esquelético, corpo lúteo e endométrio (106). Em condições patológicas, o VEGF está associado com o crescimento de tumores, o reparo tecidual e o retorno à homeostasia durante a inflamação, a neovascularização e o aumento da permeabilidade intra-ocular o que pode acarretar, por exemplo, o deslocamento de retina e outras complicações oculares, em pacientes diabéticos (102).

5.6- Vias de Sinalização

Em células eucarióticas, as vias de sinalização celular controlam uma variedade de processos como divisão, especialização, morte e metabolismo celular. Modificações pós-tradução, como por exemplo, a fosforilação de proteínas, é a base do que se denomina de transdução de sinais biológicos. Este processo dinâmico e reversível é controlado pela interação entre proteínas

quinases e fosfatases. Existem vários tipos de proteínas quinases envolvidas na transdução de sinal onde todos apresentam a mesma atividade catalítica, isto é, todas adicionam um grupamento fosfato a um aminoácido à proteína alvo. Há três grupos de proteínas quinases classificadas de acordo com os aminoácidos a serem fosforilados que são: (i) proteínas serina/treonina quinase; (ii) proteína tirosina quinase; e o outro grupo menos comum que apresenta capacidade de fosforilar tanto proteínas com resíduos serina/treonina como tirosina (107).

Entre as proteínas serina /treonina quinase estão os membros da via de sinalização conhecida como MAPK. Durante a ativação do sistema imune a via das MAPK está envolvida, por exemplo, na transdução de sinais intracelulares e a subsequente ativação NFκB, importante fator de transcrição para produção de mediadores inflamatórios, por exemplo, as citocinas (108).

A via de sinalização das MAPK é composta por três tipos de proteínas quinases: a quinase regulada por sinais extracelulares (ERK1/2), p38 e JNK. ERK1/2 é importante para o crescimento, desenvolvimento e sobrevivência celular. p38 e JNK estão envolvidas na mudança transcricional, síntese protéica, expressão de receptores de membrana e estrutura do citoesqueleto que vão levar à sobrevivência celular ou à apoptose (109).

As proteínas tirosina quinases encontram-se no citoplasma e podem se associar aos receptores de citocinas, além disso, fazem parte da estrutura de receptores de membrana para fatores de crescimento. Dentre os fatores de crescimento relacionados à atividade tirosina quinase estão EGF e VEGF (109).

A fosforilação de tirosina quinase é um mecanismo importante para transdução de sinal e regulação de uma variedade de processos fisiológicos de organismos multicelulares. Os processos regulados por este evento incluem a decisão de proliferação, diferenciação e morte celular (111).

Todas as células do sistema imune apresentam altos níveis de fosforilação em tirosina quinase e codificam muito mais genes para estas proteínas que outros tipos celulares. A fosforilação de tirosina quinase regula a ativação de linfócitos via ligação de antígeno e receptor, diferenciação celular induzida por citocinas, e também está envolvida na ativação de NFκB (111).

Objetivos

6 OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi reconhecer novas atividades da SAA em células mononucleares, tais como a produção de NO, expressão e liberação de quimiocinas, fatores estimulantes de colônias e fatores de crescimento. Também tivemos como objetivo reconhecer perfis de sinalização desencadeados pela SAA e compará-los com o lipopolissacarídeo (LPS), um estímulo exógeno clássico.

Diante disso, os nossos objetivos específicos foram:

- (i) Verificar a habilidade da SAA induzir a produção de NO em macrófagos de peritônio de camundongos da linhagem C57BL/6;
- (ii) Com uso de modelo murino identificar se a SAA é um ligante endógeno de TLR4, para isso foi utilizado camundongos das linhagens C3H/HeJ (deficiente natural de TLR4) que foram comparados com o controle C3H/HePas (TLR4 íntegro); C57BL/10ScCr (deleção do gene TLR4) que foi comparado com animais da linhagem C57BL/6 (TLR4 íntegro);
- (iii) Identificar se a proteína sinalizadora MyD88 está envolvida na produção de NO induzida pela SAA através de animais *knockout* em MyD88 (MyD88^{-/-}) e comparar com wild type (MyD88^{+/+});
- (iv) Verificar o efeito da SAA na cinética de expressão de RNA mensageiro para CCL20, M-CSF e VEGF em células mononucleares de sangue periférico humano;
- (v) Avaliar através de inibidores de MAPK e de toxina pertussis a cascata de sinalização e a ativação de receptores acoplados a proteína G, tipo Gi, na indução de CCL20 em células mononucleares;
- (vi) Definir o perfil e cinética de fosforilação de proteínas tirosina quinases promovido pela SAA em células monocíticas (THP-1) e comparar com LPS; e
- (vii) Avaliar a cinética de fosforilação de p38 e ERK1/2 promovida pela SAA em células THP-1.

Material e Métodos

7 MATERIAL E MÉTODOS

7.1 - Reagentes

Os reagentes ciclohexemida, dietilpirocarbonato (DEPEC), fenol saturado com Tris, Histopaque ® (d=1077), lipopolissacarídeo de E.coli sorotipo 026:B6, meio RPMI 1640 e Sigmacote (silicone) foram obtidos da Sigma Chemical Co (St Louis, MO). Proteinase K (PK), soro fetal bovino (FBS) e Trizol® foram obtidos da Invitrogen. Da empresa Merck (Darmstadt, Alemanha) foram obtidos álcool isopropílico, bicarbonato de sódio, cloreto de potássio, clorofórmio, fosfato de sódio dibásico, fosfato de potássio monobásico, e dimetilsulfóxido (DMSO). Actinomicina D, PD98059, SB203580 e Polimixina B (PMB) foram obtidos da Calbiochem-Novabiochem (La Jolla, CA). Estreptomicina: penicilina foi adquirida da GIBCO-Life Technologies. O Kit DuoSet para determinação por ELISA da quimiocina CCL20 foi adquirido da R&D (Minneapolis, USA). Recombinante humana da SAA foi adquirida da Pepro Tech Inc (Rocky Hill, NJ). Anticorpos anti-iNOS, anti-fosfotirosina (PY20) foram adquiridos da BD-transduction. RiboQuant™ Multi-Probe RNase Protection Assay System foram obtidos da Pharmingen (San Diego, CA). Da Cell Signaling foram obtidos os anticorpos anti-ERK1/2 fosforilada e total e p38 fosforilada e total. O radioativo fósforo (P^{32}) foi adquirido da Ge Healthcare (USA).

7.2- Métodos

7.2.1 Isolamento de células mononucleares de sangue periférico humano

As células mononucleares foram obtidas a partir de sangue periférico de indivíduos saudáveis recrutados entre professores, funcionários e alunos do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas/Universidade de São Paulo. Os voluntários foram esclarecidos sobre o projeto de pesquisa e deram consentimento formal para a participação no

estudo (CEP FCF-USP nº 224).

Após 8 horas de jejum, o sangue foi coletado em tubos com heparina (10UI/ml de sangue) e as células foram isoladas pelo método descrito por Boyum (112). O sangue foi diluído na proporção 1:1 com PBS 10mM, pH 7,4 (filtrado em Millipore de poro 0,22µm). A diluição foi colocada sobre 10mL de Histopaque®. O material foi centrifugado a 2500 rpm a temperatura ambiente por 20 minutos. Após a centrifugação foi recolhida a camada de células mononucleares. As células mononucleares (~ 30% monócitos e 70% linfócitos) passaram por processos de lavagem com PBS 10 mM, pH 7.4 em diferentes rotações (1800, 1500 (2X), 1200 rpm) por 10 minutos e foram ressuspensas em RPMI 1640. A contagem das células foi realizada em câmara de Neubauer.

7.2.2 Cultura de células mononucleares para determinação de CCL20

O meio de cultura utilizado foi RPMI 1640 modificado e suplementado com bicarbonato de sódio 2.0g/L, estreptomicina 100µg/mL, penicilina a100UI/mL e soro fetal bovino 10%. O meio foi filtrado em 0.22µm (Millipore) e acondicionado em frasco estéril. Todos os procedimentos foram realizados em fluxo laminar. Células mononucleares ($2,5 \times 10^5$ células/mL) foram estimuladas com SAA, na concentração determinada para cada tipo de ensaio, e mantidas em placas de fundo chato durante períodos desejados, em estufa com 5% de CO₂ a 37°C. Após o tempo de incubação placas foram centrifugadas a 500 g por 10 minutos a 4°C, o sobrenadante foi recolhido em *ependorfs* previamente identificados e congelado a -80°C até o momento da quantificação da citocina.

7.2.3 Cultura de células mononucleares para extração de RNA

O meio utilizado foi RPMI 1640 nas mesmas condições do item 7.2.2 As células mononucleares ($0,8 \times 10^7$ células/ mL) foram estimuladas com SAA (20 µg/mL) e mantidas em cultura durante 2, 4 e 12 horas. Ao final da incubação, o material foi centrifugado por 500g durante 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi

coletado e armazenado, para posteriores determinações de citocinas, e o *pellet* foi processado para extração de RNA.

7.2.4 Células THP-1

As células monocíticas leucêmicas foram doadas pelo Prof. Dr. Hugo Pequeno Monteiro do Departamento de Bioquímica/CINTERGEN – EPM/UNIFESP.

7.2.5 Descongelamento de células THP-1

As células inicialmente foram descongeladas parcialmente a 37°C e após foram ressuspensas em 10 mL de RPMI com 10% de soro. Para retirada do DMSO da solução, centrifugou-se a 1500 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente, desprezou-se o sobrenadante. Foram adicionados ao *pellet* celular 20 mL de RPMI com soro 10% e a seguir a solução contendo as células foi transferida para garrafas de 75 cm³ para expansão celular. Após o período de expansão foram feitas alíquotas para congelamento.

7.2.6 Congelamento de células THP-1

As células foram retiradas das garrafas e transferidas para tubo Falcon e centrifugadas a 1500 rpm por 15 minutos. Após, o *pellet* foi ressuspensado em solução de congelamento que continha DMSO 10%, FBS 50% e 40% de RPMI e transferiu-se 1 mL desta solução para *criotubos* que foram mantidos em -80°C por 16 horas. Após esse período os *vials* foram transferidos e mantidos em nitrogênio líquido para serem usados conforme o necessário.

7.2.7 Cultura de células THP-1 para ensaios de Western Blot

As células foram mantidas em garrafas de 75cm³ em atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C em meio RPMI suplementado com 10% de soro, estreptomicina e penicilina e o meio foi trocado a cada 2 dias. Para cultura, as células (1,0 x10⁶

células/mL) foram plaqueadas em placas de fundo chato e estimuladas com SAA (10 µg/mL) e LPS (10 µg/mL) e mantidas durante diferentes tempos.

7.2.8 Animais

Os camundongos (fêmeas) de 6 a 10 semanas foram fornecidos pelo Biotério de Camundongos Isogênicos do Departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (Protocolo nº103) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

As linhagens utilizadas neste estudo foram:

1. C57BL/6 (controle)
2. C3H/HeJ (mutação no receptor TLR4)
3. C3H/HePas (controle de TLR4)
4. C57BL/10ScCr (deleção do gene *TLR4*)
5. *MyD88*^{-/-} (*knockout* em *MyD88*)

7.2.9 Administração de Concanalina A (Con A)

Quando necessário os animais receberam via intraperitoneal 10 µg de Con A (diluída em 200 µl de PBS estéril) e o grupo controle recebeu 200 µL de PBS estéril. 48h após receberem o estímulo, os animais foram sacrificados.

7.2.10 Obtenção de células de peritônio

Os animais foram sacrificados de acordo com normas vigentes do Comitê de Ética em Experimentação Animal. Em seguida, a cavidade peritoneal foi lavada com 5 mL de PBS estéril. A suspensão celular foi obtida por aspiração com seringa e agulha e colocada em tubo de polipropileno de fundo curvo e mantida a 4°C até a realização dos ensaios.

Após a coleta, 90 µL da suspensão celular foram fixados e corados em 10 µL de uma solução contendo 0,5% de cristal violeta diluído em ácido acético 30%

e as células foram contadas em câmara de Neubauer. A suspensão celular teve seu volume ajustado para $2,0 \times 10^6$ células/mL e centrifugada a 1000 rpm a 4°C por 10 minutos. Em seguida, o *pellet* foi ressuspensionado em meio RPMI1640 suplementado com SFB 10%.

7.2.11 Cultura de macrófagos de peritônio

Células peritoneais foram ressuspensionadas em meio RPMI 1640 suplementado com 2mM de L-Glutamina, 23mM de L-asparagina, 0,1mM de ácido pirúvico, 1mM de ácido fólico, 1% de estreptomicina, 100U/mL de penicilina G e 5% de soro fetal bovino.

Foram plaqueados 100 μ L da suspensão celular ($2,0 \times 10^6$ células/mL) em placas de cultura de fundo chato de 96 poços e as células foram incubadas com estímulos a 37°C em atmosfera contendo 5% de CO₂. Após período de incubação o sobrenadante foi recolhido para posterior determinação de nitrito.

7.2.12 Incubação de células mononucleares e macrófagos de peritônio com SAA e inibidores imidazólicos

Os inibidores utilizados foram PD 98059 (inibidor de ERK1/2, 50 μ M) e SB 203580 (inibidor de p38 MAPK, 10 μ M). Para os ensaios com macrófagos de peritônio, as células foram pré-incubadas com os compostos imidazólicos durante 15 minutos, estimuladas com SAA (10 μ g/mL) e mantidas em cultura durante 24 horas. No final do período de incubação, o sobrenadante foi recolhido para determinação de NO e o *pellet* celular foi processado para detecção de iNOS através de *western blot*. Para os ensaios com células mononucleares humanas, as células passaram pelo mesmo processo de pré-incubação descrito acima, porém foi utilizado SAA na concentração 17 μ g/mL e mantidas em cultura durante 4 horas. Ao término do período de incubação, o sobrenadante foi recolhido para determinação de CCL20 e o *pellet* foi submetido ao processamento para extração de mRNA.

7.2.13 Incubação de células mononucleares humanas com actinomicina D (ACTD) e ciclohexemida (CHX)

Células mononucleares foram pré-incubadas com ACTD (10 µg/mL) e CHX (100 µM) durante 30 minutos. Ao final da pré-incubação as células foram estimuladas com SAA (17 µg/mL) e mantidas em cultura durante 12 horas. O sobrenadante foi coletado e armazenado a - 80°C para posteriores análises.

7.2.14 Incubação de células mononucleares humanas com toxina pertussis e SAA

Inicialmente, células mononucleares foram pré-incubadas com toxina pertussis (100 ng/mL) durante 15 minutos a 37°C. Em seguida, foram estimuladas com SAA (17 µg/mL) e mantidas em cultura durante 4 horas para extração de mRNA e determinação de CCL20 no sobrenadante.

7.2.15 Tratamento de SAA e LPS com proteinase K e polimixina B

SAA (10 µg/mL) e LPS (0,1 µg/mL) foram pré-incubadas com proteinase K (50 µg/mL) diluída em PBS contendo Ca⁺⁺ e Mg⁺⁺ ou polimixina B (25 µg/mL) diluída em PBS, por 45 minutos a 37°C. Ao término das incubações a solução com SAA e LPS foi adicionada à cultura de macrófagos e foram incubadas por 48 horas para determinação de NO.

7.2.16 Remoção de endotoxina da SAA

Para remoção de endotoxina da preparação de SAA utilizamos o método de separação por duas fases com Triton-X descrito por Aida e Pabst (113). Foi adicionado Triton X (1%) a solução de SAA que foi mantida a 4°C durante 30 minutos, com agitação a cada 5 minutos. Após este período, a solução foi incubada a 37°C durante 5 minutos. Ao final da incubação, a solução foi centrifugada a 1000 rpm por 5 minutos, para separação das fases, ficando na fase inferior a endotoxina ligada ao detergente e na superior a proteína. Após três

ciclos, foi realizado um gel de poliacrilamida 18%, para verificar concentração de proteína da SAA.

7.2.17 Isolamento de RNA

A extração de RNA foi realizada através do método de TRIzol[®], conforme protocolo descrito pelo fabricante. Para a avaliação da concentração e pureza do RNA total foram realizados ensaios espectrofotométricos (A260 e A260/280 nm, respectivamente). O *pellet* de RNA foi ressuspendido em água livre de RNase e estocado à -70°C até o momento da análise por RPA.

7.2.18 Ensaio Protegido pela Ribonuclease (RPA)

O ensaio protegido pela ribonuclease (RPA) é um método altamente sensível e específico para detecção de RNA mensageiro. A característica deste método é permitir a detecção de RNA mensageiro de diferentes componentes em uma mesma amostra. O princípio básico desta técnica consiste em sintetizar o RNA anti-sense, marcado com P^{32α}, pela T7 polimerase a partir da sonda (cDNA). A sonda sintetizada é colocada em contato com RNA alvo em excesso para hibridização em solução, depois desse período a sonda livre e as fitas simples de RNA remanescentes são digeridas com RNases. As duplas fitas de RNA (RNA-protegido) são purificadas e resolvidas em gel de poliacrilamida desnaturante e a imagem é detectada por *phospho-detector*.

Para execução desta técnica foi empregado um *template* de DNA para MIP-3α, IL-10, IL12p40, RANTES, G-CSG e VEGF. A partir do *template* foi sintetizada uma sonda marcada com P^{32α} de acordo com o protocolo descrito a seguir:

7.2.18.1 *Síntese da Sonda Radioativa*

Para síntese da sonda radioativa todos os reagentes foram descongelados no gelo exceto, a enzima RNA polimerase que foi mantida -20°C, e o radioativo UTP-P³² foi descongelado a temperatura ambiente.

Em *ependorf* de 1,5 ml foi colocado na seguinte ordem: 1 μ L de RNAsin; 1 μ L de *pool* de GACU; 2 μ L de DTT; 4 μ L de tampão de transcrição; 1 μ L de RNA *template*; 8 μ L de UTP; 2 μ L de RNA T7 polimerase; após a solução foi agitada e minifugada e mantida a 37°C por 1 hora.

Ao final deste período foi adicionado 2 μ L de DNase, e incubado novamente 30 minutos a 37 °C. Terminado o tempo de incubação foi adicionado: 26 μ L de EDTA 20 mM; 25 μ L de Tris saturado por fenol; 2 5 μ L de clorofórmio: álcool isoamílico (50:1); e 2 μ L de tRNA de hifas e centrifugado a temperatura ambiente por 5 minutos.

Seguido da centrifugação foi recolhida a fase aquosa e transferida para um novo *ependorf* e adicionado 50 μ L clorofórmio: álcool isoamílico (50:1), que foi centrifugada novamente por 2 minutos a temperatura ambiente. Após período de centrifugação, a fase aquosa foi transferida para outro tubo e, adicionado 50 μ L de acetato de amônia (4M); 250 μ L de etanol gelado (100%). O tubo foi agitado por inversão e incubado por 30 minutos a -70°C. Em seguida, foi centrifugado por 15 minutos a 4°C. Após este período o *pellet* foi lavado com 100 μ L de etanol gelado (90%) e centrifugado por 15 minutos a 4°C. O *pellet* foi seco a temperatura e ressuspendido em tampão de hibridização.

Para contagem das emissões β foi utilizado 1 μ L de solução para 5 mL do líquido de cintilação contadas em cintilador. Após a contagem segue-se para a próxima etapa.

7.2.18.2 *Preparação do RNA e hibridização*

Foram utilizados 8 μ g de RNA total de cada amostra o qual foi mantido em volume final de 2 μ L, 2 μ L de tRNA de hifas (controle negativo) e 2 μ L de controle positivo da sonda. Em seguida foram adicionados 8 μ L de tampão de hibridização e 2 μ L da sonda marcada. Após, foi adicionado óleo mineral para a incubação em banho seco a 56°C durante 16 horas.

7.2.18.3 *Tratamento com RNase*

Ao final da incubação a temperatura foi ajustada para 37°C e as amostras foram incubadas por 30 minutos. Em seguida estas foram tratadas com 100 µL de uma solução que continha tampão de RNase e RNase A + T1 e incubadas por 45 minutos a 30°C.

Ao término da incubação, para total digestão das RNase, as amostras foram tratadas com 18 µL de uma solução tampão contendo tampão de proteinase K, protease K e tRNA de hifas e incubadas por 15 minutos a 37°C. Após, foi adicionado 65µL de Tris: saturado por fenol e em seguida 65µL de clorofórmio: álcool isoamílico, homogeneizado e centrifugado por 5 minutos a temperatura ambiente. A fase aquosa foi transferida (100 a 120 µL) para tubos identificados e foi adicionado 120µL de acetato de amônia; 650µL de etanol gelado (100%). A seguir foi centrifugado por 20 minutos a 4°C, e o *pellet* proveniente foi lavado com etanol 90% e centrifugado por 5 minutos a 4°C. Após, foram adicionados 5µL de tampão de amostra 1x, colocadas no banho seco a 90°C por 3 minutos e transferidas imediatamente para gelo e aplicadas no gel.

7.2.19 Lise Celular

As células foram mantidas em cultura nas condições descritas no ítem 3.3.3 e após o período de incubação o sobrenadante foi descartado e o *pellet* celular foi lavado com PBS gelado e centrifugado (3000 rpm) durante 5 minutos a 4°C. Este procedimento foi realizado duas vezes. Em seguida, o *pellet* foi ressuscitado em 250 µL de tampão de lise A suplementado com inibidores de protease, fosfatase, serina e tirosina e incubados durante 1 hora, no gelo. Após este período o lisado foi centrifugado a 12000 rpm durante 10 minutos a 4°C para remoção de restos celulares. O material foi armazenado -80°C, para posterior dosagem de proteínas pelo método de Bradford.

7.2.20 Western Blot

As reações de *Western Blot* foram realizadas a partir de géis de poliacrilamida utilizando 40 µg de proteína por poço em diferentes concentrações de acordo com a proteína a ser estudada. O lisado de proteínas foi submetido à eletroforese em tampão de corrida a 250 volts e 8 mA durante a noite. A transferência foi realizada em membrana de nitrocelulose aplicando-se uma corrente de 200 mA por 2 horas, em cuba de transferência. A confirmação da transferência foi realizada incubando-se a membrana com *Ponceau S*. Em seguida, a membrana foi lavada com TBS-Tween (0,1%) durante 3 vezes de 15 minutos e bloqueada. A revelação foi realizada usando-se metodologia de quimiluminescência utilizando-se o luminol como substrato e a enzima peroxidase.

7.2.20.1 *Western Blot* para ERK e ERK fosforilada

As reações de *Western Blot* para ERK e ERK fosforilada foram realizadas a partir de géis de poliacrilamida a 12% e transferidos para membranas de nitrocelulose. O bloqueio foi realizado em TBS-Tween (0,1%) com 5% de leite, pH 7.6, durante a toda noite sob agitação a 4°C. Após este período a membrana foi lavada 3 vezes por 15 minutos com TBS-T (0,1%), e foi adicionado anticorpo primário anti-ERK (1:2000) ou anticorpo anti-ERK fosforilada (1:2000) diluído em TBS-Tween (0,1%) com 5% de BSA à membrana e mantida sob agitação, a 4°C, durante a noite. Após o período de incubação a membrana foi novamente lavada 3 vezes por 15 minutos, com TBS-T (0,1%) a temperatura ambiente. Em seguida, foi adicionado anticorpo secundário anti-IgG de coelho (1:3000) diluído em TBS-T (0,1%) à membrana e incubada durante 1 hora sob agitação a temperatura ambiente. Após a incubação, a membrana foi lavada 1 vez durante 15 minutos e 2 vezes durante 5 minutos com TBS-T (0,1%) e revelada.

7.2.20.2 *Western Blot* para p38 total e p38 fosforilada

As reações de *Western Blot* para p38 e p38 fosforilada foram realizadas a partir de géis de poliacrilamida a 12% transferidos para membranas de

nitrocelulose. O bloqueio foi realizado em TBS-Tween (0,1%) com 5% de leite, pH 7.6, durante a noite, sob agitação a 4°C. Após este período a membrana foi lavada 3 vezes durante 15 minutos com TBS-T (0,1%), e foi adicionado anticorpo primário anti-p38 (1:1000) ou anticorpo anti-p38 fosforilada (1:1000) diluído em TBS-Tween (0,1%) com 5% de BSA à membrana, que foi mantida sob agitação, durante a noite 4°C. Ao final da incubação, a membrana foi novamente lavada 3 vezes por 15 minutos com TBS-T (0,1%) a temperatura ambiente. Em seguida, foi adicionado anticorpo secundário anti-IgG de coelho (1:2000) diluído em TBS-T (0,1%) à membrana, que foi incubada durante 1 hora sob agitação a temperatura ambiente. Após a incubação a membrana foi lavada 4 vezes durante 15 minutos e 2 vezes com TBS-T (0,1%) e revelada.

7.2.20.3 *Western Blot para Tirosina quinase fosforilada*

As reações de Western Blot para tirosina quinase fosforilada foram realizadas a partir de géis de poliacrilamida de 12% e 8% para detecção de proteínas de baixo e alto peso molecular, respectivamente, e foram transferidos para membranas de nitrocelulose. O bloqueio foi realizado em TBS-Tween (0,1%) com 5% BSA, pH 7.6, durante 2 horas sob agitação e temperatura ambiente. Após este período, a membrana foi lavada 3 vezes por 15 minutos com TBS-T (0,1%), e foi adicionado anticorpo primário anti-ptyr (1:1000) diluído em TBS-Tween (0,1%) com 5% de BSA, pH 7.6 à membrana, e mantida sob agitação a 4°C, durante a noite. Após o período de incubação, a membrana foi novamente lavada 3 vezes por 15 minutos, com TBS-T (0,1%) a temperatura ambiente. Em seguida, foi adicionado anticorpo secundário anti-IgG de camundongo (1:2000) diluído em TBS-T (0,1%) à membrana e incubada durante 1 hora sob agitação a temperatura ambiente. Após a incubação a membrana foi lavada 1 vez por 15 minutos e 2 vezes por 5 minutos com TBS-T (0,1%) e revelada com sistema PIERCE.

7.2.20.4 *Western Blot para iNOS*

Os blots para iNOS foram realizados em gel de poliacrilamida 8% e

transferido para membrana de nitrocelulose. A membrana foi bloqueada por 2 horas em TBS-Tween (0,1%) com 5% de leite a temperatura ambiente. Em seguida, foi adicionado Ac primário (BD-Transduction) (1:1000) diluído em TBS-Tween com 5% de leite (0,1%) durante a noite a 4°C. Após este período a membrana foi lavada com TBS-Tween (0,1%) 3 vezes por 5 minutos a temperatura ambiente. Logo após, foi adicionada a membrana uma solução contendo anticorpo secundário (anti-rabbit) diluído 1:1000 em TBS-Tween (0,1%) e incubado sob agitação durante 1 hora em temperatura ambiente, seguida pela revelação pelo sistema PIERCE.

7.2.20.5 *Western Blot para β -Actina*

O blot foi realizado em gel de poliacrilamida 15% transferido para membrana de nitrocelulose. A membrana foi bloqueada durante 2 horas a temperatura ambiente em TBS-Tween (0,1%) com 5% de leite diluído, pH 7.5. Após, foi lavada 3 vezes por 5 minutos com TBS-Tween 0,1%, em seguida foi adicionado anticorpo β -actina diluído 1:5000 diluído em TBS-T com 5% de BSA pH 7.5, durante a noite a 4°C. Após a incubação, a membrana foi lavada 3 vezes por 5 minutos com TBS-Tween 0,1%, seguida da adição da incubação durante 1 hora com anticorpo-secundário diluído 1:4000 em TBS-T (0,1%) com 5% de BSA, pH 7.5. Ao término a membrana foi lavada 1 vez durante 15 minutos e 2 vezes durante 5 minutos com TBS-Tween 0,1%.

7.2.21 ELISA

As determinações de CCL20 foram feitas através de placas de ELISA montadas e padronizadas a partir do DuoSet da R&D. As placas usadas foram Polysorp (cod. 46957, Nuc-Immuno Module).

	Solução Estoque	Concentração de Uso
Anticorpo de captura	360 µg/mL	2 µg/mL
Anticorpo de detecção	9 µg/mL	50 ng/mL
Padrão	70 ng/mL	1 ng/mL

Tabela 2: Concentrações de anticorpos utilizados para ELISA.

Preparo da Placa

1. Anticorpo de captura foi diluído em PBS, na concentração final desejada. Foram colocados 100µL de anticorpo diluído por poço e a placa foi deixada em local escuro e a temperatura ambiente durante 20 horas.
2. Após o período de sensibilização, os poços foram aspirados e lavados com tampão de lavagem (0,05% Tween 20 em PBS, pH 7.4) por três vezes.
3. Os poços foram bloqueados com 300 uL de tampão de bloqueio (1% de BSA, 5% de sucrose, 0,05% de NaN₃ em PBS), durante 1 hora.

Procedimento de Dosagem

1. Os padrões foram diluídos em reagente diluente (0,1% de BSA, 0,05% de Tween 20 em tampão Tris-salina, pH 7,4) e quando necessário, as amostras foram diluídas no mesmo tampão.
2. Foram pipetados 100 µL de amostra e padrão por poço e incubados durante 2 horas a temperatura ambiente.
3. Após o término do tempo de incubação os poços foram lavados como descrito anteriormente.
4. Em seguida foram adicionados 100 µL de anticorpo de detecção diluído em tampão diluente em cada poço e incubado, novamente, por duas horas a temperatura ambiente.
5. As aspirações e as lavagens do passo 2 da preparação da preparação foram repetidas.
6. Foram adicionados 100 µL de estreptavidina-HRP (diluída 1:200 no reagente diluente), e a placa foi incubada 20 minutos a temperatura ambiente evitando luz direta.
7. As aspirações e as lavagens do passo 2 da preparação da preparação

foram repetidas.

8. Foram adicionados 100 μL de solução substrato em cada poço e a placa foi incubada durante 20 minutos a temperatura ambiente evitando luz direta. A solução substrato foi preparada diluindo o reagente colorido A (H_2O_2) e o reagente colorido B (tetrametilbenzadina) na proporção 1:1.
9. Para terminar a reação foram adicionados 50 μL da solução *stop* (H_2SO_4 2N) em cada poço e homogeneizado.
10. A densidade óptica dos poços foi determinada imediatamente a 450/550 nm.
11. Os resultados foram expressos através da construção de uma curva padrão linear com oito pontos de concentrações conhecidas.

7.2.22 Determinação de Óxido Nítrico

A determinação de NO foi realizada através da presença de nitrito no sobrenadante das culturas através da reação padrão de Griess. Para isso, foi utilizado o microensaio descrito por Ding (114). Foram utilizados 50 μL de sobrenadante de macrófagos de peritônio mantidos em cultura e adicionados 50 μL de reagente de Griess. Absorbância foi determinada em leitor de ELISA, com filtro de 550 nm, contra branco constituído de meio de cultura e reagente de Griess. Os resultados foram expressos em μM , com base em curva padrão de nitrato de sódio em meio de cultura.

7.2.23 Análise Estatística

Para análise dos efeitos da SAA foi utilizada ANOVA seguido de comparação múltipla de Student Newman Keuls.

Resultados e Discussões

8 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Visando o melhor entendimento do leitor, os resultados e respectivas discussões foram organizados em três capítulos.

- (i) Efeitos da SAA na produção de NO em macrófagos peritoneais de camundongos
- (ii) Efeitos da SAA na expressão e liberação de CCL20 e expressão de fatores de crescimento em células mononucleares
- (iii) Efeitos da SAA na fosforilação de proteínas tirosina quinases e MAPK

*Efeitos da SAA na produção de
NO em macrófagos peritoneais
de camundongos*

8.1 - Efeitos da SAA na produção de NO em macrófagos peritoneais de camundongos

Nesse capítulo mostraremos os efeitos da SAA na produção de NO por macrófagos peritoneais, bem como a apontaremos possível ligação da SAA ao receptor *Toll-like 4* na promoção da produção de NO.

8.1.1 Resultados

8.1.1.1 Produção de NO induzida pela SAA por macrófagos de peritônio

Para avaliar os efeitos da SAA sobre a produção de NO por macrófagos de peritônio, utilizamos a linhagem C57BL/6. Em um primeiro momento, investigamos o efeito de diferentes doses de SAA na produção de NO. Para isso, macrófagos peritoneais foram estimulados *in vitro* com SAA em diferentes concentrações (0,5 - 10 µg/mL) e mantidas em cultura durante 48 horas. A produção de NO foi determinada através da reação de Griess, pela presença de nitrito no sobrenadante da cultura de celular. Observamos que a produção de NO foi dependente da concentração de SAA (**Figura 1**). Vale ressaltar que concentrações de SAA inferiores a 0,5 µg/mL não induzem a produção de NO enquanto que concentrações superiores a 10 µg/mL, a produção de NO permanece inalterada.

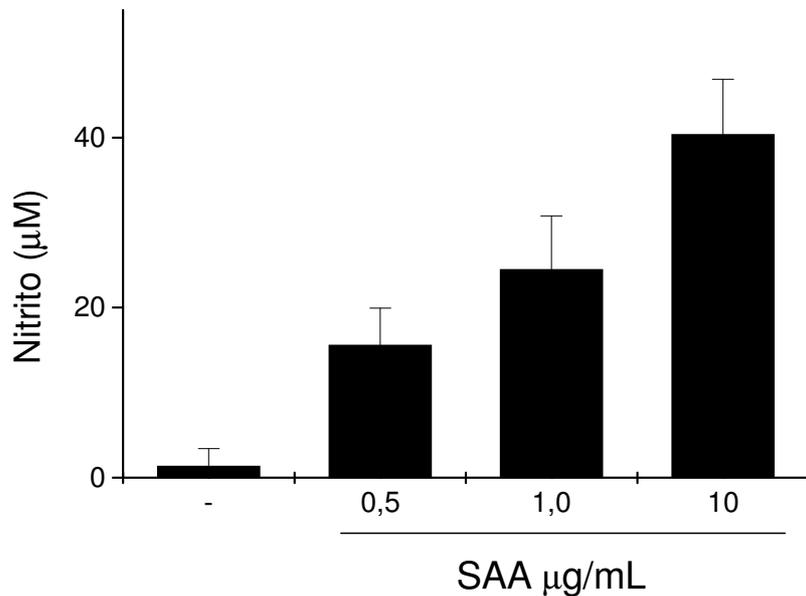


Figura 1: Efeito dose dependente de SAA na produção de NO por macrófagos. $2,0 \times 10^6$ células/mL foram estimuladas com SAA (0,5 -10 µg/mL) e mantidas em cultura durante 48 horas. Os dados representam a média e desvio padrão de quatro experimentos independentes realizados em duplicata ($r= 0,99$).

A seguir, avaliamos o efeito da SAA na produção de NO em diferentes tempos de incubação. Para os ensaios de cinética, utilizamos 10 µg/mL de SAA e verificamos os seus efeitos na produção de NO por macrófagos mantidos em cultura durante 24 e 48 horas. O que se observou foi um aumento da produção de NO nos dois tempos ensaiados em relação ao controle (**Figura 2**). Apesar da produção de NO promovida pela SAA ser maior em 48 horas de incubação, esta não foi diferente estatisticamente da produção de NO encontrada em 24 horas.

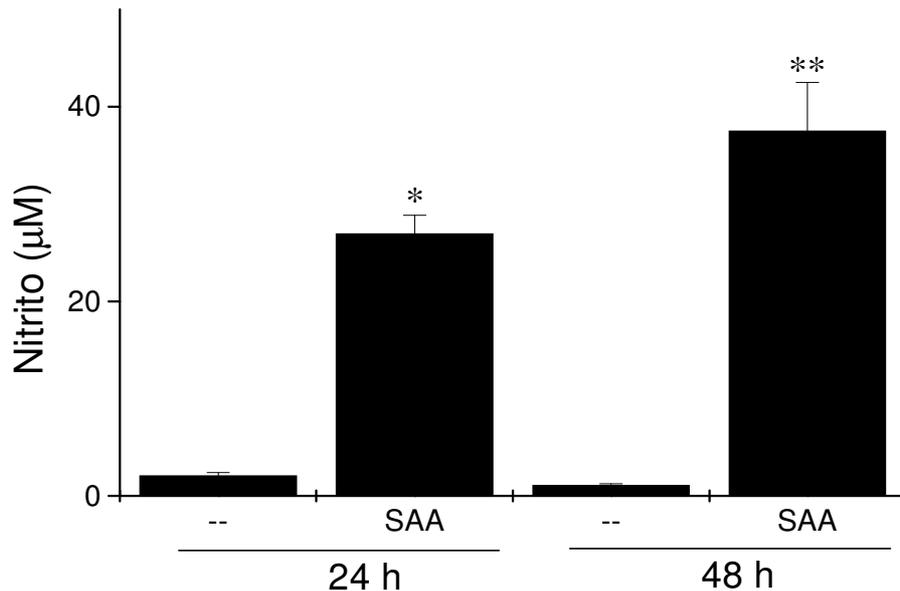


Figura 2: Efeito da SAA na produção de NO por macrófagos. $2,0 \times 10^6$ células/mL foram estimuladas com SAA (10 µg/mL) e mantidas em cultura durante 24 e 48 horas. Os dados representam a média e o desvio padrão de três experimentos independentes realizados em duplicata (* $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ vs. respectivo controle).

8.1.1.2 Efeitos de anti-TNF- α na produção de NO induzida pela SAA

Sabendo que a SAA induz a liberação de TNF- α por neutrófilos e células mononucleares (3), e que TNF- α está envolvido na produção de NO (65), verificamos se os efeitos promovidos pela SAA poderiam ser mediados por TNF- α . Para isto, macrófagos foram incubados com SAA e anti-TNF- α (5 µg/mL) e mantidos em cultura durante 48 horas. Evidenciamos que a presença de anti-TNF- α não inibiu de forma significativa a produção de NO induzida pela SAA, dado que esse efeito foi similar àquele promovido somente na presença de SAA (**Figura 3**). Esses dados nos sugerem que a produção de NO induzida pela SAA, possivelmente não seja mediado pela presença de TNF- α .

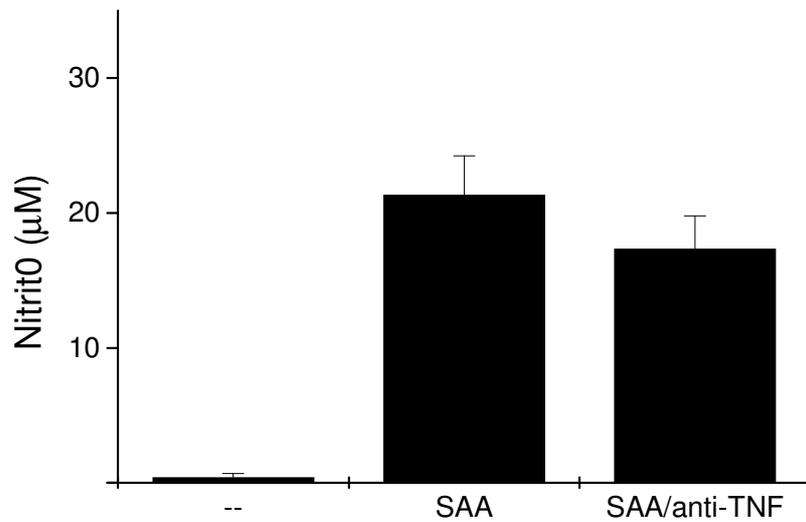


Figura 3: Efeitos de anti-TNF- α na produção de NO induzida pela SAA. $2,0 \times 10^6$ células/mL foram estimuladas com SAA ($10 \mu\text{g/mL}$) e anti-TNF- α ($5 \mu\text{g/mL}$) simultaneamente e mantidas em cultura durante 48 horas. Os dados representam a média e o desvio padrão de três experimentos independentes realizados em duplicata.

8.1.1.3 Produção de NO estimulada pela SAA em macrófagos primados com Concanavalina A (Con A)

Investigamos se os efeitos da SAA na produção de NO poderiam ser modificados em macrófagos primados com Con A em relação a macrófagos residentes. Con A é uma lectina e um potente ativador policlonal de linfócitos T. Além disso, há estudos que demonstraram que a injeção intraperitoneal de Con A em camundongos promove um aumento das atividades dos macrófagos como: (i) a adesão rápida de macrófagos na superfície de vidro e produção de peróxido de hidrogênio (115) e (ii) o aumento do conteúdo e atividade de mieloperoxidase e do aumento da produção de ácido hipocloroso (116, 117).

Inicialmente, os camundongos receberam $10\mu\text{g}$ de Con A, via intraperitoneal, 48 horas antes do experimento. Ao final deste período, as células

foram coletadas e estimuladas *in vitro* com SAA (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e mantidas em cultura durante 48 horas. Observamos que a SAA induziu a produção NO tanto em macrófagos residentes quanto em macrófagos primados *in vivo* com Con A (**Figura 4**). Entretanto, quando comparamos a produção de NO induzida pela SAA em células residentes e células primadas com Con A, evidenciamos que a produção de NO induzida pela SAA é maior em células primadas com Con A em relação a macrófagos residentes (**Figura 4**).

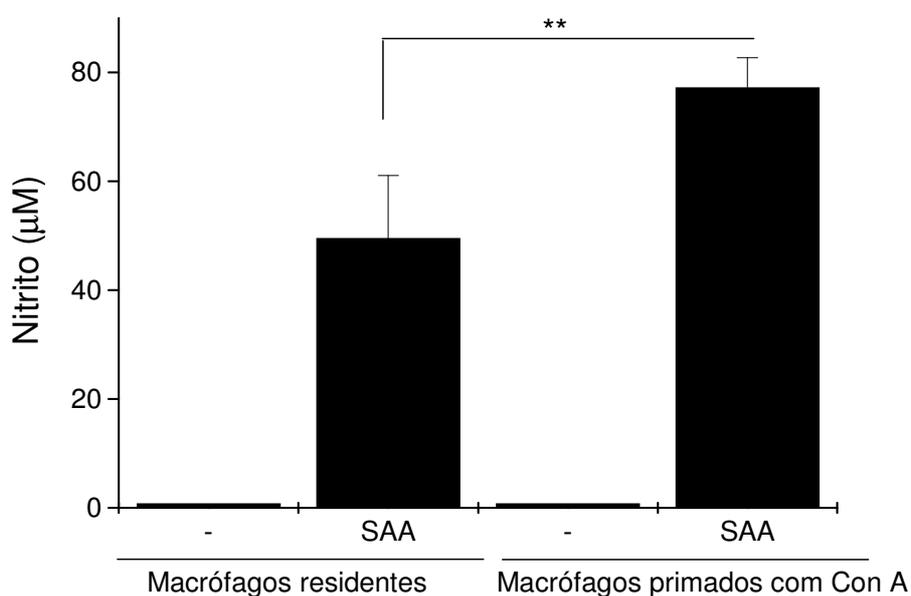


Figura 4: Efeitos da SAA na produção de NO em macrófagos primados com Con A. Animais receberam 10 μg de Con A (via intraperitoneal), após 48 horas, os macrófagos foram coletados e estimulados *in vitro* com SAA (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e mantidos em cultura durante 48 horas. Os dados representam a média e desvio padrão de três experimentos independentes realizados em duplicata (** $p < 0,01$).

8.1.1.4 Envolvimento de alguns membros da via de sinalização das MAPKs na produção de NO e indução da iNOS promovida pela SAA em macrófagos

A via das MAPKs é uma das vias utilizadas por estímulos pró-inflamatórios, a qual é representada por três membros, p38, ERK1/2 e JNK. Neste estudo, investigamos se p38 e ERK1/2 estão envolvidos na produção de NO induzida pela SAA. Inicialmente, macrófagos foram pré-incubados com SB203580 (10 μ M), inibidor de ERK1/2, e PD98059 (50 μ M), inibidor de p38, durante 15 minutos. Após as células foram estimuladas com SAA (10 μ g/mL) e incubadas durante 24 horas. No sobrenadante foi determinada a produção de NO e o *pellet* foi submetido à lise celular para ensaios de *Western blot* para detecção da iNOS. Observamos que na condição ensaiada a SAA induz produção de NO e a expressão da iNOS, enquanto que a presença dos inibidores PD e SB inibiu a produção de NO (**Figura 5**) como a expressão da iNOS induzida pela SAA (**Figura 6**). Sendo que PD foi mais eficiente na inibição quando comparado com SB. A viabilidade celular não foi afetada na presença dos inibidores, de acordo com o teste azul de *Trypan* (dado não mostrado).

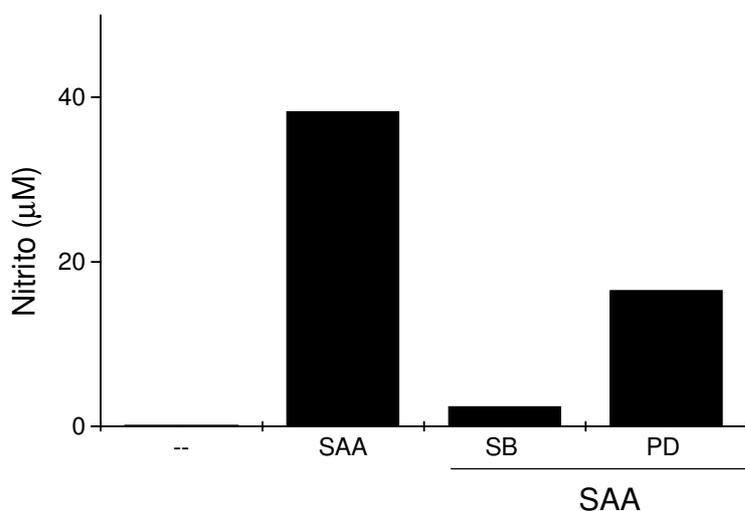


Figura 5: Efeitos dos inibidores imidazólicos na produção de NO promovida pela

SAA. $2,0 \times 10^6$ células/mL foram pré-incubadas com SB203580 (10 μ M) e PD98059 (50 μ M) durante 15 minutos. No final da pré-incubação as células foram estimuladas com SAA (10 μ g/mL) e mantidas em cultura durante 24 horas. Os dados são representativos de três experimentos.

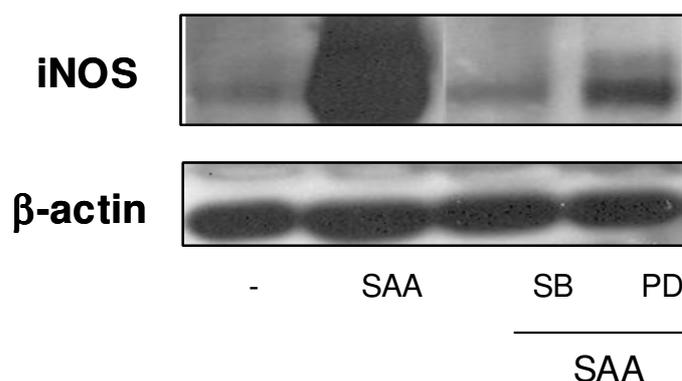


Figura 6: Efeitos de inibidores imidazólicos na expressão da iNOS induzida pela SAA. $2,0 \times 10^6$ células/mL foram pré-incubadas com SB203580 (10 μ M) e PD98059 (50 μ M) durante 15 minutos, e depois estimuladas com SAA (10 μ g/mL e incubadas durante 24 horas. Os dados são representativos de três experimentos.

8.1.1.5 Participação do receptor Toll-like 4 na produção de NO induzida pela SAA

Dado que há uma série de proteínas endógenas que atuam via ativação de TLR4 (62), neste estudo, verificamos se a SAA poderia ser um ligante endógeno do TLR4. Para avaliar esta possibilidade foram utilizadas duas linhagens de camundongos. Uma foi a C3H/HeJ (HeJ) que durante uma mutação espontânea, houve a troca dos aminoácidos prolina por histidina na posição 712 da proteína TLR4, tornando-a menos sensível ao LPS (118). Os resultados obtidos com HeJ foram comparados com a linhagem controle C3H/HePas (TLR4 íntegro). A outra linhagem estudada foi a C57BL/10ScCr (TLR4^{-/-}), que apresenta deleção do gene que codifica o TLR4 (118). Os resultados obtidos com esta linhagem foram comparados com os da linhagem C57BL/6 (TLR4^{+/+}). A produção de NO e de

TNF- α foram determinadas no sobrenadante das culturas celulares de macrófagos estimulados *in vitro* com SAA (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Nas condições ensaiadas, observamos uma drástica redução na produção de NO induzida pela SAA por macrófagos de camundongos HeJ (**Figura 7**) como de TLR4^{-/-} (**Figura 8**) quando comparado com as respectivas linhagens controle.

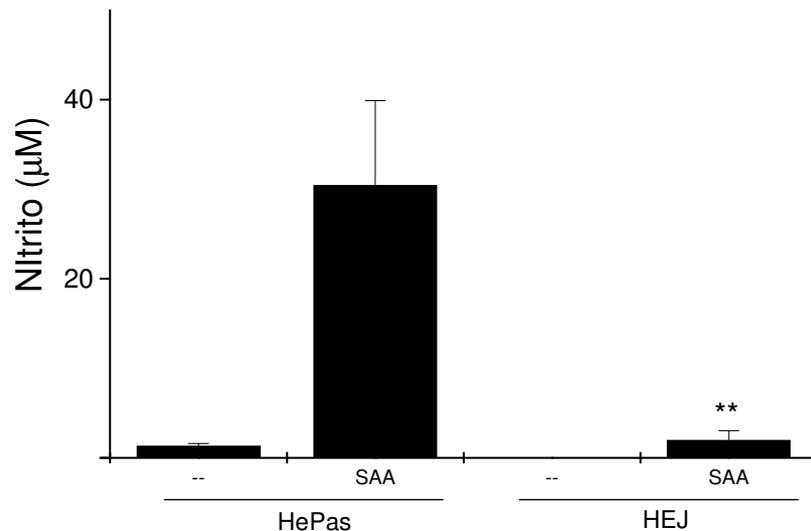


Figura 7: Efeito da SAA na produção de NO por macrófagos peritoneais das linhagens C3H/HePas e C3H/HeJ. $2,0 \times 10^6$ células/mL foram estimuladas com SAA (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e mantidas em cultura durante 48 horas. Os dados representam a média e desvio padrão de três experimentos independentes realizados em duplicata (** $p < 0,01$ vs. produção de NO induzida pela SAA por M ϕ HePas).

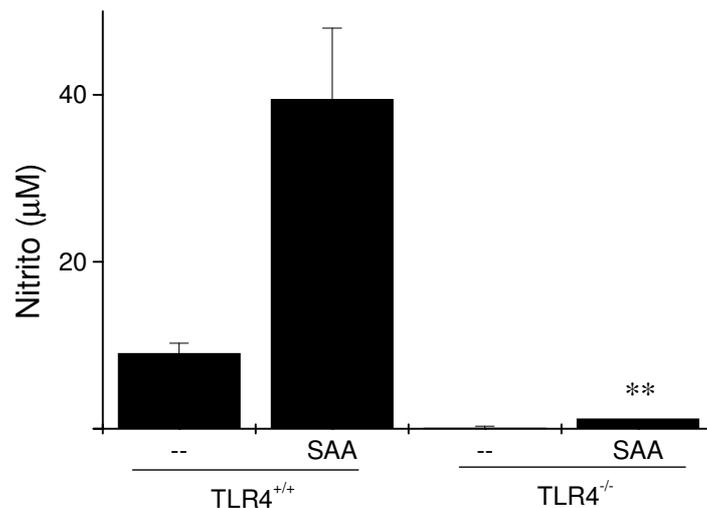


Figura 8: Efeito da SAA na produção de NO por macrófagos peritoneais das linhagens TLR4^{+/+} (C57BL/6) e TLR4^{-/-} (C57BL/10ScCr). $2,0 \times 10^6$ células/mL foram estimuladas com SAA (10 µg/mL) e mantidas em cultura durante 48 horas. Os dados representam a média e desvio padrão de três experimentos independentes realizados em duplicata (** $p < 0,01$ vs. produção de NO induzida pela SAA por Mφ TLR4^{+/+}).

Com relação a liberação de TNF- α , observa-se que esta também está diminuída nas linhagens deficientes em TLR4, quando comparada com a liberação de TNF- α induzida pela SAA nas respectivas linhagens controle (**Figuras 9 e 10**).

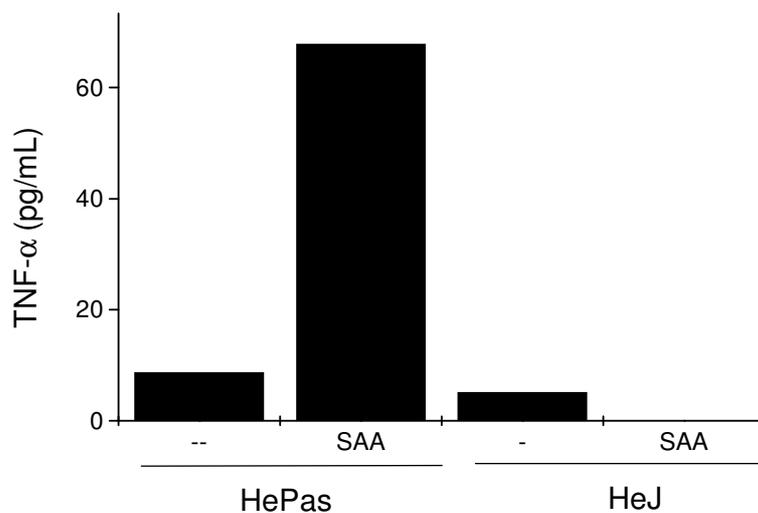


Figura 9: Efeito da SAA na produção TNF- α por macrófagos peritoneais das linhagens C3H/HePas e C3H/HeJ. $2,0 \times 10^6$ células/mL foram estimuladas com SAA ($10 \mu\text{g/mL}$) e mantidas em cultura durante 24 horas. Os dados são representativos de três experimentos independentes.

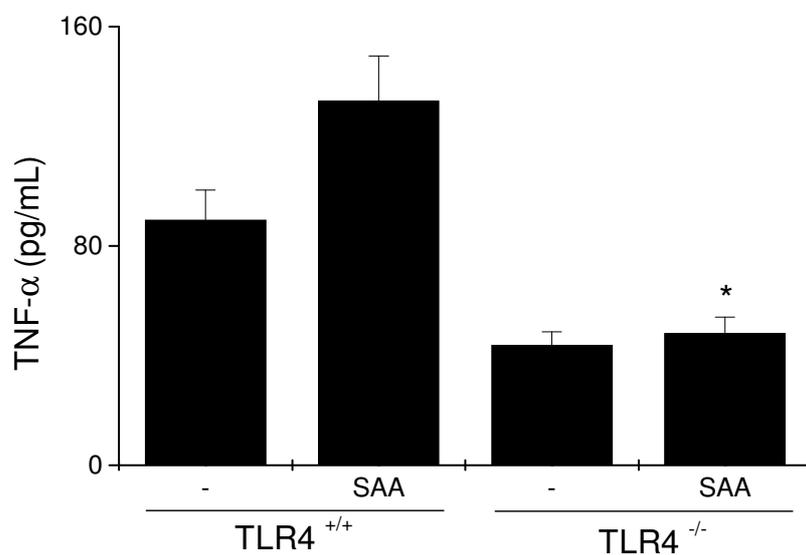


FIGURA 10: Efeitos da SAA na liberação de TNF- α por macrófagos peritoneais das linhagens TLR4^{+/+} (C57BL/6) e TLR4^{-/-} (C57BL/10ScCr). $2,0 \times 10^6$ células/mL

foram estimuladas com SAA (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e mantidas em cultura durante 24 horas. Os dados representam a média e desvio padrão de três experimentos independentes realizados em duplicata (* $p < 0,05$ vs. produção de NO induzida pela SAA em M ϕ TLR4^{+/+}).

8.1.1.6 Produção de NO induzida pela SAA por macrófagos de camundongos deficientes em MyD88⁻

A proteína sinalizadora MyD88 é uma das proteínas usadas para a transdução de sinal após a ativação de receptores *Toll-like* (58). Uma vez que os resultados obtidos com as linhagens deficientes em TLR4 nos indicaram que a SAA pode ser um ligante endógeno do TLR4, verificamos se haveria a participação da proteína sinalizadora MyD88 na produção de NO induzida pela SAA. Para avaliar tal hipótese, utilizamos macrófagos provenientes de animais MyD88^{-/-} (*Knockout* em MyD88) e de MyD88^{+/+} (C57BL/6). Observamos que a produção de NO induzida pela SAA em macrófagos de camundongos MyD88^{-/-} foi similar àquela encontrada em macrófagos de camundongos MyD88^{+/+} (**Figura 11**). Tais resultados sugerem que a produção de NO induzida pela SAA independe da presença da proteína MyD88.

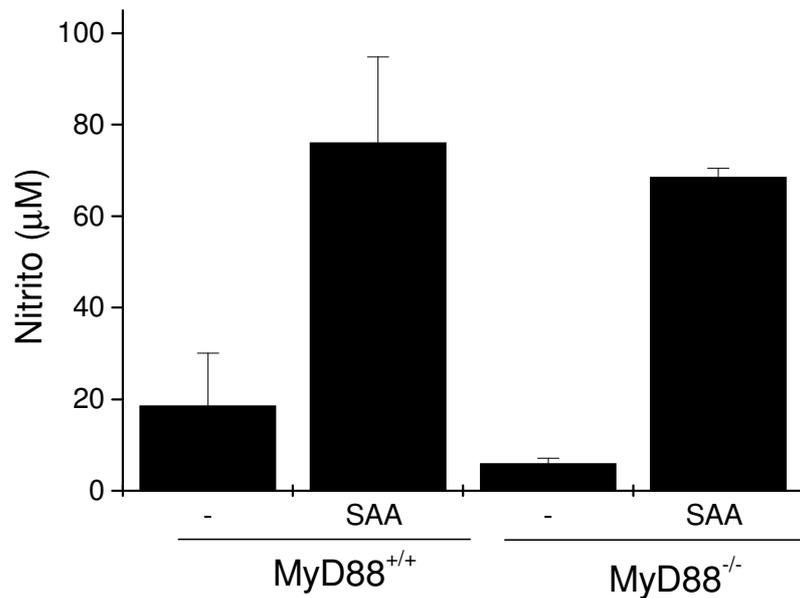


Figura 11: Produção de NO induzido pela SAA em macrófagos peritoneais de camundongos *MyD88^{+/+}* (WT) e *MyD88^{-/-}* (KO). $2,0 \times 10^6$ células/mL foram estimuladas com SAA (10 µg/mL) e mantidas em cultura durante 48 horas. Os dados representam a média e desvio padrão de três experimentos independentes realizados em duplicata.

8.1.1.7 Determinação de endotoxina e purificação da SAA

Uma vez que temos fortes indicativos que a SAA seja um ligante endógeno do receptor *Toll-like 4* e como a SAA é uma proteína recombinante produzida em *E. coli*, o próximo passo foi investigar se os efeitos da SAA poderiam ser devido a presença de endotoxina contaminante. Apesar do fornecedor nos informar que a SAA teria quantidade de endotoxina inferior a 1ng/µg de proteína, optamos em certificar a real quantidade de endotoxina presente em nossa preparação de SAA. Assim, realizamos o teste do *Limulus Amebocyte Lysate* (LAL), um teste padrão para determinação de endotoxina.

A determinação de endotoxina foi realizada em 10 µg de SAA, 1 ng/mL de

LPS, controle de endotoxina, e além disso, utilizamos a IDO, uma enzima recombinante produzida em nosso laboratório, como controle de molécula recombinante que não passou por nenhum processo de purificação. Através do teste de LAL verificamos que a SAA, o LPS e a IDO apresentaram uma atividade de endotoxina de 3,6, 5 e 421 UE/mL, respectivamente.

O próximo passo foi submeter a SAA e a IDO por um processo de purificação. O método escolhido foi o de separação por duas fases com Triton-X, utilizado para purificação de proteínas recombinantes. O princípio do método consiste na ligação da endotoxina presente na amostra ao detergente. Após três ciclos de purificação com o detergente, através de gel de poliacrilamida, observamos uma perda drástica na quantidade da proteína de SAA purificada quando comparada a SAA que não passou pelo processo de purificação (**Figura 12**). Em seguida, foi realizado novamente o teste de LAL. Verificamos que a preparação de SAA passou a conter uma atividade de endotoxina superior a da inicial, por volta de 221 UE/mL em 10 µL de amostra. Por outro lado, o método se mostrou eficiente para remoção de endotoxina da IDO, pois a preparação de IDO passou a ter uma atividade de endotoxina de 0,5 UE/mL. Sabe-se também que este processo foi eficiente para remoção de endotoxina de preparações de ovalbumina comercial.

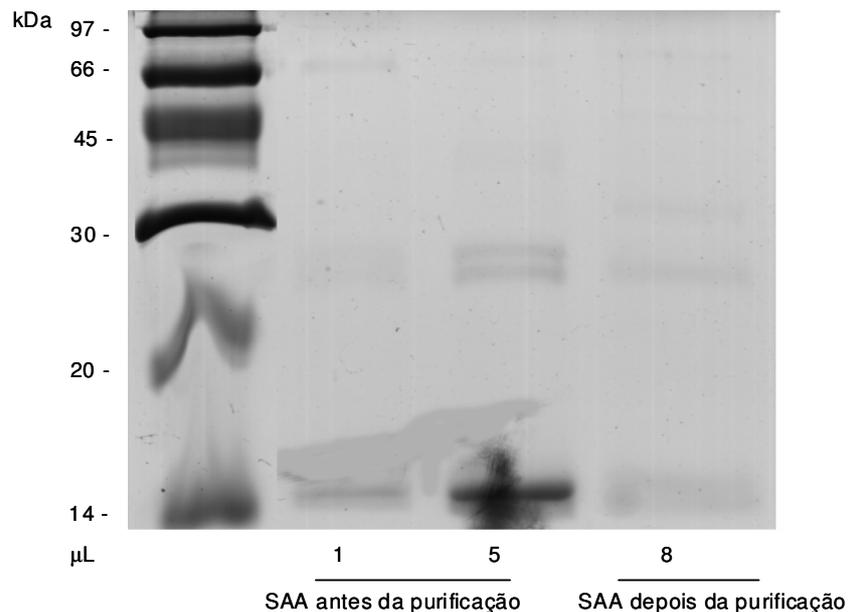


Figura 12: Gel de poliacrilamida da SAA antes da purificação e depois da purificação pelo método de separação por duas fases com Triton-X. Foram utilizados 1 e 5 μL de SAA antes da purificação, que correspondem a 1 e 5 μg , e 8 μL de SAA depois de purificação.

8.1.1.8 LPS não induz produção de NO similar ao da SAA

Uma vez que houve perda da proteína de SAA, o que impossibilitou o seu teste, assim, utilizamos outras estratégias para excluir a participação de endotoxina contaminante nos efeitos promovidos pela SAA. Uma delas foi uso de diferentes concentrações de LPS de *E.coli*, padrão de endotoxina, com as quais monitoramos a produção de NO e comparamos com a produção de NO induzida pela SAA em concentrações diferentes. As concentrações de LPS empregadas foram 0,1, 1 e 10 ng/mL, que correspondem 0,5, 5 e 50 UE/mL. As concentrações de SAA utilizadas nestes experimentos foram 1 e 10 $\mu\text{g/mL}$, que correspondem a uma atividade de endotoxina de 0,36 e 3,6 UE/mL. Observamos que o LPS nas concentrações empregadas não induziu produção de NO semelhante àquela

induzida pela SAA (**Figura 13**). É importante salientar que a produção de NO induzida pela SAA foi sempre superior ao do LPS.

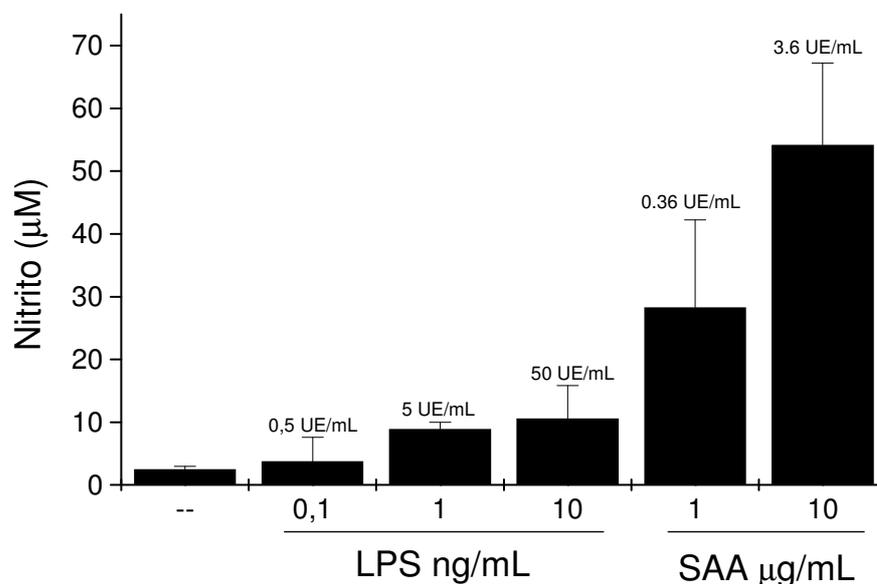


Figura 13: Efeitos da SAA e LPS na produção de NO. $2,0 \times 10^6$ células/mL foram estimuladas com LPS nas concentrações acima mostradas e com SAA nas concentrações de 1 e 10 µg/mL e mantidas em cultura durante 48. Os dados representam a média e desvio padrão de três experimentos realizados em duplicata.

Além disso, verificamos se havia um sinergismo entre SAA e LPS. As células foram estimuladas com SAA (1 µg/mL) + LPS nas concentrações de 0,1, 1 e 10 ng/mL. Nas condições ensaiadas, constatamos que não houve aumento da produção de NO na presença dos dois estímulos (**Figura 14**). Tal achado nos indica possivelmente que não há efeito sinérgico entre SAA e LPS.

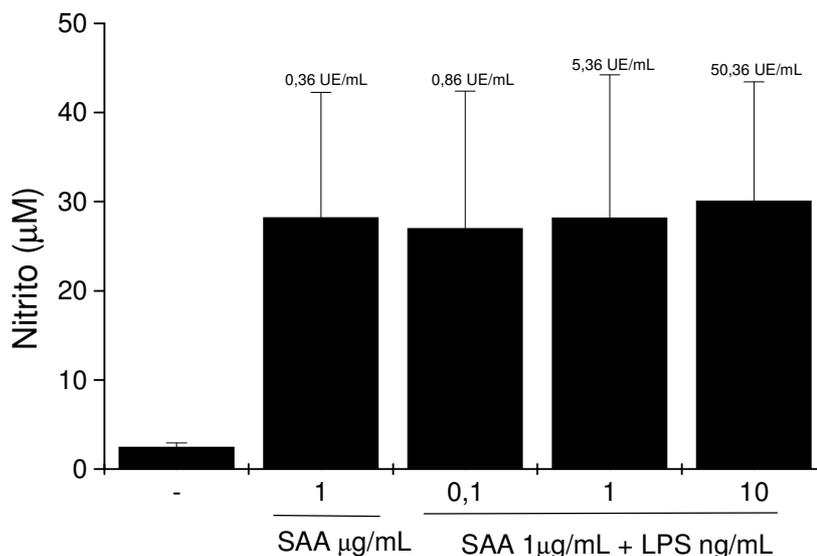


Figura 14: Efeitos da SAA + LPS na produção de NO. $2,0 \times 10^6$ células/mL foram estimuladas com SAA (1 µg/mL) + LPS nas concentrações de 0,1, 1 e 10 ng/mL e mantidas em cultura durante 48 horas. Os dados representam a média e desvio padrão de três experimentos realizados em duplicata.

8.1.1.9 Efeitos de Polimixina B e Proteinase K na produção de NO induzida pela SAA e LPS

Outra estratégia utilizada foi o pré-tratamento da SAA com polimixina B (Poly B), um lipopeptídeo cíclico que se liga de forma estequiométrica ao lípide A do LPS e bloqueia seus efeitos (119), e com proteinase K (PK), uma serina-protease que cliva ligações peptídicas em sítios carboxílicos de aminoácidos (120). Em paralelo foram realizados experimentos com LPS, como controle positivo. Evidenciamos que o pré-tratamento com Poly B não alterou produção de NO promovida pela SAA (**Figura 15A**). Entretanto, o pré-tratamento de LPS com Poly B, promoveu uma diminuição drástica da produção de NO quando comparada com ausência do pré-tratamento (**Figura 15B**). O tratamento com PK, no entanto diminuiu a produção de NO induzida pela SAA em relação os seus

efeitos sem tratamento (**Figura 15C**). Por outro lado, o tratamento com PK não interferiu na produção de NO induzida pelo LPS quando comparada a do LPS sem tratamento (**Figura 15D**). Tais resultados indicam mais uma vez que os efeitos promovidos pela SAA não é devido à presença de endotoxina contaminante.

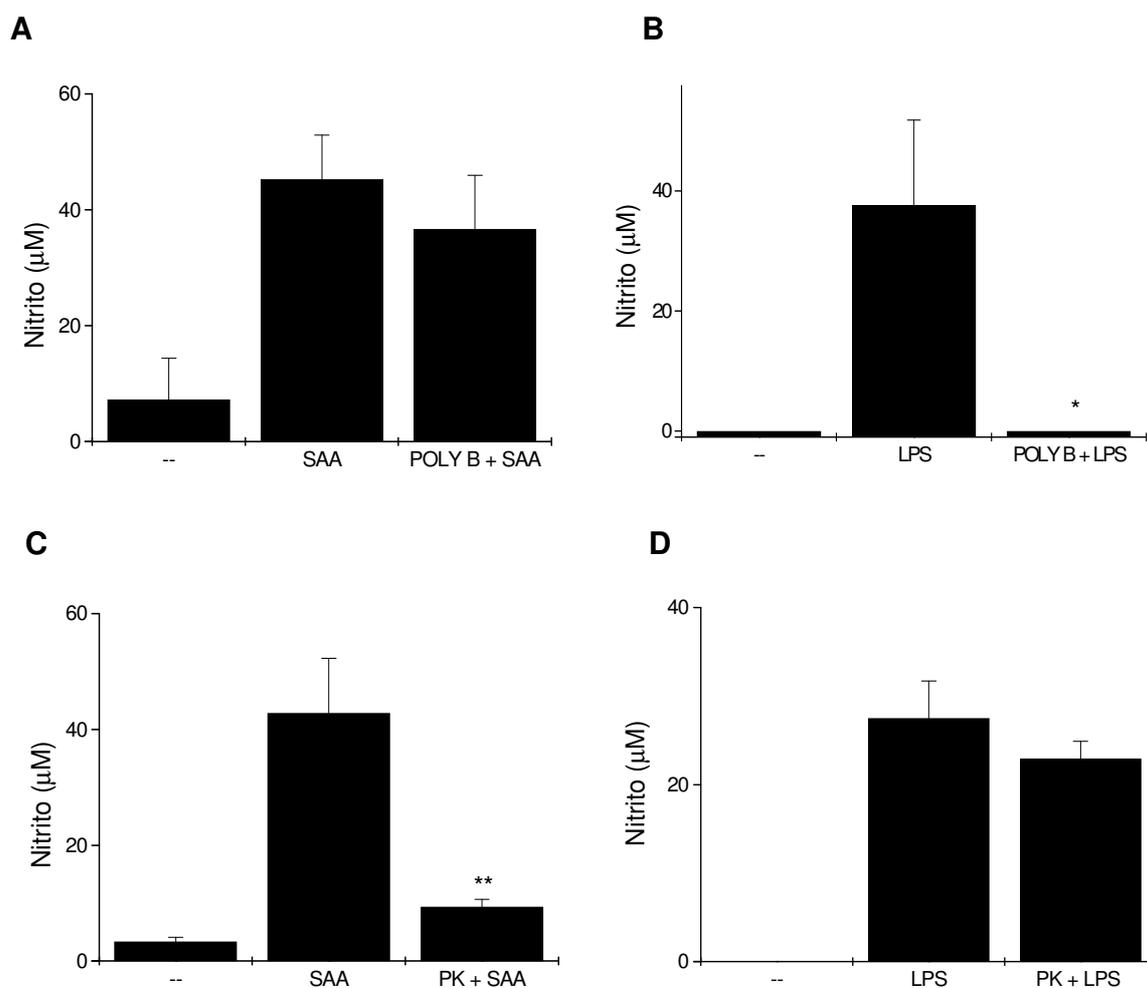


Figura 15: Efeito do pré-tratamento com de Poly B e PK na produção de NO induzida pela SAA e LPS. SAA (10 µg/mL) ou LPS (0,1 µg/mL) foram pré-incubados com Poly B (25µg/mL) ou PK (10 µg/mL) durante 45 minutos a 37 °C e após foram adicionados a culturas de macrófagos e incubados por 48 horas. Os dados representam a média e desvio padrão de três experimentos (* $p < 0,05$ vs. LPS; ** $p < 0,01$ vs. SAA).

8.1.2 Discussão

Neste estudo descrevemos uma nova atividade imunomodulatória da SAA, a produção de NO por macrófagos. Observamos que os efeitos da SAA sobre a produção de NO é similar a outros mediadores inflamatórios como fMLP, MCP-1 e LPS (121 - 123). Além disso, outros indutores que apresentam a capacidade de induzir a produção de NO necessitam obrigatoriamente da presença de outro estímulo, como no caso da flagelina e do taxol (124, 125), o que não se aplica a SAA. Outro fato importante que deve ser levado em consideração, é que o uso de anticorpos anti-TNF- α nos indicam que os efeitos da SAA na produção de NO podem ser um efeito direto da sua ação.

A produção de NO foi dependente da concentração de SAA. Quando avaliamos a produção de NO em relação ao tempo, verificamos que nos tempos de 24 e 48 horas não houve diferença na produção de NO induzida pela SAA. Tal achado coincide com a literatura, que relata para diferentes estímulos, um aumento na produção de NO a partir de 12 horas de incubação até 24 horas seguida de uma produção estável até 48 horas (126).

Mostramos que a produção de NO promovida pela SAA em macrófagos primados *in vivo* com Con A é maior do que a produção de NO em macrófagos residentes. Con A é um ativador policlonal de células T e mimetiza a ativação de macrófagos por IFN- γ . Além disso, há estudos que indicam que Con A via intraperitoneal é responsável pelo o aumento da atividade de macrófagos (115-117).

O IFN- γ promove mudanças em macrófagos como a pré-ativação, isto é, deixando-os mais sensíveis frente a um segundo estímulo (127). Um dos efeitos mais bem descritos do IFN- γ é o seu efeito sinérgico com LPS na produção de NO por macrófagos (128). O que se observa em relação aos dados com SAA na produção de NO por macrófagos primados Con A possivelmente seja um efeito sinérgico entre IFN- γ e SAA, isto é, a SAA e o IFN- γ poderiam atuar ativando vias diferentes, que culminaria na ativação de genes relacionados à produção de NO, em consequência disso, ocorre um aumento da produção de NO.

Em relação ao IFN- γ , sabe-se que no momento que houver a ativação do receptor de IFN- γ , este se dimeriza e induz a fosforilação de proteínas transdutoras de sinais e ativadoras de transcrição, as STATs. As STATs ativadas, dimerizam-se e translocam-se para o núcleo. No núcleo, as STATs aumentam a expressão do fator de transcrição, o IRF-1, este por sua vez se liga a uma região específica no gene promotor da iNOS levando a expressão do gene iNOS, e conseqüentemente produção de NO (129). Em relação à SAA, foi mostrado que de muitos dos seus efeitos na indução de citocinas e de outros mediadores há o envolvimento da ativação do fator de transcrição NF κ B, importante fator de transcrição que regula a transcrição de muitos mediadores inflamatórios, inclusive a produção de NO (65). Diante disso, sugere-se que o possível mecanismo envolvido na produção de NO induzida pela SAA por macrófagos primados com Con A, seria o sinergismo entre fatores de transcrição induzidos pela SAA e IFN- γ (**Figura 16**).

Uma outra hipótese para este aumento da produção de NO induzida pela SAA em macrófagos primados com Con A pode ser devido ao fato que IFN- γ aumenta a expressão de receptores tipo *Toll-like*, dentre eles o TLR4 (130), a expressão de co-receptores e a expressão de moléculas acessórias (127). Assim, não descartamos que esse conjunto de efeitos promovidos pelo IFN- γ poderia facilitar a atuação da SAA, por exemplo, pelo aumento da expressão de TLR4, o que levaria a um aumento da produção de NO (**Figura 16**).

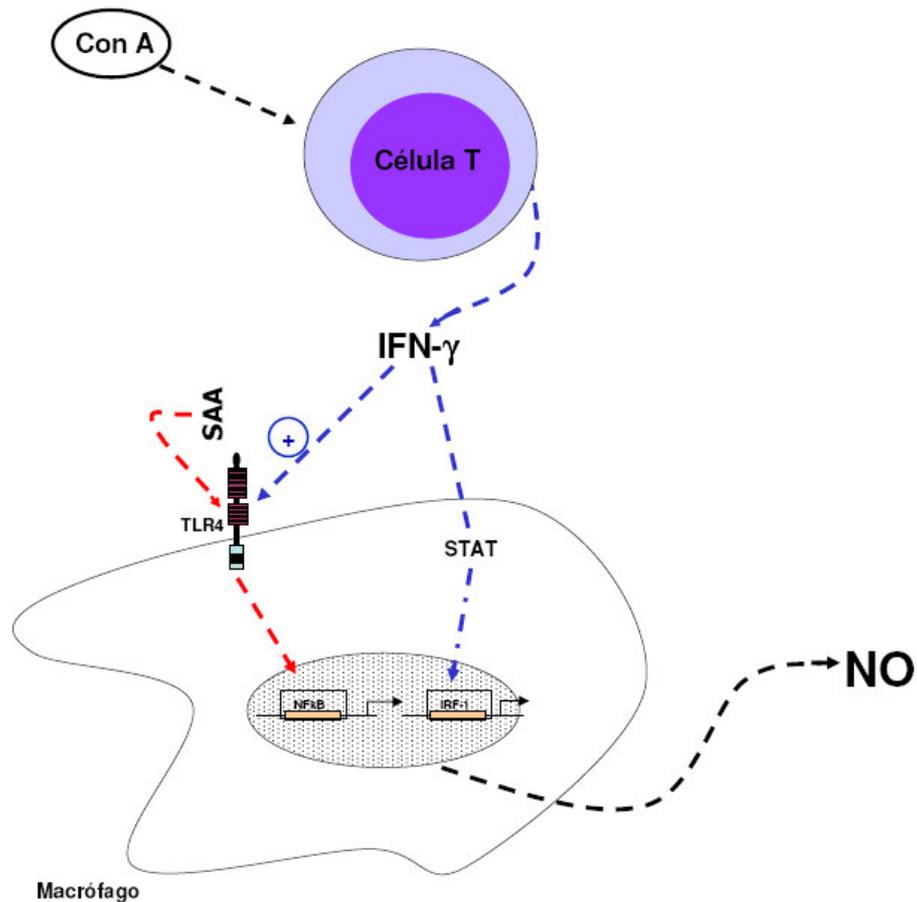


Figura 16: Mecanismo proposto para produção de NO induzida pela SAA por macrófagos primados *in vivo* com Con A.

Investigamos também o mecanismo de transdução de sinal envolvido na produção de NO induzida pela SAA em macrófagos. Os dados obtidos com o uso de inibidores imidazólicos mostram a participação de p38 e ERK1/2 na produção de NO promovida pela SAA. A ativação dessas serina-treonina quinases torna-se importante pelo fato dessas quinases estarem ligadas à expressão de genes pró-inflamatórios (108). Tal achado foi mostrado também para outros estímulos como fMLP, MCP-1 e LPS no mesmo tipo celular (121-123).

A produção de NO induzida pela SAA em conjunto com a presença da própria SAA no foco inflamatório, seja pela sua produção local por macrófagos ativados (15) ou pela sua passagem do soro para o foco inflamatório (6), nos

permite inferir que alguns eventos importantes podem ser mediados pela SAA no processo inflamatório. Dentre eles está o aumento da atividade microbicida, pela formação de peroxinitrito (ONOO^-), uma vez que a SAA induz a produção de espécies reativas de oxigênio (4) e de NO. Outro evento importante seria sobre a viabilidade dos macrófagos. Sabe-se que a produção de NO em altas concentrações e mantida por tempos prolongados tem efeito de retardar a apoptose, por prevenir a atividade das caspases e com isso tem-se a manutenção da viabilidade e da integridade celular (131). Assim, como a SAA induz produção de NO em altas concentrações e por tempos prolongados, é possível que a manutenção da viabilidade dos macrófagos possa ser mediada pela SAA.

Como nos últimos anos têm sido descritos novos ligantes para receptores *Toll-like*, dentre eles destacam-se os ligantes endógenos. Dada a similaridade relacionada à liberação de citocinas pró-inflamatórias entre as respostas biológicas da SAA com o LPS, investigamos se a SAA poderia ser um ligante endógeno do receptor TLR4. Observamos que a produção de NO promovida pela SAA foi abolida quando utilizamos macrófagos das linhagens deficientes em TLR4 (HeJ e $\text{TLR4}^{-/-}$). Esses resultados sugerem fortemente que SAA seja um ligante endógeno de TLR4. Até o momento quatro receptores foram descritos para SAA. Estes são: (i) FPRL1, o qual está relacionado a liberação de IL-8 (39), IL-12 (30); (ii) *Tanis*, expresso pelo tecido hepático e regulado por níveis de glicose (40); (iii) CLA-1, *scavenger* de HDL encontrado em células mononucleares (41); e (iv) RAGE, um receptor recentemente descrito cuja ativação está envolvida na liberação de *tissue factor* (32).

A partir dos nossos resultados, a SAA passa a integrar uma lista de moléculas endógenas agonistas de TLR4 que inclui as *heat shock proteins*, heparan sulfato, fibrinogênio, fibronectina e HMGB1 (132). Uma das características em comum entre essas moléculas é que todas são oriundas da injúria celular durante a resposta inflamatória. Como os outros ligantes endógenos de TLR4, a SAA também pode ser liberada no foco inflamatório. A SAA produzida por macrófagos ativados (15) poderia atuar de forma autócrina na sustentação da produção de NO e de outros mediadores pró-inflamatórios.

O fato de haver ligantes endógenos de receptores que, a princípio, pareceriam específicos para moléculas exógenas desperta atenção. Uma hipótese que vem sendo considerada é que esses ligantes endógenos estão relacionados a processos sépticos. Inicialmente, a resposta inflamatória seria desencadeada pelo patógeno, mas esta se manteria através da ativação de receptores *Toll-like* por moléculas endógenas (133). A ligação da SAA ao TLR4 poderia amplificar e sustentar a resposta imune durante o choque séptico. Neste sentido, sabe-se que a SAA se encontra aumentada na sepse sendo que sua concentração aumenta com a gravidade (134).

A SAA, da mesma forma que os outros ligantes endógenos de TLR4, não apresenta estrutura similar ao LPS. Entretanto, nas regiões repetidas de leucina nos receptores *Toll-like* há sítios que beneficiam ligações com regiões hidrofóbicas de moléculas (62). Assim, Matzinger e colaboradores (2004), levantaram a hipótese de que moléculas endógenas poderiam se ligar a receptores como TLR4 através destes sítios hidrofóbicos (62).

Dado que a SAA é uma proteína recombinante produzida em *E. coli* foi determinada a quantidade de endotoxina presente na sua preparação. Como observado através do teste de LAL, a SAA apresenta uma atividade de endotoxina de 3,6 UE/mL. Sendo assim tentamos obter uma preparação de SAA totalmente livre de endotoxina, através do método de separação por duas fases com Triton-X. Entretanto, no final do processo houve uma perda drástica da quantidade protéica da SAA. Acreditamos que esta perda possa ter ocorrido devido a presença de sítios hidrofóbicos na estrutura da SAA que reteve a proteína na fase que continha detergente. Outra possibilidade é que devido ao seu baixo peso molecular, a SAA não é elegível a purificação com este tipo de procedimento.

Diante da impossibilidade de obtermos uma preparação de SAA completamente livre de endotoxina, utilizamos outras duas estratégias para excluir a possibilidade de que os efeitos encontrados para SAA pudessem ser devidos a endotoxina contaminante. Uma delas foi observar que LPS, na concentração determinada como contaminante da SAA e 10 vezes superior, não é capaz de induzir produção de NO semelhante àquela promovida pela SAA. A outra

estratégia foi o pré-tratamento da preparação de SAA com polimixina B e proteinase K. Observamos, nas condições ensaiadas, a inabilidade de polimixina B inibir a produção de NO induzida pela SAA. Por outro lado, o pré-tratamento com proteinase K diminuiu a produção de NO. Quando este mesmo tratamento foi usado com LPS, obtivemos uma resposta contrária a da SAA. É importante salientar que os resultados obtidos com o pré-tratamento com polimixina B, nesse estudo, são semelhantes a outros resultados obtidos em estudos que descrevem a habilidade da SAA induzir IL-12 (39) e *tissue factor* (32). Diante de tais achados, sugerimos que os efeitos promovidos pela SAA, no que diz respeito a produção de NO e a sua ligação ao TLR4, não são originados pela endotoxina contaminante.

Adicionalmente, verificamos se a SAA e LPS poderiam atuar de forma sinérgica na produção de NO. Nas condições ensaiadas, observamos que a produção de NO induzida pela SAA + LPS é semelhante àquela induzida somente pela SAA, sugerindo assim a inexistência de sinergismo entre LPS e SAA. O efeito é semelhante ao encontrado na liberação de TNF- α na presença de SAA e LPS (3). Além disso, o comportamento da SAA difere de outras proteínas recombinantes que atuam via TLR4, como é o caso da HSP60 que, além de ativar o TLR4, atua de forma sinérgica com LPS (135).

Os dados obtidos com camundongos deficientes na proteína MyD88, uma das proteínas sinalizadoras responsáveis pela transdução de sinal após a ativação de receptores *Toll-like*, mostram que a produção de NO induzida pela SAA independe de sua presença. Este dado sugere que outras vias de sinalização estariam sendo utilizadas pela SAA. Uma das possíveis vias seria a da proteína adaptadora TRIF que leva a ativação de IRF-3 e subsequente indução de IFN β (136). A ativação dessa via induz genes denominados de tipo IFN que estão relacionados com a produção de NO e IP-10 e que são liberados numa fase tardia da resposta inflamatória (137) (**Figura 17**).

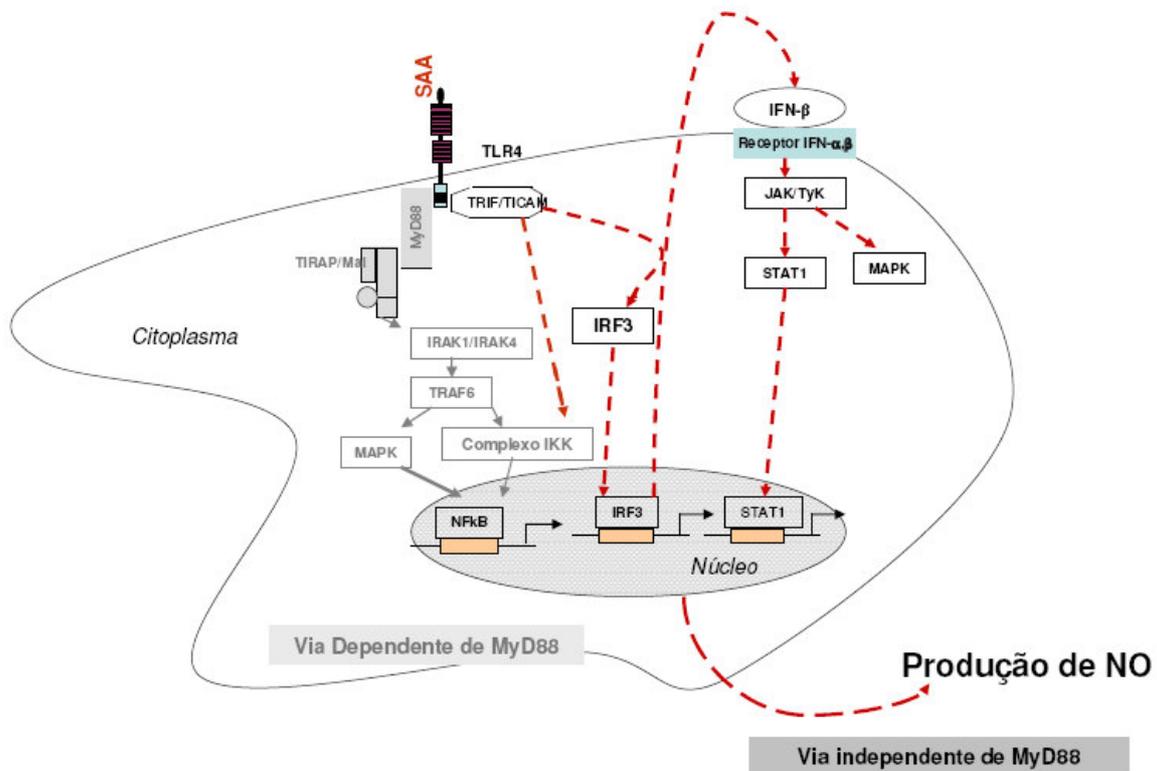


Figura 17: Esquema do mecanismo sugerido para produção de NO induzida pela SAA via ativação do receptor Toll-like 4.

A SAA, como outras proteínas de fase aguda, está relacionada a efeitos na resposta inata pela ligação a bactérias gram-negativas e atuação como opsonina (33). Entretanto, é evidente que SAA apresenta outras funções relacionadas com a imunologia celular que inclui a habilidade de se associar com leucócitos, induzir a liberação de citocinas pró-inflamatórias (1-3) e sensibilizar leucócitos para a produção de espécies reativas de oxigênio (4). A produção de NO induzida pela SAA descreve uma importante função imunológica para esta proteína, previamente desconhecida. Muitos dos efeitos biológicos mediados pela SAA, como o aumento da atividade microbicida (138) e a angiogênese (139), poderiam ser parcialmente mediados pela produção de NO.

*Efeitos da SAA na expressão e
liberação de CCL20 e expressão de
fatores de crescimento em células
mononucleares*

8.2 Efeitos da SAA na expressão e na liberação de CCL20 e expressão de fatores de crescimento por células mononucleares

O nosso grupo de pesquisa tem demonstrado que células do sistema imune na presença da SAA expressam e liberam citocinas pró-inflamatórias. Nesse capítulo abordaremos os efeitos da SAA sobre a expressão e liberação de CCL20, importante quimiocina na transição da resposta imune para adaptativa, e os seus efeitos sobre a expressão dos fatores de crescimento M-CSF e VEGF por células mononucleares humanas.

8.2.1 Resultados

8.2.1.1 SAA induz a liberação de CCL20 por células mononucleares

Inicialmente, analisamos os efeitos da SAA sobre a liberação da proteína de CCL20. Células mononucleares foram estimuladas com diferentes concentrações de SAA (8,5 – 34 µg/mL) e incubadas durante 12 horas. A determinação de CCL20 foi realizada no sobrenadante das culturas celulares através de ELISA. A produção de CCL20 encontrada no sobrenadante das culturas foi dependente da concentração de SAA (**Figura 18**). É importante notar que as concentrações de SAA empregadas são inferiores àquela encontrada durante uma resposta de fase aguda, onde a concentração sérica SAA pode alcançar até 1mg/mL.

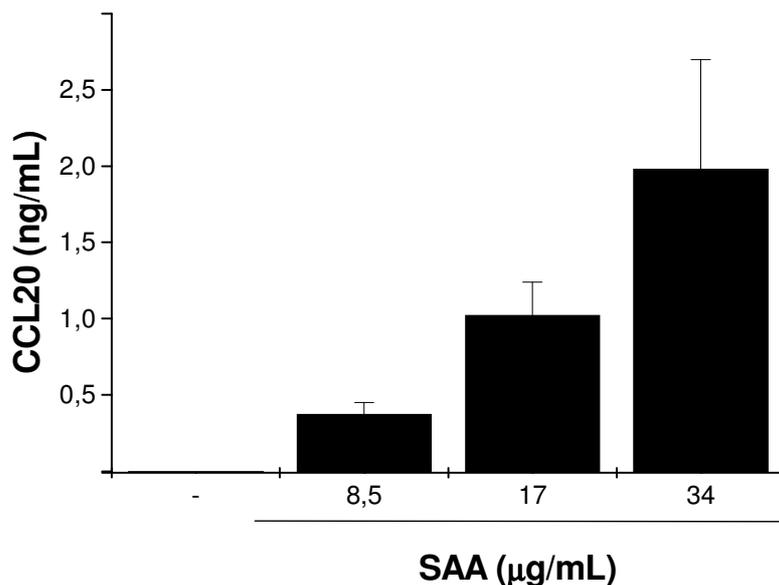


Figura 18: *Efeito dose resposta da SAA na liberação de CCL20 por células mononucleares. $2,5 \times 10^5$ células/mL foram estimuladas com SAA (8,5 – 34 µg/mL) e mantidas em cultura durante 12 horas. Os dados representam a média e desvio do erro de quatro experimentos independentes. ($r=0,99$)*

O passo seguinte foi verificar a liberação de CCL20 induzida pela SAA em relação ao tempo. Evidenciamos que SAA induz a liberação de CCL20 durante 12, 24 e 42 horas de incubação, porém não foi observada diferença significativa na liberação de CCL20 promovida pela SAA nos tempos empregados (**Figura 19**).

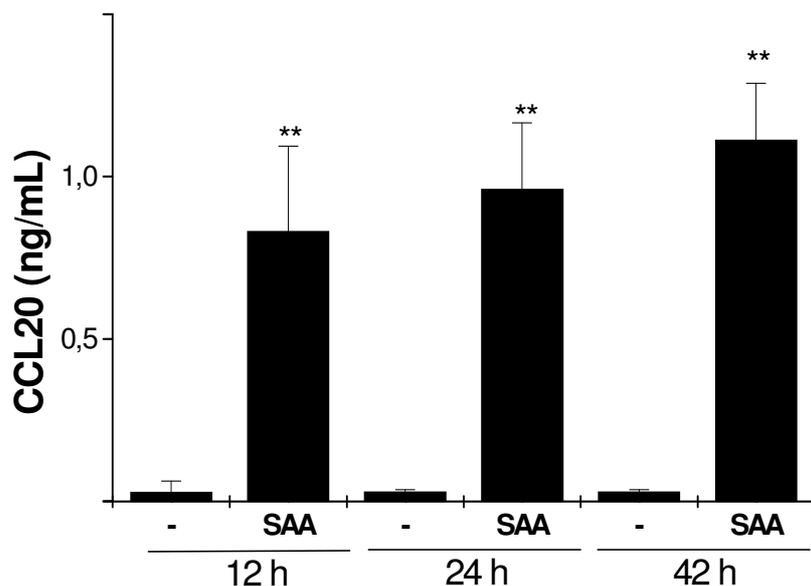


Figura 19. Liberação de CCL20 induzida pela SAA em diferentes tempos por células mononucleares. Células mononucleares ($2,5 \times 10^5$ células/mL) foram estimuladas com SAA ($17 \mu\text{g/mL}$) e mantidas em cultura durante os tempos indicados. Os dados representam a média e desvio do erro de três experimentos independentes (** $p < 0,01$ SAA vs. controle).

A SAA é um potente indutor da liberação de TNF- α (3) e como TNF- α também induz a secreção de CCL20 (92), verificamos a possibilidade do envolvimento de TNF- α na liberação de CCL20 promovida pela SAA. Assim, incubamos SAA ($17 \mu\text{g/mL}$) com anticorpo anti-TNF- α ($5 \mu\text{g/mL}$). Observamos que a presença de anti-TNF- α não inibiu a liberação de CCL20 promovida pela SAA (**Figura 20**). Esses dados nos sugerem que a liberação de CCL20 seja um efeito direto da SAA.

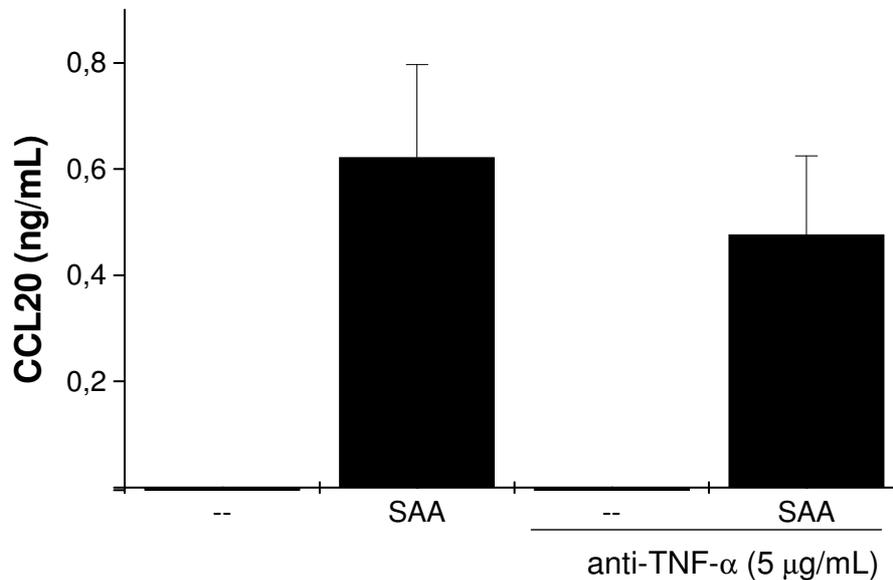


Figura 20. Efeitos de anti-TNF- α na liberação de CCL20 induzida pela SAA. Células mononucleares ($2,5 \times 10^5$ células/mL) foram incubadas com SAA (17 μ g/mL) e anti-TNF- α (5 μ g/mL) e mantidos em cultura durante 12 horas. Os dados representam a média e desvio do erro de três experimentos independentes.

8.2.1.2 Liberação de CCL20 induzida pela SAA é regulada a nível transcricional e translacional

Investigamos os mecanismos envolvidos na liberação de CCL20 induzida pela SAA. Para isso células mononucleares foram pré-incubadas com um inibidor de transcrição, a actinomicina D (ACTD), e com um inibidor de síntese protéica, a ciclohexemida (CHX). Inicialmente, as células foram incubadas com ACTD ou CHX durante 30 minutos. Ao término da pr -incubação as células foram estimuladas com SAA e mantidas em cultura durante 12 horas. Observamos que a presenç a de ambos os inibidores diminuiu a liberação de CCL20 induzida pela SAA quando comparada à liberação induzida somente pela presenç a de SAA (**Figura 21**). Através do teste de azul de *Trypan*, observou-se que não houve

comprometimento da viabilidade celular na presença dos inibidores (dado não mostrado). Estes achados sugerem que a SAA regula a liberação de CCL20 a nível transcricional e translacional.

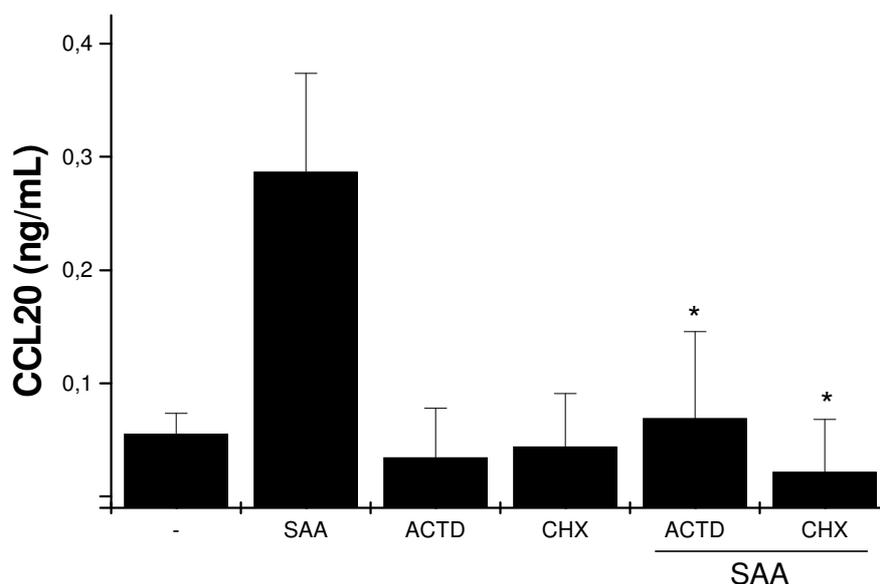


Figura 21: Efeitos da actinomicina D (ACTD) e ciclohexenida (CHX) na liberação de CCL20 induzida pela SAA. Células mononucleares ($2,5 \times 10^5$ células/mL) foram pré-incubadas com ACTD ($10 \mu\text{g/mL}$) ou CHX ($100 \mu\text{M}$) durante 30 minutos. Ao final da pré-incubação as células foram estimuladas com SAA ($17 \mu\text{g/mL}$) e mantidas em cultura por 12 horas. Os dados representam a média e desvio do erro de três experimentos independentes (* $p < 0,05$ SAA vs. SAA com diferentes tratamentos).

A seguir verificamos os efeitos da SAA sobre a expressão de RNA mensageiro para CCL20. Células mononucleares foram estimuladas com SAA ($20 \mu\text{g/mL}$) e mantidas em cultura durante 2, 4 e 12 horas para ensaios de expressão de mRNA realizados através da técnica de RPA. A SAA promoveu a expressão de RNA mensageiro para CCL20 em todos os tempos ensaiados, porém o maior conteúdo de RNA mensageiro para CCL20 foi observado em 4 horas de estímulo (**Figura 22**). Além disso, em 12 horas enquanto observamos um aparente

decréscimo da expressão de RNA mensageiro para CCL20, verifica-se um aumento da expressão de RNA mensageiro para IL-10, uma citocina antiinflamatória (**Figura 22**).

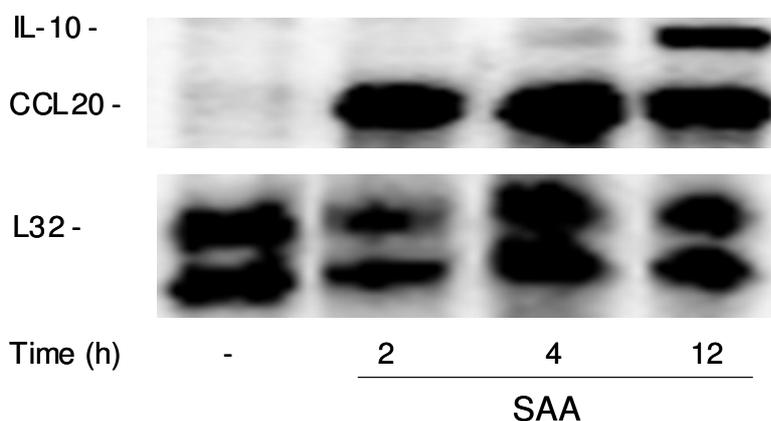


Figura 22: Cinética de expressão de RNA mensageiro para CCL20 promovida pela SAA em células mononucleares. Células mononucleares ($0,8 \times 10^7$ células/mL) foram estimuladas com SAA ($20 \mu\text{g/mL}$) e incubadas durante os tempos indicados. Os ensaios de expressão de RNA mensageiro foram realizados pela técnica de RPA, sendo a L-32 o nosso controle interno (constitutiva). Os dados são representativos de três experimentos independentes.

8.2.1.3 Efeitos dos inibidores SB203580, PD98059 e toxina pertussis na expressão e liberação de CCL20 induzida pela SAA por células mononucleares

Para determinar a via de sinalização envolvida na expressão e liberação de CCL20 utilizamos os inibidores imidazólicos SB203580 e PD98059. Observamos que a pré-incubação com esses compostos seguidos da estimulação com SAA inibiram parcialmente a liberação de CCL20 induzida pela SAA (**Figura 23 A**). O mesmo efeito foi observado na expressão de RNA mensageiro para CCL20 (**Figura 23 B**). Sabe-se que a atividade da SAA na indução de citocinas há o

envolvimento do receptor FPRL1. Esse receptor é um receptor acoplado a proteína G (tipo Gi). Sendo assim, verificamos se a liberação de CCL20 promovida pela SAA poderia ser mediada por esse tipo de receptor. Para responder essa questão utilizamos a toxina pertussis (PTX), que atua no receptor acoplado a proteína G inibindo a porção Gi. Verifica-se que tanto a liberação quanto a expressão de CCL20 induzidas pela SAA foram inibidas parcialmente na presença da PTX quando comparada somente com SAA (**Figuras 23 A e B**).

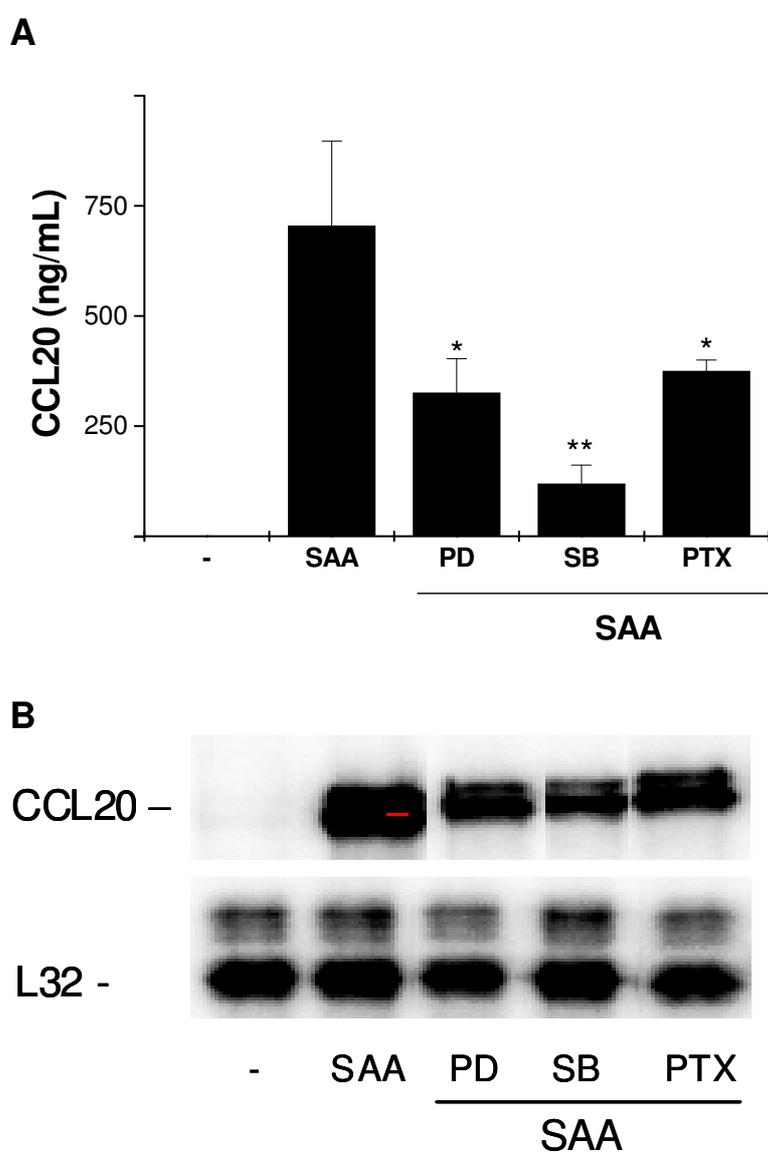


Figura 23: (A) Efeitos dos inibidores imidazólicos e toxina pertussis na liberação de CCL20 induzida pela SAA. (B) Efeitos dos inibidores imidazólicos e toxina

pertussis na expressão de CCL20 induzida pela SAA e como controle interno usamos L-32. Células mononucleares ($0,8 \times 10^7$) células/mL foram pré- incubadas com SB203580 ($10\mu\text{M}$) e PD98059 ($50\mu\text{M}$) e toxina pertussis ($0,1\mu\text{g/mL}$) durante 15 minutos após estimuladas com SAA ($10\mu\text{g/mL}$) e mantidas em cultura durante 4 horas. Os dados são representativos de três experimentos independentes ($p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ SAA vs SAA com diferentes tratamentos).*

8.2.1.4 Expressão de M-CSF e VEGF induzida pela SAA

Avaliamos também os efeitos da SAA sobre a expressão de alguns fatores de crescimento. Para isso, células mononucleares foram estimuladas com SAA ($20\mu\text{g/mL}$) e mantidas em cultura durante 2, 4 e 12 horas. A presença de RNA mensageiro foi analisada através da técnica de RPA a partir de uma sonda contendo os transcritos acima citados.

A SAA induziu a expressão de M-CSF a partir de 4 horas e esta aumenta até 12 horas de estimulação com SAA. A expressão de VEGF foi estimulada em todos os tempos de incubação, porém de forma mais branda quando comparada com M-CSF (**Figura 24**).

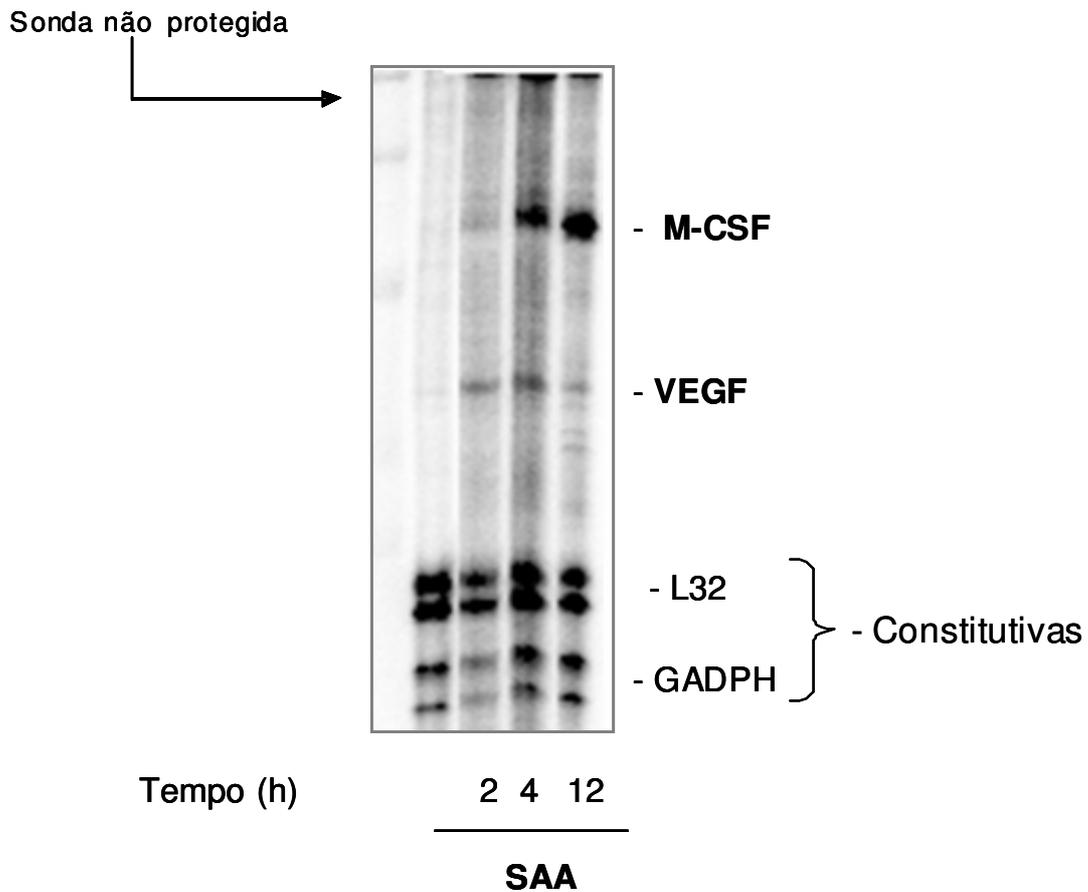


Figura 24: Expressão de RNA mensageiro para M-CSF e VEGF induzida pela SAA em células mononucleares. Células mononucleares ($0,8 \times 10^7$ células/mL) foram estimuladas com SAA ($20 \mu\text{g/mL}$) e mantidas em cultura durante os tempos indicados e como controle interno usou-se L32 e GADPH. Os dados são representativos de três experimentos independentes.

8.2.2 Discussão

Neste estudo mostramos que a SAA induz a expressão e liberação de CCL20 por células mononucleares humanas, sendo esta liberação dose dependente. Em relação aos tempos ensaiados a liberação da proteína CCL20 induzida pela SAA foi constante no período de 12 a 42 horas. Evidenciamos também que a SAA induz a expressão de RNA mensageiro para CCL20.

A literatura mostra que a CCL20 é expressa por células do sistema imune somente na presença de mediadores inflamatórios, dentre eles TNF- α , IL-1 β , PMA e LPS (87). Em neutrófilos, por exemplo, estímulos como TNF- α e LPS promovem a expressão de RNA mensageiro para CCL20 em 1 hora de incubação e esta não é mantida em tempos maiores de incubação (91). Em outros tipos celulares, como células progenitoras eritróides, a expressão de RNA mensageiro para CCL20 ocorre em 3 horas de incubação com TNF- α (88). Além de mediadores inflamatórios, condições como a baixa tensão de O₂ induz a expressão e a secreção de CCL20 por células mononucleares (90).

O que se observa em relação à SAA é que esta induz rapidamente a expressão de CCL20 e esta expressão é persistente durante tempos longos de incubação (12 horas). O fato de haver acumulação de transcritos para CCL20 em 2 horas de estimulação com SAA, o que se considera um tempo relativamente curto, sugere-se que não há o envolvimento de outros mediadores, ou seja, que este efeito se deve a ação direta da SAA. Além disso, com o uso de anticorpos anti-TNF- α observamos que a produção de CCL20 permanece inalterada, o que reforça que a liberação de CCL20 seja devido ao efeito direto da SAA. Esses resultados obtidos com SAA na cinética de expressão de RNA mensageiro para CCL20 são muito semelhantes aqueles promovidos em condições em que há baixa tensão de O₂ no mesmo tipo celular (90). Além disso, com uso de ACDT e CHX inibidores de transcrição e síntese protéica, respectivamente, observamos a inibição da liberação de CCL20 induzida pela SAA nas duas condições ensaiadas. Esses resultados sugerem que a produção de CCL20 promovida pela SAA depende da regulação a nível transcricional e translacional e que corroboram a

hipótese de que a liberação das quimiocinas se deve primariamente a regulação em nível de transcrição gênica (141).

A manutenção da expressão de CCL20 por tempos longos nos leva a considerar que a SAA seja um estímulo mais persistente quando comparado com LPS. No caso do LPS, em neutrófilos, há a necessidade da presença simultânea de outros estímulos, tais como fMLP ou IFN γ , para manter a expressão de CCL20 por tempos maiores (92).

Trabalhos que descrevem efeitos da SAA na liberação de TNF- α por neutrófilos (3), IL-12, TNF- α e IL-10 por células mononucleares (27, 28), mostram que a secreção destas citocinas dependem da ativação da via de sinalização das MAPKs. O uso de inibidores imidazólicos nestes trabalhos mostra o envolvimento de p38 e ERK1/2 em menor ou maior grau nos efeitos promovidos pela SAA. Esta mesma via também está ativa na liberação de CCL20 induzida por LPS em neutrófilos (92). Neste estudo, observamos que a liberação de CCL20 pela SAA está diminuída na presença de inibidores imidazólicos. Na presença do inibidor de p38 há uma inibição maior da expressão e liberação de CCL20 promovida pela SAA quando comparada àquela promovida pelo inibidor de ERK1/2. Estes resultados são similares àqueles encontrados na liberação de IL-10 e IL-8 promovida pela SAA por células mononucleares e neutrófilos humanos, respectivamente (27, 39).

A ativação das MAPKs é essencial para a expressão de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β , TNF- α e IL-8 por estímulos extracelulares. Adicionalmente, Lee e colaboradores mostram que a ativação de p38 e ERK1/2 é resultado da ativação do receptor FPRL1 pela SAA (28). FPRL1 é um receptor que atua via proteína G (tipo Gi) e é sensível à toxina pertussis. Nossos resultados com uso de toxina pertussis sugerem que a expressão e liberação de CCL20 induzida pela SAA dependem da ativação do receptor do tipo Gi, possivelmente o FPRL1.

Outros trabalhos têm descrito que os efeitos da SAA sobre a liberação de citocinas por leucócitos humanos dependem da ativação do receptor FPRL-1, como é caso da liberação de IL-8 (39), da expressão e da liberação de IL-12 (29),

da atividade quimiotática (23) e agora a expressão e secreção de CCL20. Deste modo, fica evidente que a SAA para promoção dos seus efeitos sobre leucócitos polimorfonucleares e mononucleares atue preferencialmente via ativação do receptor FPRL-1.

A indução da expressão e liberação de CCL20 por SAA deve originar uma atividade microbicida, já que CCL20 apresenta esta atividade contra bactérias gram-negativas. Além disso, a SAA parece não atuar somente na modulação da resposta imune inata, mas também poderia ser um elemento importante na transição para resposta imune adaptativa. Essa hipótese é suportada pelo recente trabalho que mostra que a SAA induz de secreção de IL-12 (28). A IL-12 é um importante modulador da resposta imune tipo Th1 por estimular células NK e células T a produzir IFN- γ , um fator importante para morte microbiana (142). Por outro lado, a CCL20 modula o recrutamento tanto de células dendríticas como de células T e B. Diante disso, acreditamos que a ação combinada de IL-12 e CCL20 contribui para reconhecimento do agente estranho e a conseqüente resposta do hospedeiro.

Nesse contexto, observa-se que proteínas de fase aguda como SAA apresentam um importante papel na regulação da resposta imune. Hepatócitos ativados com LPS promovem um aumento da expressão da SAA após 4 horas, indicando que a proteína é sinalizada de forma precoce (143). Adicionalmente, há indícios de que a SAA encontrada no foco inflamatório se deve a produção por células locais, por exemplo, macrófagos ativados, bem como pela sua passagem do plasma para o foco inflamatório (7). Assim, em muitos casos, a SAA poderia atuar conjuntamente com outras moléculas na manutenção da resposta imune. Em um primeiro momento, agentes como LPS sinalizariam os primeiros eventos da resposta imune e, num segundo momento, pela presença de mediadores endógenos como SAA, contribuiria com a manutenção da resposta imune pela liberação de moléculas efetoras da resposta imune que promoveriam o *clearance* de patógenos (**Figura 25**).

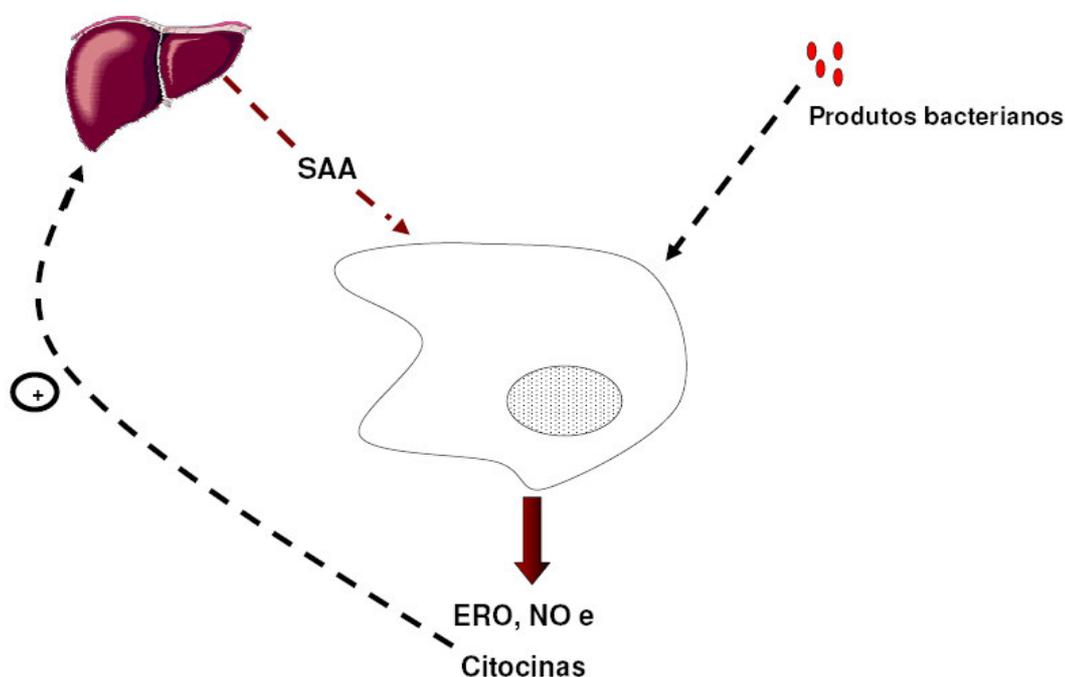


Figura 25: Esquema proposto para a resposta imune diante de estímulos exógenos e a manutenção pela SAA.

Além dos avanços na descrição dos efeitos biológicos promovidos pela SAA, há evidências que esta proteína atue em certas doenças inflamatórias crônicas. Nessas condições, se observa um aumento persistente das concentrações plasmáticas da SAA, como ocorre em pacientes diabéticos (5), e também um aumento da sua expressão em tecidos, como no caso da aterosclerose (18). Assim, acredita-se que a SAA esteja envolvida na gênese de doenças inflamatórias crônicas.

A CCL20 também está envolvida na manutenção da inflamação, na artrite, pelo recrutamento de células T (144). Como a SAA também é expressa em sinóvia de pacientes com artrite reumatóide (145), acreditamos que, por essa produção local, a SAA possa manter de forma autócrina o estado pró-inflamatório característico da artrite reumatóide pela indução da liberação de CCL20.

Além disso, a SAA, por ser expressa em alguns tipos de cânceres, poderia, de forma autócrina, manter a produção de alguns mediadores, inclusive a própria

CCL20. As conseqüências da expressão de CCL20 por alguns tipos de cânceres (146, 147) não é completamente conhecida, tem sido sugerido que a expressão de CCL20 participe de mecanismos de escape de células tumorais (96).

Evidenciamos também que a SAA induz a expressão de M-CSF e VEGF. Este efeito é similar ao desencadeados por PMA, GM-CSF, TNF- α e IFN- γ na indução da expressão de M-CSF (148) e LPS (104) ou hipóxia (149) na indução de VEGF. Apesar dos resultados relacionados à expressão de M-CSF e VEGF serem preliminares, esta ação seria importante uma vez que o M-CSF contribui para diferenciação de macrófagos e *priming* pelo aumento da expressão de receptores Fc γ (99). No tecido adiposo o M-CSF age na diferenciação de pré-adipócitos para adipócitos. Além disso, SAA e M-CSF se colocam em alguns tipos de cânceres e poderiam cooperar na atividade anti-tumoral, especialmente via ativação de macrófagos e conseqüente liberação de IL-1 β e TNF- α . Efeitos opostos também são esperados, pois há indícios que M-CSF induz a formação de novos vasos via VEGF (150) e a SAA por sua vez também induz a expressão de VEGF.

Em relação aos dados com VEGF há descrição de que células mononucleares expressam VEGF quando estimuladas com LPS/IFN- γ , sendo esse efeito mediado pela produção de NO (151). Assim, sugerimos que a expressão de VEGF promovida pela SAA possa ser mediada, por exemplo, pelo NO, um dos produtos gerados pela SAA.

A expressão de VEGF é mais um indicativo de que a SAA apresenta atividade pró-angiogênica e que concorda com estudos que descrevem a sua habilidade de induzir a formação de novos vasos (139) e processos decorrentes deste fenômeno (152). Além disso, como a SAA está associada a doenças inflamatórias crônicas, por exemplo, o diabetes, é possível que esta proteína contribua, pela indução de VEGF, para o desenvolvimento de complicações encontradas nesta doença, como a retinopatia.

Nossos resultados de expressão de M-CSF e VEGF induzida pela SAA são a primeira evidência dos efeitos dessa proteína sobre fatores de crescimento. Esses resultados dão suporte para estudos futuros no que diz respeito à

investigação sobre possíveis efeitos da associação entre SAA e/ou M-CSF e VEGF em doenças inflamatórias crônicas.

*Efeitos da SAA na
fosforilação de proteínas
tirosina quinases e MAPK*

8.3 Efeitos da SAA na fosforilação de proteínas tirosina quinases e MAPK

Além de verificarmos os efeitos biológicos da SAA analisamos o perfil de fosforilação de proteínas intracelulares. Neste capítulo apresentaremos o perfil de fosforilação de proteínas tirosina quinases induzido pela SAA e a comparação com o LPS.

8.3.1 Resultados

8.3.1.1 Cinética de fosforilação de Tirosina Quinase e MAPK estimulada pela SAA e LPS em células THP-1

Células THP-1 foram estimuladas com SAA (10 µg/mL) e LPS (10 µg/mL) durante 2 horas. Observa-se que tanto a SAA quanto o LPS promoveram a fosforilação de várias proteínas tirosina quinases (**Figuras 26 A e B**). A SAA fosforilou fortemente várias proteínas entre 17 a 55 kDa até 5 minutos (**Figura 26 A**). O número de proteínas fosforiladas pela SAA, bem como a intensidade de fosforilação diminuiu em 10 minutos de incubação (Figura 26A). Quando comparamos SAA com LPS, o que se evidencia é que o perfil de fosforilação é similar, porém a intensidade e o número de proteínas fosforiladas são menores para LPS (**Figura 26 B**).

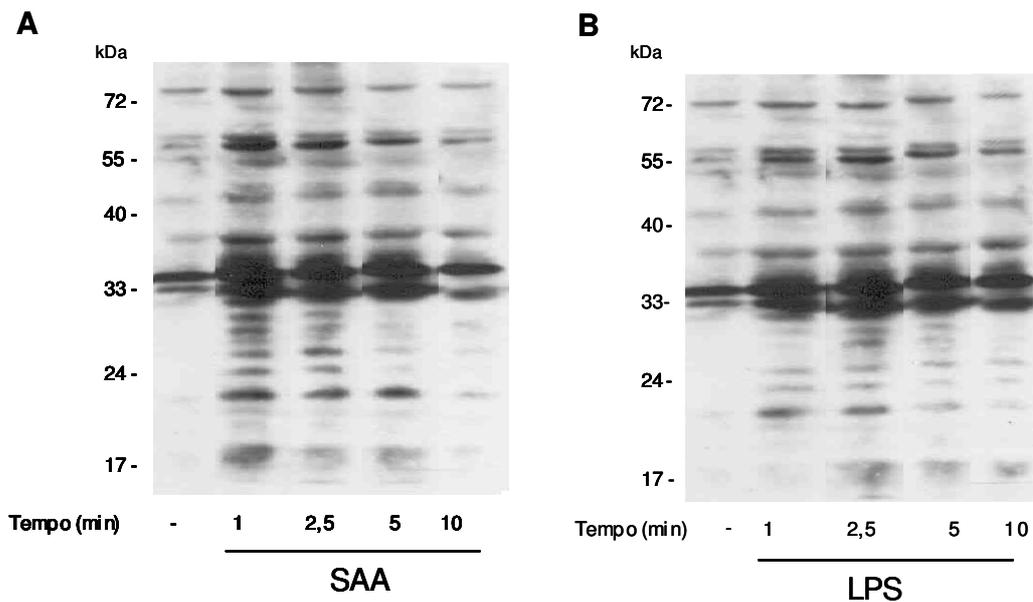


Figura 26: **(A)** Cinética de fosforilação de proteínas tirosina quinases promovida pela SAA. **(B)** Cinética de fosforilação de proteínas tirosina quinases promovida pelo LPS. Células THP-1 ($1,0 \times 10^6$ células/mL) foram incubadas com SAA ($10 \mu\text{g/mL}$) ou LPS ($10 \mu\text{g/mL}$) durante os tempos indicados. Os dados são representativos de três experimentos independentes.

Em tempos maiores de incubação, de 15 a 120 minutos, observa-se que o número de proteínas fosforiladas e a intensidade de fosforilação das proteínas tirosina quinases induzidas pela SAA diminuíram (Figura 27A). Entretanto, na faixa de tempo de 15 a 30 minutos, a proteína de peso molecular em torno de 24 kDa permanece fosforilada pela SAA quando comparada ao controle (**Figura 27 A**). A **Figura 27 B** mostra a fosforilação de proteínas tirosina quinases promovida por LPS, a qual não apresenta grandes diferenças na intensidade de fosforilação, parecendo-se similar ao basal.

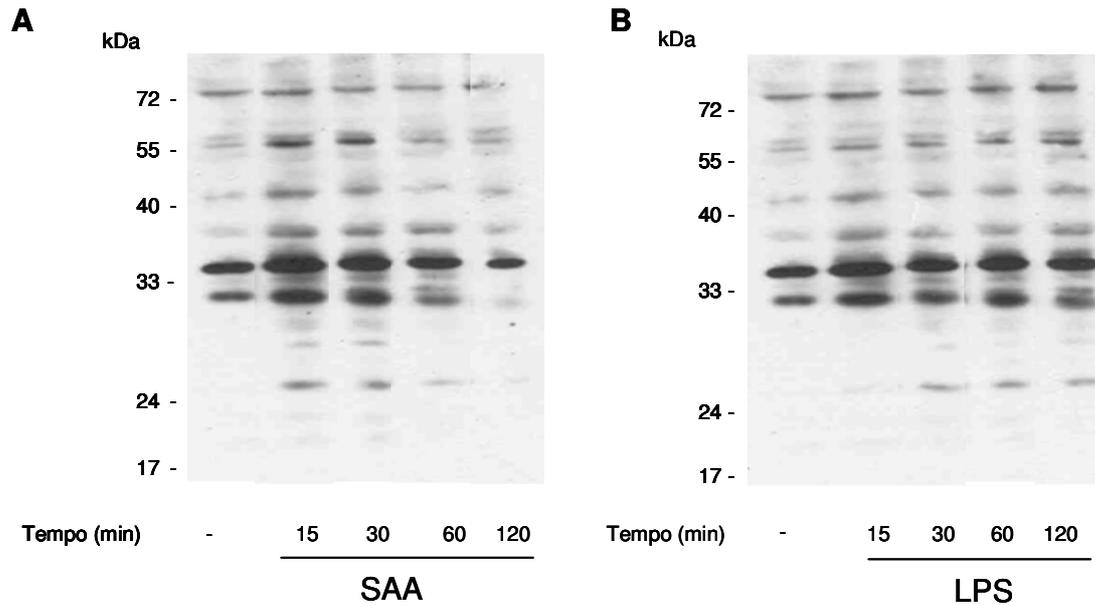


Figura 27: **(A)** Cinética de fosforilação de proteínas tirosina quinases promovida pela SAA. **(B)** Cinética de fosforilação de proteínas tirosina quinases promovida por LPS. Células THP-1 ($1,0 \times 10^6$ células/mL) foram incubadas com SAA ($10 \mu\text{g/mL}$) ou LPS ($10 \mu\text{g/mL}$) durante os tempos indicados. Os dados são representativos de três experimentos independentes.

Além de proteínas tirosina quinases de baixo peso molecular, foi avaliada o comportamento das proteínas de alto peso molecular frente à estimulação com SAA e LPS, em 2 horas de incubação. Até 10 minutos, a SAA induziu a fosforilação de proteínas tirosina quinases dentro da faixa de peso molecular entre 72 a 130 kDa. (**Figuras 28 A**). É importante notar que existe um número bem menor de proteínas tirosina quinases de alto peso molecular sendo fosforiladas em relação às de baixo peso molecular, discutidas posteriormente. Na **Figura 28 B** evidencia-se a fosforilação de proteínas quinases induzida por LPS. O LPS promove a fosforilação de proteínas de peso molecular entre 72 a 130 kDa, em todos os tempos de incubação.

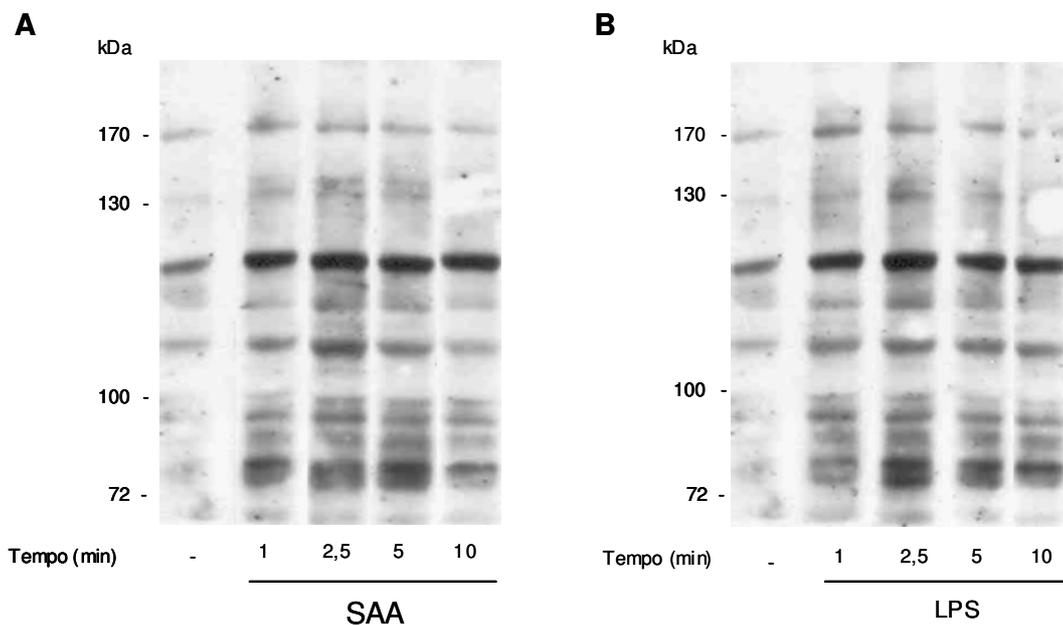


Figura 28: **(A)** Cinética de fosforilação de proteínas tirosina quinases promovida pela SAA. **(B)** Cinética de fosforilação de proteínas tirosina quinases promovida por LPS. Células THP-1 ($1,0 \times 10^6$ células/mL) foram incubadas com SAA ($10 \mu\text{g/mL}$) ou LPS ($10 \mu\text{g/mL}$) durante os tempos indicados. Os dados são representativos de três experimentos independentes.

Entre 15 a 120 minutos a SAA induziu a fosforilação de proteínas tirosina quinases em torno de 72 e de 130 kDa. A partir de 30 minutos de incubação as proteínas permaneceram fosforiladas até 120 minutos (**Figura 29 A**). Além disso, as proteínas em torno de 100 kDa que eram fosforiladas frente a SAA até 5 minutos não voltaram a serem fosforiladas em tempos superiores (**Figura 29 A**). O LPS promove a fosforilação de proteínas tirosina quinases de peso molecular entre 72 a 100 kDa em número maior de proteínas e com maior intensidade quando comparada a SAA (**Figura 29 B**).

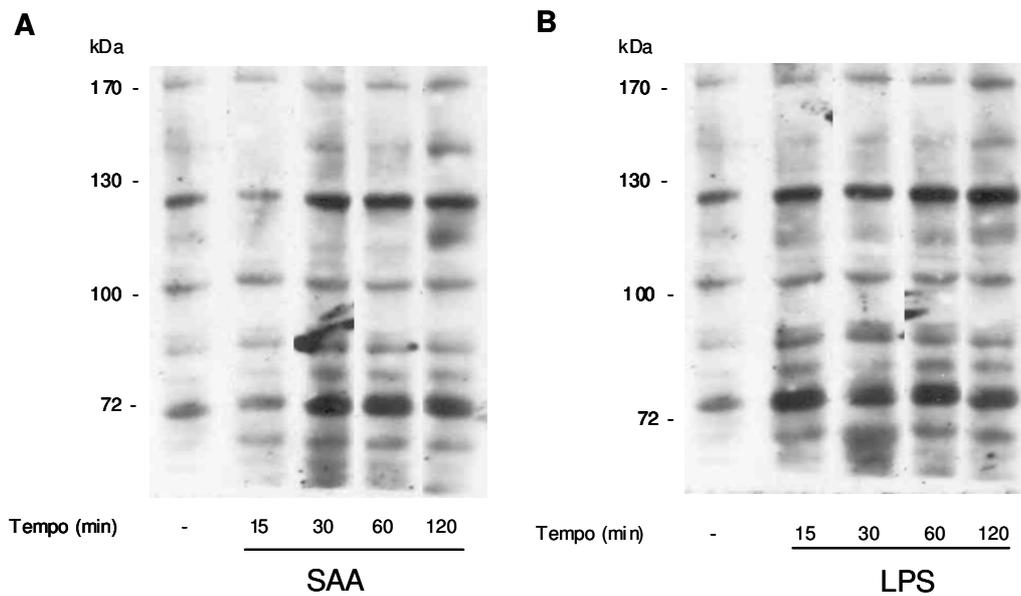


Figura 29: **(A)** Cinética de fosforilação de proteínas tirosina quinases promovida pela SAA. **(B)** Cinética de fosforilação de proteínas tirosina quinases promovida pela LPS. Células THP-1 ($1,0 \times 10^6$ células/mL) foram incubadas com SAA ($10 \mu\text{g/mL}$) ou LPS ($10 \mu\text{g/mL}$) durante os tempos indicados. Os dados são representativos de três experimentos independentes.

8.3.1.2 Efeitos da SAA na fosforilação das MAPK

Com uso de anticorpos específicos identificamos algumas proteínas fosforiladas em tirosina quinase. Identificamos que a SAA induz a fosforilação de p38, uma proteína que é fosforilada em serina/ treonina quinase e que também apresenta resíduos de tirosina (**Figura 30 A**). Em paralelo, mostramos também a fosforilação de p38 induzida por LPS (**Figura 30 B**). Quando comparamos o efeito da SAA com LPS, o que se observa, aparentemente, é que a SAA fosforila com maior intensidade a p38 em relação ao LPS, nos tempos ensaiados.

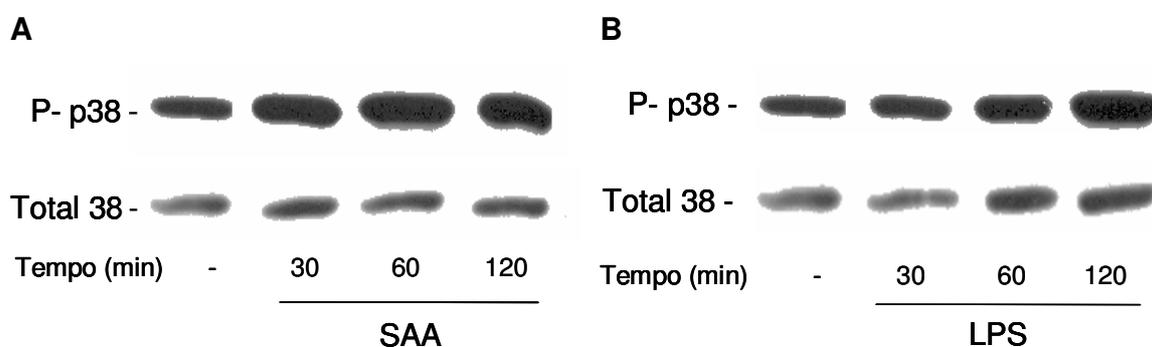


Figura 30: Fosforilação de p38 induzida pela SAA e LPS. Células THP-1 ($1,0 \times 10^6$ células/mL) foram incubadas com SAA ($10 \mu\text{g/mL}$) (**A**) e LPS ($10 \mu\text{g/mL}$) (**B**) durante os tempos indicados. Os dados são representativos de três experimentos independentes.

Também identificamos a ERK1/2, com o uso de anticorpos específicos. A SAA induziu a fosforilação de ERK1/2 após 30 minutos de incubação, a qual declinou em 1 hora, e voltou a ser fosforilada em 2 horas de incubação (**Figura 31 A**). Nas condições ensaiadas, observamos o mesmo perfil de fosforilação para LPS (**Figura 31 B**). De forma diferente do encontrado com p38, o perfil de fosforilação promovido pela SAA, aparentemente, é semelhante ao promovido pelo LPS.

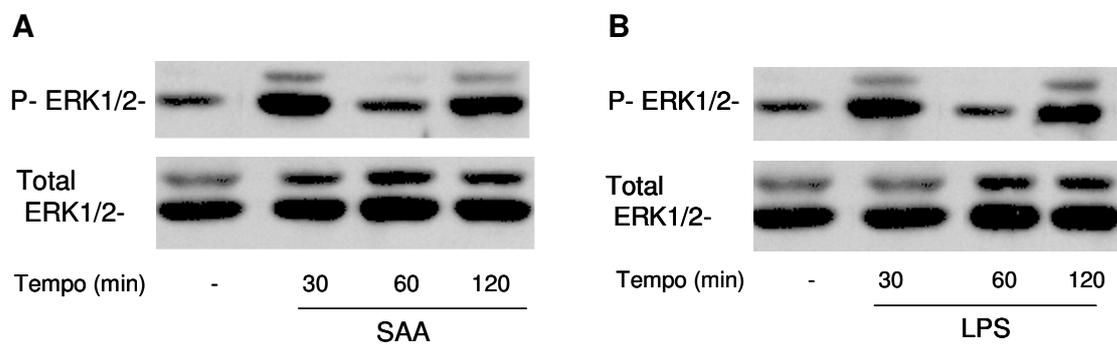


Figura 31: Fosforilação de ERK1/2 induzida pela SAA e LPS. Células THP-1 ($1,0 \times 10^6$ células/mL) foram incubadas com SAA ($10 \mu\text{g/mL}$) (**A**) e LPS ($10 \mu\text{g/mL}$) (**B**) durante os tempos indicados. Os dados são representativos de três experimentos independentes.

8.3.2 Discussão

Neste estudo mostramos a cinética de fosforilação de proteínas tirosina quinases promovida pela SAA. Dentre as proteínas fosforiladas pela SAA, destaca-se a faixa de proteínas de peso molecular entre 17 e 55 kDa. Esta faixa deve conter as proteínas da família das Src Kinases (60 kDa), c-Jun N-terminal Kinases (JNKs) e p38 (38 kDa), ERK1/2 (42/44 kDa) e as Cdks (33 a 35 kDa).

As proteínas da família das Src kinases estão envolvidas no recrutamento e ativação de monócitos, macrófagos, neutrófilos e outras células do sistema imune e exercem importante papel na regulação da permeabilidade vascular e da resposta inflamatória (153, 154). A ativação de JNK e p38 promove a transdução de sinal iniciada por citocinas e condições de stress, por exemplo, o stress oxidativo. ERK1/2 são responsáveis pela proliferação de células frente a estímulos como espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico (108). As Cdks são proteínas com atividade catalítica, que regulam a progressão do ciclo celular (155, 156). Estas são denominadas Cdk1, Cdk2, Cdks 4/6 e que associadas as ciclinas participam de todas as fases do ciclo celular em maior ou menor grau.

Através de anticorpos específicos demonstramos que as proteínas fosforiladas pela SAA, em torno de 38 e 42/44 kDa são respectivamente, p38 e ERK1/2 (**Figuras 30 e 31 A**). Estes achados corroboram alguns dos resultados mostrados anteriormente nesta tese com o uso dos inibidores imidazólicos, tanto na indução da iNOS (item 8.1.1.4, Fig. 6, p.51) como na expressão de CCL20 em células mononucleares (item 8.2.1.3, Fig.23, p.81). O efeito de inibidores da p38 e ERK1/2 também já havia sido mostrado por nosso grupo de pesquisa na inibição da produção de TNF- α induzida pela SAA em neutrófilos e monócitos (4).

Ainda, dentro da faixa de 17 a 55 kDa, existe uma região de baixo peso molecular (17 a 24 kDa) que contém diversas proteínas fosforiladas de identificação desconhecida. Além disso, há uma região de alto peso molecular (72 e 130 kDa) que são fosforiladas pela a SAA. Nesta região de alto peso molecular devem possivelmente estar presentes as proteínas Raf (74 kDa) ^{Tyr 340, 341} e FAK

(125 kDa), que estão relacionadas com proliferação e diferenciação celular (157,158). Estes dados podem auxiliar estudos futuros do grupo, uma vez que um dos objetivos atuais é verificar a influência da SAA no ciclo celular em diferentes tipos celulares. Estudos mostraram que a SAA atua na proliferação de fibroblastos (Hatanaka e colaboradores, em preparação) e há dados preliminares sobre a ação de SAA no ciclo de linhagens tumorais.

A ativação de proteínas tirosina quinases promovida pela SAA, pode ser devido a um efeito direto da SAA via ativação de receptores e conseqüente ativação de cascatas de sinalização ou pela modificação do estado redox da célula, dado que a SAA induz tanto produção de espécies reativas de oxigênio (4) como de NO, os quais estão envolvidos na ativação de proteínas tirosina quinases (159).

Consideramos que os estudos das vias de sinalização ativadas pela SAA, além de ajudar a apontar rotas relacionadas aos efeitos promovidos pela SAA, poderiam identificar rotas específicas de SAA que sejam diferentes do LPS. Na comparação com LPS observamos a fosforilação de diversas proteínas tirosina quinase. A identificação de muitas delas já é descrita na literatura. Por exemplo, a ativação das MAPKs e das Src-quinases estão envolvidas na produção de NO (160, 161).

Os perfis de fosforilação, apesar de algumas diferenças nítidas em algumas bandas, especialmente na região de 17 a 33 KDa (**Figura 23 A**), foram muito similares entre SAA e LPS. Este fato nos remete a idéia de que dois estímulos tão diferentes em relação à origem e à estrutura utilizam rotas similares para promover seus efeitos na ativação imune, especialmente no que se refere à resposta inflamatória, deve ter evoluído através do reconhecimento de motivos moleculares do próprio hospedeiro. Pode-se imaginar que a existência de tais moléculas propicia respostas envolvidas com a eliminação de patógenos assim como as necessárias ao reparo de tecidos.

Conclusões

9 CONCLUSÕES

O objetivo desse estudo foi avaliar os efeitos da SAA sobre as células mononucleares. Primeiramente, em macrófagos peritoneais de murinos, mostramos que a SAA induz a produção de NO. A utilização de animais *knockout* em TLR4 nos dá suporte para a idéia de que SAA seja um ligante endógeno de TLR4, e que os eventos posteriores à ativação deste receptor independem da proteína MyD88. Em células mononucleares humanas, descrevemos que a SAA promove a expressão e a liberação de CCL20 e a expressão de M-CSF e de VEGF. A utilização de inibidores específicos nos faz supor que a ativação do receptor FPRL1 seja o responsável pela liberação de CCL20. Em relação às vias de sinalização ativadas pela SAA, mostramos que p38 e ERK1/2 estão envolvidas tanto na produção de NO quanto na liberação de CCL20 estimulada pela SAA. Em células THP1, mostramos o perfil de proteínas tirosina quinases sendo fosforiladas pela SAA.

Com este estudo descrevemos novas atividades biológicas da SAA no que diz respeito à ativação das células do sistema imune, mais especificamente as células mononucleares. Com estes efeitos da SAA sobre as células mononucleares, reforçamos a hipótese de que a SAA exerça uma atividade modulatória importante tanto nas fases iniciais como finais da resposta inflamatória.

Além disso, mostramos várias proteínas tirosina quinases sendo fosforiladas pela SAA, os quais nos darão suporte para o mapeamento de vias de sinalização ativadas pela SAA em células que compõem o sistema imune. Quando comparamos o perfil de fosforilação de proteínas tirosina quinases promovido pela SAA com LPS, observa-se que perfil temporal e a intensidade de fosforilação de tirosina quinases são similares, mas não idênticos. Isso se torna importante, pois se trata de dois estímulos, um de origem endógena e outro de origem exógena, que, a princípio, ativam as mesmas vias.

Desta forma, o conjunto de dados mostrado nesse estudo permite uma discussão mais amparada das funções biológicas da SAA, bem como dos

receptores e das vias de sinalização utilizadas por ela. Assim, auxilia na compreensão de como se dá o reconhecimento de diferentes motivos moleculares, especialmente de moléculas do próprio hospedeiro por células do sistema imune. O esquema a seguir delinea de forma simplificada os principais achados deste estudo.

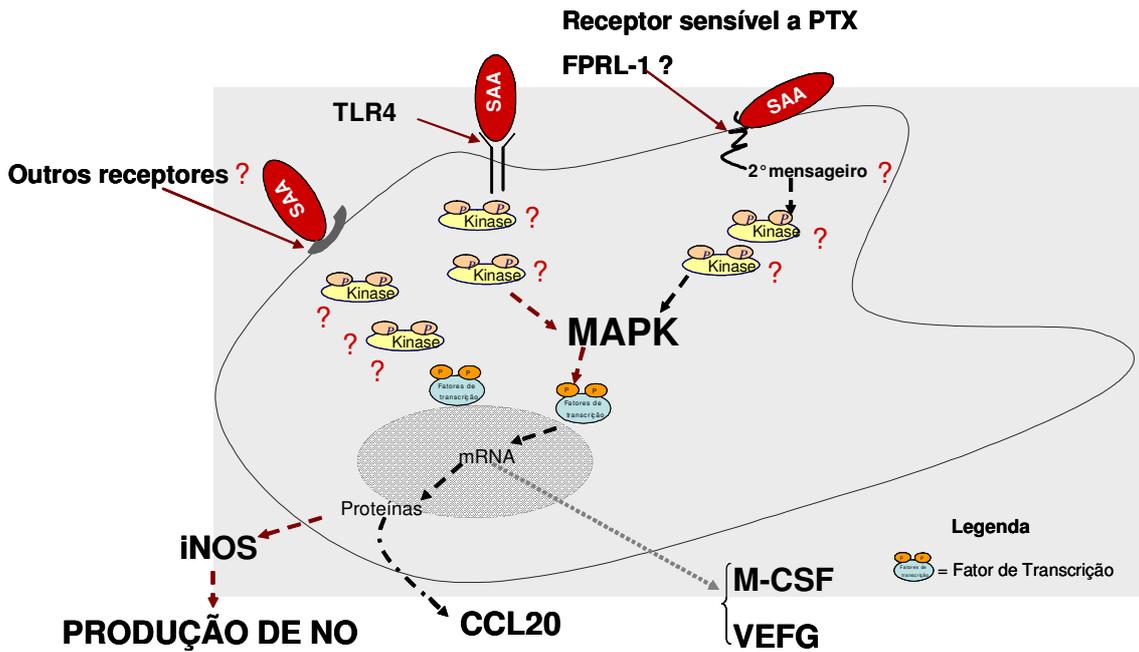


Figura 32: Esquema que mostra os principais achados desse estudo dos efeitos da SAA sobre células mononucleares.

Referências

10 REFERÊNCIAS

1. Furlaneto CJ., Campa, A. (2000) "A novel function of serum amyloid A: a potent stimulus for the release of tumor necrosis factor- α , interleukin-1 β e interleukin-8 by human blood neutrophil". **Biochem.Biophys.Res.Comm.** 268(2): 405-8.
2. Ribeiro, FP, Furlaneto CJ, Hatanaka, E, Ribeiro, WB, Souza, GM, Cassatella, MA, Campa, A. (2003). "mRNA expression and release of interleukin-8 induced by serum amyloid A in neutrophils and monocytes". **Mediators Inflamm.**12 (3):73-8.
3. Hatanaka, E., Furlaneto, CJ. Ribeiro, FP., Souza, GM., Campa, A. (2004) "Serum amyloid A induced mRNA expression and release of tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) in human neutrophils". **Immunology Letters.** 91(1): 33-7.
4. Hatanaka, E, Ribeiro, FP, Campa, A. (2003). "The acute phase protein serum amyloid A primes neutrophils". **Immunol and Med.Micro.** 38: 81-4.
5. Hatanaka E, Monteagudo PT, Marrocos MS, Campa A. (2007) "Interaction between serum amyloid A and leukocytes - a possible role in the progression of vascular complications in diabetes." **Immunol. Lett.** 15; 108(2):160-6.
6. Okino AM, Bürger C, Cardoso JR, Lavado EL, Lotufo PA, Campa A. (2006). "The acute phase proteins serum amyloid A and C reactive protein in transudates and exudates". **Mediators Inflamm.** 2006(1):47297
7. Cicarelli LM, Perroni AG, Zugaib M, de Albuquerque PB, Campa A. (2005) "Maternal and cord blood levels of serum amyloid A, C-reactive protein, tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1beta, and interleukin-8 during and after delivery." **Mediators Inflamm.** 2005(2):96-100.
8. Ureli-Shoval, S, Linke, PR, Matzener, Y. (2000) "Expression and function of serum amyloid A, a major acute-phase protein, in normal and disease states". **Current Opinion in Hematology.** 7: 64-69.

9. Uhlir, CM, Whitehead. (1999). "Serum Amyloid A, the major vertebrate acute-phase reactant." **Eur. J. Biochem**, 265:501-23.
10. Furlaneto CJ, Ribeiro FP, Hatanaka E, Souza GM, Cassatella MA, Campa A. (2000). "Apolipoproteins A-I and A-II downregulate neutrophil functions." **Lipids**. 37(9):925-8.
11. Coetzee, GA, Strachan, FA, Westhuyzen, DR, Hoppe, HC, Jeenah, MS., Beer, FC. (1986) "Serum Amyloid A - containing human high density lipoprotein 3". **J. Biol. Chem.** 261:9644-9651.
12. Husebekk. A, Skogen, BG. (1987). "Characterization of amyloid proteins SAA and AA as apolipoproteins of high density lipoprotein (HDL): displacement of SAA from HDL-SAA complex by apo A-I and apo A-II". **Scand. J. Immunol.**25: 375-378.
13. Steel, DM, Whitehead, AS, (1994). "The major acute phase reactants: C-reactive protein, serum amyloid P component and serum amyloid A protein". **Immunol. Today**, 15: 81-88
14. Hagihara K, Nishikawa T, Sugamata Y, Song J, Isobe T, Taga T, Yoshizaki K. (2005) "Essential role of STAT3 in cytokine-driven NF-kappaB-mediated serum amyloid A gene expression. **Genes Cells**. 10(11):1051-63.
15. Yamada T, Wada A, Itoh K, Igari J. (2000). "Serum amyloid A secretion from monocytic leukaemia cell line THP-1 and cultured human peripheral monocytes." **Scand. J. Immunol.** 52(1):7-12.
16. Sjöholm K, Palmig J, Olofsson LE, Gummesson A, Svensson PA, Lystig TC, Jennische E, Brandberg J, Torgerson JS, Carlsson B, Carlsson LM. (2005) "A microarray search for genes predominantly expressed in human omental adipocytes: adipose tissue as a major production site of serum amyloid A." **Clin. Endocrinol. Metab.** 90(4):2233-9.
17. Liang, JS, Sloane EJA, Wells, JM, Abraham, CR, Fine, RE, Sipe, JD. (1997). "Evidence for local production of acute phase response apoprotein serum amyloid A in Alzheimer's disease brain." **Neurosci. Lett.** 225:73-76.
18. Yamada T, Kakiyama T, Kamishima T, Fukuda T, Kawai T. (1996). "Both acute phase and constitutive serum amyloid A are present in atherosclerotic

- lesions". **Pathol Int.** 48:797-800.
19. Marhaug G, Dowton SB. (1994) "Serum amyloid A: an acute phase apolipoprotein and precursor of AA amyloid." **Baillieres Clin Rheumatol.** 8(3):553-
 20. Banka CL, Yuan T, de Beer MC, Kindy M, Curtiss LK, de Beer FC. (1995) "Serum amyloid A (SAA): influence on HDL-mediated cellular cholesterol efflux." **J. Lipid Res.** 36(5):1058-65.
 21. van der Westhuyzen DR, Cai L, de Beer MC, de Beer FC. (2005) "Serum amyloid A promotes cholesterol efflux mediated by scavenger receptor B-I." **J. Biol. Chem.** 280(43):35890-5.
 22. Badolato, R, Wang, JM, et al. (1994). "Serum amyloid A is a chemoattractant: induction of migration, adhesion, e tissue infiltration of monocytes and polymorphonuclear leukocytes". **J. Exp. Med.** 180: 203-209.
 23. Badolato R, Johnston JA, Wang JM, MCvivar D, XU LL, Oppenheim JJ, Kelvin DJ. (1995). "Serum amyloid A induces calcium mobilization and chemotaxis of human monocytes by activating a pertussis toxin-sensitive signaling pathway". **J. Immunol.** 55(8): 4004-10,
 24. Olsson N, Siegbahn A, Nilsson G. (1999). "Serum amyloid A induces chemotaxis of human mast cells by activating a pertussis toxin-sensitive signal transduction pathway". **Biochem Biophys Res Commun.** 254(1):143- 146.
 25. Xu, L, Badolato, R, Murphy WJ. (1995). "A novel biologic functions of serum amyloid A: induction of T lymphocyte migration and adhesion". **J. Immunol.** 155:1184-1190.
 26. Björkman L, Karlsson J, Karlsson A, Rabiet MJ, Boulay F, Fu H, Bylund J, Dahlgren C.(2008) "Serum amyloid A mediates human neutrophil production of reactive oxygen species through a receptor independent of formyl peptide receptor like-1." **J Leukoc Biol.** 83(2):245-53
 27. Lee HY, Kim MK, Park KS, Shin EH, Jo SH, Kim SD, Jo EJ, Lee YN, Lee C, Baek SH, Bae YS. (2005) "Serum amyloid A induces contrary immune responses via formyl peptide receptor-like 1 in human monocytes." **Mol.**

- Pharmacol**; 70(1):241-8.
28. He R, Shepard LW, Chen J, Pan ZK, Ye RD. (2006) "Serum amyloid A is an endogenous ligand that differentially induces IL-12 and IL-23." **J. Immunol.** 15; 177(6):4072-9.
 29. Lee HY, Kim MK, Park KS, Bae YH, Yun J, Park JI, Kwak JY, Bae YS. (2005). "Serum amyloid A stimulates matrix-metalloproteinase-9 upregulation via formyl peptide receptor like-1-mediated signaling in human monocytic cells". **Biochem Biophys Res Commun.** 330(3):989-98.
 30. Lee HY, Jo SH, Lee C, Baek SH, Bae YS. (2006) "Differential production of leukotriene B4 or prostaglandin E2 by WKYMVm or serum amyloid A via formyl peptide receptor-like 1." **Biochem Pharmacol.** 72(7):860-8
 31. Christenson K, Björkman L, Tängemo C, Bylund J.(2008) "Serum amyloid A inhibits apoptosis of human neutrophils via a P2X7-sensitive pathway independent of formyl peptide receptor-like 1." **J Leukoc Biol.** 83(1):139-48
 32. Cai H, Song C, Endoh I, Goyette J, Jessup W, Freedman SB, McNeil HP, Geczy CL. (2007) "Serum amyloid A induces monocyte tissue factor." **J. Immunol.** 178(3):1852-60.
 33. Shah C, Hari-Dass R, Raynes JG. (2006) "Serum amyloid A is an innate immune opsonin for Gram-negative bacteria." **Blood**; 108(5):1751-7.
 34. O'Hara R, Murphy EP, Whitehead AS, FitzGerald O, Bresnihan B. (2000) "Acute-phase serum amyloid A production by rheumatoid arthritis synovial tissue." **Arthritis Res.** 2(2):142-4.
 35. Meek RL, Urieli-Shoval S, Benditt EP. (1994) "Expression of apolipoprotein serum amyloid A mRNA in human atherosclerotic lesions and cultured vascular cells: implications for serum amyloid A function." **Proc Natl Acad Sci.** 91(8):3186-90.
 36. Poitou C, Viguerie N, Cancellato R, De Matteis R, Cinti S, Stich V, Coussieu C, Gauthier E, Courtine M, Zucker JD, Barsh GS, Saris W, Bruneval P, Basdevant A, Langin D, Clément, K. (2005) "Serum amyloid A: production by human white adipocyte and regulation by obesity and nutrition." **Diabetologia.** 48(3):519-28.

37. Yang RZ, Lee MJ, Hu H, Pollin TI, Ryan AS, Nicklas BJ, Snitker S, Horenstein RB, Hull K, Goldberg NH, Goldberg AP, Shuldiner AR, Fried SK, Gong DW. (2006) "Acute-phase serum amyloid A: an inflammatory adipokine and potential link between obesity and its metabolic complications." **PLoS Med.** 3(6):e287.
38. Su BS, Gong, W, Gao, LJ, Shen W, Murphy, PM, Oppenheim JJ, Wang, JM. (1999). "A seven-transmembrane, G protein-coupled receptor, FPRL1, mediates the chemotactic activity of serum amyloid A for human fagocytic cells" **J. Exp Med.** 189:395-402.
39. He R, Sang H, Ye RD. (2003). "Serum amyloid A induces IL-8 secretion through a G protein-coupled receptor, FPRL1/LXA4R". **Blood.** 101(4):1572-81.
40. Walder K, Kantham L, McMillan JS, Trevaskis J, Kerr L, De Silva A, Sunderland T, Goldde N, Gao Y, Bishara N, Windmill K, Tene-Brown J, Augebert G, Zimmet PZ, Collier GR. (2002). "Tanis: a link between type 2 diabetes and inflammation?" **Diabetes,** 51(6):859-66.
41. Baranova IN, Visnhnyakova TG, Bocahrov AV, Kurlander R, Chen Z, Kimelman ML, Remaley AT, Csako G, Thomas F, Eggerman TL, Patterson AP. (2005) "Serum amyloid A binding to CLA-1 (CD36 and LIMPII analogous-1) mediates serum amyloid A protein-induced activation of ERK1/2 and p38 mitogen-activated protein kinases". **J Biol Chem.** 280(9): 8031-40.
42. Okamoto H, Katagiri Y, Kiire A, Momohara S, Kamatani N. (2008) "Serum Amyloid A Activates Nuclear Factor-kappaB in Rheumatoid Synovial Fibroblasts Through Binding to Receptor of Advanced Glycation End-products." **J Rheumatol.** 35(5):752-6
43. Kosuge M, Ebina T, Ishikawa T, Hibi K, Tsukahara K, Okuda J, Iwahashi N, Ozaki H, Yano H, Kusama I, Nakati T, Umemura S, Kimura K. (2007) "Serum amyloid A is a better predictor of clinical outcomes than C-reactive protein in non-ST-segment elevation acute coronary syndromes." **Circ J.** 71(2):186-90.

44. Ma J, Chen T, Mandelin J, Ceponis A, Miller NE, Hukkanen M, Ma GF, Konttinen YT. (2003) "Regulation of macrophage activation. **Cell. Mol. Life Sci.** 60(11):2334-46.
45. Akagawa KS. (2002) "Functional heterogeneity of colony-stimulating factor-induced human monocyte-derived macrophages." **Int J Hematol.** 76(1):27-34.
46. Xaus J, Comalada M, Valledor AF, Cardáñá M, Herrero C, Soler C, Lloberas J, Celada A. (2001) "Molecular mechanisms involved in macrophage survival, proliferation, activation or apoptosis." **Immunobiology** 204(5):543-50.
47. Randolph GJ, Inaba K, Robbiani DF, Steinman RM, Muller WA. (1999) "Differentiation of phagocytic monocytes into lymph node dendritic cells in vivo." **Immunity** 11(6):753-61.
48. Gordon, S. (2003) "Alternative activation of macrophages." **Nat. Rev. Immunol.** 3(1):23-35.
49. Beutler B, Rietschel ET. (2003) "Innate immune sensing and its roots: the story of endotoxin." **Nat Rev Immunol.** 3(2):169-76.
50. Palsson, EM, O'Neill, LA. (2004). "Signal transduction by the lipopolysaccharide receptor, *Toll-like* receptor-4". **Immunology**, 113:153-162.
51. Fujihara M, Muroi M, Tanamoto K, Suzuki T, Azuma H, Ikeda H. (2003). "Molecular mechanisms of macrophage activation and deactivation by lipopolysaccharide: roles of the receptor complex." **Pharmacol Ther.** 100(2):171-94.
52. Cohen, J. (2002). "The immunopathogenesis of sepsis". **Nature**, 420:885–891.
53. Anderson KV, Bokla L, Nusslein-Volhard C. (1985). "Establishment of dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo: the induction of polarity by the Toll gene product". **Cell.** 42(3):791-8.
54. Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffmann JA. (1996). "The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/cactus* controls the potent

- antifungal response in *Drosophila* adults". **Cell**, 86(6):973-83.
55. Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA Jr. (1997) "A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity." **Nature**, 388(6640):394-7.
 56. Xu D, Komai-Koma M, Liew FY. (2005) "Expression and function of *Toll-like* receptor on T cells. **Cell Immunol.** 233(2):85-9.
 57. Muzio, M polentarutti, N, Bosisio, D, Prahlanan, MKP, Montovani, A. (2000). "Toll-like receptors: a growing family of immune receptors that are differentially expressed and regulated by different leukocytes". **Journal of Leukol.** 67:450-456.
 58. O'Neill LA, Bowie AG. (2007) "The family of five: TIR-domain-containing adaptors in *Toll-like* receptor signalling." **Nat Rev Immunol.** 7(5):353-64.
 59. Dobrovolskaia MA, Vogel SN. (2002) "Toll receptors, CD14, and macrophage activation and deactivation by LPS." **Microbes Infect.** 4(9):903-14.
 60. Thomas KE, Galligan CL, Newman RD, Fish EN, Vogel SN. (2006) "Contribution of interferon-beta to the murine macrophage response to the *Toll-like* receptor 4 agonist, lipopolysaccharide." **J.Biol.Chem;** 281(41):31119-30.
 61. Watters TM, Kenny EF, Elaine F Kenny, O'Neill LA. (2007) 'Structure, function and regulation of the Toll/IL-1 receptor adaptor proteins." **Immunol Cell Biol** 85: 411-419;
 62. Seong SY, Matzinger P. (2004). "Hydrophobicity: an ancient damage-associated molecular pattern that initiates innate immune responses." **Nat Rev Immunol.** 4(6):469-78.
 63. Nathan C. (1992). "Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells". **FASEB J.** 6(12):3051-64.
 64. Aktan, F. (2004). "iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation. **Life Sciences**, 75:639-53.
 65. Bogdan C. (2001). "Nitric oxide and the immune response". **Nature Immunol.** 2(10): 907-16.

66. Moncada S, Higgs EA. (1991) "Endogenous nitric oxide: physiology, pathology and clinical relevance". **European Journal of Clinical Investigation** 21 (4): 361-74.
67. MacMicking, JQ, Xie W, Nathan C. (1997). Nitric oxide and macrophage function." **Annu. Rev. Immunol.** 15:323.
68. Xie Q, Nathan C. (1994). "The high-output nitric oxide pathway: role and regulation". **J. Leukocyte Biol.** 56:576.
69. Xie Q W., Kashiwabara Y, Nathan C. (1994). "Role of transcription factor NF-B/Rel in induction of nitric oxide synthase." **J. Biol. Chem.** 269:4705.
70. Kleinert H, Pautz A, Liker K, Schwaraz PM. (2004). "Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase". **Eur J Pharmacol.**, 500(1-3): 255-66.
71. Kamijo R, Harada H, Matsuyama T, Bolsland M, Getecitano J, Shapiro D, Le J, Koh SI, Kimura T, Green SJ, et al. (1994) "Requirement for transcription factor IRF-1 in NO synthase induction in macrophages". **Science**, 263 (5153):1612-5.
72. Matsuura M, Saito S, Hirai Y, Okamura H. 2003. "A pathway through interferon-gamma is the main pathway for induction of nitric oxide upon stimulation with bacterial lipopolysaccharide in mouse peritoneal cells" **Eur J Biochem**, 270 (19): 4016-25.
73. Clementi, E, Brown GC, Feelisch M, Moncada S. (1998). Persistent inhibition of cell respiration by nitric oxide: crucial role of S-nitrosylation of mitochondrial complex I and protective action of glutathione. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 95:7631.
74. Umansky V, Hehner SP, Dumont A, Hofmann TG, Schirrmacher V, Dröge W, Schmitz ML. (1998) "Co-stimulatory effect of nitric oxide on endothelial NF-kappaB implies a physiological self-amplifying mechanism." **Eur J Immunol.** 28(8):2276-82.
- 75.: Connelly L, Palacios-Callender M, Ameixa C, Moncada S, Hobbs AJ. (2001) "Biphasic regulation of NF-kappa B activity underlies the pro- and anti-inflammatory actions of nitric oxide." **J Immunol.** 166 (6):3873-81.

76. Grisham MB, Jourdain D, Wink DA. Nitric oxide. (1999) "I. Physiological chemistry of nitric oxide and its metabolites: implications in inflammation." **Am J Physiol.** 276(2 Pt 1):G315-21.
77. Wink DA, Cook JA, Kim SY, Vodovotz Y, Pacelli R, Krishna MC, Russo A, Mitchell JB, Jourdain D, Miles AM, Grisham MB. (1997) "Superoxide modulates the oxidation and nitrosation of thiols by nitric oxide-derived reactive intermediates. Chemical aspects involved in the balance between oxidative and nitrosative stress." **J Biol Chem.** 272(17):11147-51.
78. Wink DA, Mitchell JB. Chemical biology of nitric oxide: Insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. (1998) **Free Radic Biol Med.** 25(4-5):434-56.
79. Lizasoain I, Moro MA, Knowles RG, Darley-Usmar V, Moncada S. (1996). "Nitric oxide and peroxynitrite exert distinct effects on mitochondrial respiration which are differentially blocked by glutathione or glucose". **Biochem. J.** 314:877.
80. Brown GC. (1995). "Nitric oxide regulates mitochondrial respiration and cell functions by inhibiting cytochrome oxidase". **FEBS Lett.** 369:136.
81. Wink, D. A., K. S. Kasprzak, C. M. Maragos, R. K. Elespuru, M. Misra, T. M. Dunams, T. A. Cebula, W. H. Koch, A. W. Andrews, J. S. Allen. (1991). "DNA deaminating ability and genotoxicity of nitric oxide and its progenitors". **Science** 254:1001.
82. Nguyen, T., D. Brunson, C. L. Crespi, B. W. Penman, J. S. Wishnok, S. R. Tannenbaum. (1992). "DNA damage and mutation in human cells exposed to nitric oxide in vitro". **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 89:3030.
83. Choi BM, Pae HO, Jang SI, Kim YM, Chung HT. (2002). "Nitric oxide as a pro-apoptotic as well as anti-apoptotic modulator". **J Biochem Mol Biol.** 35(1):116-26.
84. Coelho AL, Hogaboam CM, Kunkel SL. (2005) "Chemokines provide the sustained inflammatory bridge between innate and acquired immunity." **Cytokine Growth Factor Rev.** 16(6):553-60.
85. Sallusto F, Mackay CR, Lanzavecchia A. (2000) "The role of chemokine

- receptors in primary, effector, and memory immune responses. **Annu. Rev. Immunol.** 18:593-620.
86. Hromas R, Gray PW, Chantry D, Godiska R, Krathwohl M, Fife K, Bell GI, Takeda J, Aronica S, Gordon M, Cooper S, Broxmeyer HE, Klemsz MJ. (1997). "Cloning and characterization of exodus, a novel beta-chemokine". **Blood.** 89(9):3315
87. Nosjean, MCD, Vicari, A., Lebecque, S, Caux, C. (1999). "Regulation of dendritic cell trafficking: a process that involves the participation of selective chemokines". **Journal of Leukocyte Biol.** 66:252-262.
88. Inoue Y, Tsushima H, Ando K, Sawayama Y, Sakai M, Yamasaki R, Matsuo E, Tsutsumi C, Imaizumi Y, Iwanaga M, Imanishi D, Taguchi J, Miyazaki Y, Tomonaga M. (2006) **Exp. Hematol.** 34(1):19-26.
89. Schutyser E, Struyf S, Menten P, Lenaerts JP, Conings R, Put W, Wuyts A, Proost P, Van Damme J. (2000) "Regulated production and molecular diversity of human liver and activation-regulated chemokine/macrophage inflammatory protein-3 alpha from normal and transformed cells." **J Immunol.** 165: 4470-77.
90. Battaglia F, Delfino S, Merello E, Puppo M, Piva R, Varesio L, Bosco MC. (2008) "Hypoxia transcriptionally induces macrophage-inflammatory protein-3alpha/CCL-20 in primary human mononuclear phagocytes through nuclear factor (NF)-kappaB." **J Leukoc Biol.** 83(3):648-62.
91. Scapini P, Laudanna C, Pinardi C, Allavena P, Mantovani A, Sozzani S, Cassatella MA. (2000) "Neutrophils produce biologically active macrophage inflammatory protein-3alpha (MIP-3alpha)/CCL20 and MIP-3beta/CCL19." **Eur J Immunol.** 31(7):1981-8.
92. Scapini P, Crepaldi L, Pinardi, C, Calzetti, F, Cassatella, MA. (2002). CCL20/macrophage inflammatory protein-3 α in LPS-stimulates neutrophils is enhanced by the chemoattractant formyl-methinyl-leucyl-phenilalanine and INF- γ through independent mechanisms. **Eur. J. Immunol**, 32:3515-3524.
93. Ruth JH, Shahrara S, Park CC, Morel JC, Kumar P, Qin S, Koch AE. (2003)

- “Role of macrophage inflammatory protein-3alpha and its ligand CCR6 in rheumatoid arthritis.” **Lab. Invest.** 83(4):579-88.
94. Hoover DM, Boulegue C, Yang D, Oppenheim JJ, Tucker K, Lu W, Lubkowski J. (2002) “The structure of human macrophage inflammatory protein-3alpha /CCL20. Linking antimicrobial and CC chemokine receptor-6-binding activities with human beta-defensins.” **J Biol Chem.** 277(40):37647-54.
95. Campbell AS, Albo D, Kimsey TF, White SL, Wang TN. (2005) “Macrophage inflammatory protein-3alpha promotes pancreatic cancer cell invasion.” **J Surg Res.** 123(1):96-101.
96. Wang L, Liu Q, Sun Q, Zhang C, Chen T, Cao X. (2008) “TLR4 signaling in cancer cells promotes chemoattraction of immature dendritic cells via autocrine CCL20.” **Biochem Biophys Res Commun.** 366(3):852-6.
97. Akagawa KS. (2002) “Functional heterogeneity of colony-stimulating factor-induced human monocyte-derived macrophages.” **Int. J. Hematol;** 76(1):27-34.
98. Sweet MJ, Campbell CC, Sester DP, Xu D, McDonald RC, Stacey KJ, Hume DA, Liew FY. (2002) “Colony-stimulating factor-1 suppresses responses to CpG DNA and expression of *Toll-like* receptor 9 but enhances responses to lipopolysaccharide in murine macrophages.” **J. Immunol.** 168(1):392-9.
99. Chitu V, Stanley ER. (2007). “Colony-stimulating factor-1 in immunity and inflammation.” **Curr. Opin. Immunol.** 18(1):39-48.
100. Varney ML, Olsen KJ, Mosley RL, Singh RK. (2005) “Paracrine regulation of vascular endothelial growth factor--a expression during macrophage-melanoma cell interaction: role of monocyte chemotactic protein-1 and macrophage colony-stimulating factor.” **J. Interferon Cytokine Res.** 25(11):674-83.
101. Ferrara N. (1999). “Molecular and biological properties of vascular endothelial growth factor”. **J Mol. Med.** 77(7):527-543.
102. Ferrara, N. (2002) “VEGF and the quest for tumor angiogenesis factors”.

Nature Reviews Cancer 2: 795-803.

103. Watson, CJ, Webb, NJ, Bottomley, MJ, Brenchley, PEC. (2000). "Identification of polymorphisms within the vascular endothelial growth factor (VEGF) gene: correlation with variation in VEGF protein production". **Cytokine** 18:1232-1235.
104. Du M, Roy KM, Zhong L, Shen Z, Meyers HE, Nichols RC. (2006). "VEGF gene expression is regulated post-transcriptionally in macrophages". **FEBS J.** 273(4):732-45.
105. Salomonsson L, Pettersson S, Englund MC, Wiklund O, Ohlsson BG. (2002). "Post-transcriptional regulation of VEGF expression by oxidized LDL in human macrophages". **Eur J Clin Invest.** 32(10):767-74.
106. Bates DO, Harper SJ. (2002) "Regulation of vascular permeability by vascular endothelial growth factors." **Vascul Pharmacol.** 39(4-5):225-37.
107. Lewin, B. (2004). "Signal transduction". **Genes VII**, Prentice Hall, 811-838.
108. Dong, C, Davis, RJ, Flavell, RA (2002). "MAP kinases in the immune response" **Annu. Rev. Immunol.** 20: 55-72.
109. Boland R, Buitrago C, De Boland AR.(2005). "Modulation of tyrosine phosphorylation signalling pathways by 1alpha, 25 (OH) 2-vitamins D3". **Trends Endocrin Metab.**16 (6):280-7.
110. Schlessinger, J. (2000). "Cell signaling by receptor tyrosine kinases". **Cell**, 103:211-225.
111. Mustelin T, Vang T, Bottini N. (2005). "Protein tyrosine phosphatases and the immune response". **Nat Rev Immunol.** 5(1): 43-57. Review
112. Boyum, A. (1968). "Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood". **Scand. J. Clin Lab. Invest.** 21:77-89.
113. Aida, Y., Pabst, M. J. (1990) Removal of endotoxin from protein solutions by phase separation using Triton X-114. **J Immunol Methods** 132,191-195
114. Ding, AH, Nathan, CF, Stuehr, and DJ. (1988). "Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages: Comparison of activating cytokines and evidence for independent production". **J. Immunol.** 2407-12.

115. Rodriguez D, Cavada BS, Abreu-de-Oliveira JT, de-Azevedo-Moreira R, Russo M. (1992) "Differences in macrophage stimulation and leukocyte accumulation in response to intraperitoneal administration of glucose/mannose-binding plant lectins." **Braz J Med Biol Res.** 25, 823-826.
116. Rodrigues MR, Rodriguez D, Russo M, Campa A. (2002) "Macrophage activation includes high intracellular myeloperoxidase activity." **Biochem Biophys Res Commun.** 292: 869-873.
117. Rodrigues MR, Rodriguez D, Henrique Catalani L, Russo M, Campa A. (2003) "Interferon-gamma independent oxidation of melatonin by macrophages." **J Pineal Res.** 34, 69-74.
118. Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, Van Huffel C, Du X, Birdwell D, Alejos E, Silva M, Galanos C, Freudenberg M, Ricciardi-Castagnoli P, Layton B, Beutler B. (1998) "Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene." **Science** 282, 2085-2088.
119. Biragyn A, Ruffini PA, Leifer CA, Klyushnenkova E, Shakhov A, Chertov O, Shirakawa AK, Farber JM, Segal DM, Oppenheim JJ, Kwak LW. (2002) "*Toll-like* receptor 4-dependent activation of dendritic cells by beta-defensin 2." **Science.** 298:1025-1029.
120. Palliser, D, Huang, Q, Hacohen, N, Lamontagne, SP, Guillen, E, Young, RA, Eisen, HN. (2004) "A role for *Toll-like* receptor 4 in dendritic cell activation and cytolytic CD8+T cell differentiation in response to a recombinant heat shock fusion protein." **J Immunol.** 172, 2885-2893.
121. Biswas, S.K., Sodhi, A., Paul, S. (2001) Regulation of nitric oxide production by murine peritoneal macrophages treated in vitro with chemokine monocyte chemoattractant protein 1. **Nitric Oxide.** 5, 566-579.
122. Sodhi, A., Biswas, S.K. (2001) fmlp-induced in vitro nitric oxide production and its regulation in murine peritoneal macrophages. **J Leukoc Biol.** 71, 262-70.
123. Paul-Clark MJ, McMaster SK, Belcher E, Sorrentino R, Anandarajah J, Fleet M, Sriskandan S, Mitchell JA. (2006) "Differential effects of Gram-positive versus Gram-negative bacteria on NOSII and TNFalpha in macrophages:

- role of TLRs in synergy between the two.” **Br. J. Pharmacol.** 148(8):1067-75.
124. Kim YM, Paik SG. (2005) “Induction of expression of inducible nitric oxide synthase by Taxol in murine macrophage cells” **Biochemical and Biophysical Research Commun.** 326(2):410-16.
 125. Mizel SB, Honko AN, Moors MA, Smith PS, West AP. (2003) “Induction of Macrophage Nitric Oxide Production by Gram-Negative Flagellin Involves Signaling Via Heteromeric *Toll-like* Receptor 5/*Toll-like* Receptor 4 Complexes.” **J Immunol.**170: 6217-6223
 126. Kim SJ, Ha MS, Choi EY, Choi JI, Choi IS. (2005) “Nitric oxide production and inducible nitric oxide synthase expression induced by *Prevotella nigrescens* lipopolysaccharide.” **FEMS Immunol. Med. Microbiol.** 43(1):51-8.
 127. Schroder, K., Sweet, M.J., Hume, D.A. (2006) Signal integration between IFN- γ and TLR signaling pathways in macrophages. **Immunol.** 211, 511-524.
 128. Zhu YN, Yang YF, Ono S, Zhong XG, Feng YH, Ren YX, Ni J, Fu YF, Tang W, Zuo JP. (2006) Differential expression of inducible nitric oxide synthase and IL-12 between peritoneal and splenic macrophages stimulated with LPS plus IFN-gamma is associated with the activation of extracellular signal-related kinase.” **Int. Immunol.** 18(6):981-90.
 129. Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA. (2004). “Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. **J. Leukoc. Biol.** 75(2):163-89.
 130. Bosisio D, Polentarutti N, Sironi M, Bernasconi S, Miyake K, Webb GR, Martin MU, Mantovani A, Muzio M. (2002) “Stimulation of *Toll-like* receptor 4 expression in human mononuclear phagocytes by interferon-gamma: a molecular basis for priming and synergism with bacterial lipopolysaccharide.” **Blood** 99(9):3427-3.
 131. Hortelano S, Castilla M, Torres AM, Tejedor A, Boscá L. (2000). “Potentiation by nitric oxide of cyclosporin A and FK506-induced apoptosis in renal

- proximal tubule cells." **J Am Soc Nephrol.** 11(12):2315-23
132. Tsan MF, Gao B. (2004) "Endogenous ligands of *Toll-like* receptors." **J Leukoc Biol.** 76, 514-519.
133. Brunn GJ, Platt JL. (2006) "The etiology of sepsis: turned inside out". **Trends Mol. Med.** 12(1):10-16.
134. Cicarelli DD, Vieira JE, Benseñor FE. (2008) "Comparison of C-reactive protein and serum amyloid a protein in septic shock patients." **Mediators Inflamm.** 2008:631414.
135. Osterloh A, Kalinke U, Weiss S, Fleischer B, Breloer M. Synergistic and differential modulation of immune responses by Hsp60 and lipopolysaccharide." **J Biol Chem.** 282(7):4669-80.
136. Lee JY., Lowell CA, Lemay, D.G, Youn, H.S., Rhee S.H., Sohn, K.H., Jang, B., Ye, J., Chung, J.H., Hwang, D.H. (2005) The regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase by Src-family tyrosine kinases mediated through MyD88-independent signaling pathways of *Toll-like* receptor 4. **Biochem Pharmacol.** 70, 1231-1340.
137. Zughair SM, Zimmer SM, Datta A, Carlson RW, Stephens DS. (2006) Differential induction of the *Toll-like* receptor 4-MyD88-dependent and - independent signaling pathways by endotoxins." **Infect Immun.** 74 (5):3077.
138. Badolato R, Wang JM, Stornello SL, Ponzi AN, Duse M, Musso T. (2000) Serum amyloid A is an activator of PMN antimicrobial functions: induction of degranulation, phagocytosis, and enhancement of anti-Candida activity. **J Leukoc Biol.** 67:81-386.
139. Mullan RH, Bresnihan B, Golden-Mason L, Markham T, O'Hara R, FitzGerald O, Veale DJ, Fearon U. (2006) "Acute-phase serum amyloid A stimulation of angiogenesis, leukocyte recruitment, and matrix degradation in rheumatoid arthritis through an NF-kappaB-dependent signal transduction pathway." **Arthritis Rheum.** 54(1):105-14.
140. Inoue Y, Tsushima H, Ando K, Sawayama Y, Sakai M, Yamasaki R, Matsuo E, Tsutsumi C, Imaizumi Y, Iwanaga M, Imanishi D, Taguchi J,

- Miyazaki Y, Tomonaga M. (2006) **Exp. Hematol**;34(1):19-26.
141. Bosco MC, Rapisarda A, Massazza S, Melillo G, Young H, Varesio L. (2000) "The tryptophan catabolite picolinic acid selectively induces the chemokines macrophage inflammatory protein-1 alpha and -1 beta in macrophages." **J Immunol.** 164(6):3283-91.
142. Chan H, Perussia B, Gupta JW, Kobayashi M, Pospíšil M, Young HA, Wolf SF, Young D, Clark SC, Trinchieri G. (1991) "Induction of interferon gamma production by natural killer cell stimulatory factor: characterization of the responder cells and synergy with other inducers." **J Exp Med** 173:69-879.
143. Migita K, Abiru S, Nakamura M, Komori A, Yoshida Y, Yokoyama T, Daikoku M, Ueki T, Takii Y, Yano K, Yastuhashi H, Eguchi K, Ishibashi H. (2004) "Lipopolysaccharide signaling induces serum amyloid A (SAA) synthesis in human hepatocytes in vitro." **FEBS Lett.**; 569(1-3):235-9.
144. Chabaud M, Page G, Miossec P. (2001) "Enhancing effect of IL-1, IL-17, and TNF-alpha on macrophage inflammatory protein-3alpha production in rheumatoid arthritis: regulation by soluble receptors and Th2 cytokines. **J. Immunol**; 167(10):6015-20.
145. O'Hara R, Murphy EP, Whitehead AS, FitzGerald O, Bresnihan B. (2000) "Acute-phase serum amyloid A production by rheumatoid arthritis synovial tissue. **Arthritis Res.**2 (2):142-4. Epub 2000 Feb 24.
146. Dai S, Wang X, Liu L, Liu J, Wu S, Huang L, Xiao X, He D. (2007)" Discovery and identification of Serum Amyloid A protein elevated in lung cancer serum." **Sci China C Life Sci**; 50(3):305-11.
147. Liu DH, Wang XM, Zhang LJ, Dai SW, Liu LY, Liu JF, Wu SS, Yang SY, Fu S, Xiao XY, He DC. (2007) "Serum amyloid A protein: a potential biomarker correlated with clinical stage of lung cancer." **Biomed Environ Sci.**; 20(1):33-40.
148. Gruber MF, Gerrard TL. (1992) "Production of macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) by human monocytes is differentially regulated by GM-CSF, TNF alpha, and IFN-gamma." **Cell. Immunol.** 142(2):361-9.

149. Shima DT, Deutsch U, D'Amore PA. (1995) "Hypoxic induction of vascular endothelial growth factor (VEGF) in human epithelial cells is mediated by increases in mRNA stability." **FEBS Lett.** 370:203–208, 1995
150. Varney ML, Olsen KJ, Mosley RL, Singh RK. (2005) "Paracrine regulation of vascular endothelial growth factor--a expression during macrophage-melanoma cell interaction: role of monocyte chemotactic protein-1 and macrophage colony-stimulating factor." **J. Interferon Cytokine Res** 25(11):674-83.
151. Ramanathan M, Giladi A, Leibovich SJ. (2003) "Regulation of vascular endothelial growth factor gene expression in murine macrophages by nitric oxide and hypoxia." **Exp. Biol. Med**; 228(6):697-705.
152. Lee MS, Yoo SA, Cho CS, Suh PG, Kim WU, Ryu SH. (2006) Serum amyloid A binding to formyl peptide receptor-like 1 induces synovial hyperplasia and angiogenesis. **J. Immunol.** 177(8):5585-94.
153. Okutani, D, Lodyga, M, Han, B, Liu M. (2006). "Src protein tyrosine kinase family and acute inflammatory responses." **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.** 291: L129 - L141.
154. Evangelista, V, Pamuklar, Z, Piccoli, A, Manarini, S, Dell'Elba, G, Pecce, R, Martelli, N, Federico, F, Rojas, M, Berton, G, Lowell, C, Totani, L, Smyth, S. (2007) "Src family kinases mediate neutrophil adhesion to adherent platelets." **Blood**: 109(6), 2461-2469.
155. Neumeister P, Pixley FJ, Xiong Y, Xie H, Wu K, Ashton A, Cammer M, Chan A, Symons M, Stanley ER, Pestell RG. (2003) "Cyclin D1 governs adhesion and motility of macrophages. **Mol. Biol. Cell.** 14(5):2005-15.
156. Leslie K, Lang C, Devgan G, Azare J, Berishaj M, Gerald W, Kim YB, Paz K, Darnell JE, Albanese C, Sakamaki T, Pestell R, Bromberg J. (2006) "Cyclin D1 is transcriptionally regulated by and required for transformation by activated signal transducer and activator of transcription 3." **Cancer Res.** 66(5):2544-52.
157. Leicht DT, Balan V, Kaplun A, Singh-Gupta V, Kaplun L, Dobson M, Tzivion G. (2007) "Raf kinases: Function, regulation and role in human

cancer.”

158. Cox BD, Natarajan M, Stettner MR, Gladson CL. (2006) ‘New concepts regarding focal adhesion kinase promotion of cell migration and proliferation.” **J. Cell. Biochem.** 99(1):35-52.
159. Nakashima I, Takeda K, Kawamoto Y, Okuno Y, Kato M, Suzuki H.(2006) “Redox control of catalytic activities of membrane-associated protein tyrosine kinases. **Arch. Biochem. Biophys.** 434(1):3-10.
160. Kim SH, Kim J, Sharma RP. (2006) “Inhibition of p38 and ERK MAP kinases blocks endotoxin-induced nitric oxide production and differentially modulates cytokine expression.” *Pharmacol. Res*; 49(5): 433-9.
161. Leu TH, Charoenfuprasert S, Yen CK, Fan CW, Maa MC. (2006) “Lipopolysaccharide-induced c-Src expression plays a role in nitric oxide and TNFalpha secretion in macrophages. **Mol. Immunol.**; 43(4):308-16.

Anexos

11 ANEXOS

11.1 Anexo I - Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de Mestrado/Doutorado



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Secretaria de Pós-Graduação

Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de Mestrado/Doutorado

1. O candidato fará uma apresentação oral do seu trabalho, com duração máxima de trinta minutos.

2. Os membros da banca farão a argüição oral. Cada examinador disporá, no máximo, de trinta minutos para argüir o candidato, exclusivamente sobre o tema do trabalho apresentado, e o candidato disporá de trinta minutos para sua resposta.

2.1 Com a devida anuência das partes (examinador e candidato), é facultada a argüição na forma de diálogo em até sessenta minutos por examinador.

3. A sessão de defesa será aberta ao público.

4. Terminada a argüição por todos os membros da banca, a mesma se reunirá reservadamente e expressará na ata (relatório de defesa) a aprovação ou reprovação do candidato, baseando-se no trabalho escrito e na argüição.

4.1 Caso algum membro da banca reprove o candidato, a Comissão Julgadora deverá emitir um parecer a ser escrito em campo exclusivamente indicado na ata.

4.2 Será considerado aprovado o aluno que obtiver aprovação por unanimidade ou pela maioria da banca.

5. Dúvidas poderão ser esclarecidas junto à Secretaria de Pós-Graduação: pgfarma@usp.br, (11) 3091 3621.

São Paulo, 18 de março de 2005.

Profa. Dra. Bernadette D. G. M. Franco
Presidente da CPG/FCF/USP

11.2 Anexo II - Aprovação do Comitê de Ética FCF-USP



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Comitê de Ética em Pesquisa - CEP

Ofício CEP nº 013/2004

São Paulo, 01 de março de 2004.

Ilmo(a) Sr(a).
Silvana Sandri

Vimos informar que o Comitê de Ética em Pesquisa da FCF/USP, em reunião realizada em 16 de fevereiro passado, **APROVOU** o projeto "Expressão de RNAm e liberação de BLys, G-CSF e VEGF induzida por Amilóide Sérica A em neutrófilos" (Protocolo nº 224) apresentado por Vossa Senhoria, devendo apenas:

- 1) Tornar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido mais simples para fácil entendimento dos indivíduos da pesquisa.
- 2) Anexar Termo de Responsabilidade.
- 3) Anexar Declaração de Tornar Público os Resultados.

Lembramos que após a execução de 50% do cronograma do projeto, deverá ser apresentado um relatório parcial, de acordo com o Artigo 18 – item C, da Portaria FCF-1111/97.

Atenciosamente,

Prof.ª. Dr.ª. Valentina Porta

Vice-Coordenadora do Comitê de Ética
em Pesquisa da FCF/USP

Orientador: Prof. Ana Campa
FBC

11.3 Anexo III – Aprovação do Comitê de Ética em Experimental Animal



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Comissão de Ética em Experimentação Animal - CEEA

Ofício CEEA nº 31/2006

São Paulo, 10 de maio de 2006.

Ilmo(a) Sr(a).
Silvana Sandri
Orientador: Ana Campa
FBC

Prezado(a) Senhor(a),

A Comissão de Ética em Experimentação Animal – CEEA da FCF/USP, em reunião realizada em 10 de abril do corrente, **APROVOU** o projeto “Amilóide Sérica A (SAA): ação sobre células monocíticas e angiogênese” (Protocolo CEEA nº 103), apresentado por Vossa Senhoria solicitando apenas o que segue:

a) Esclarecimento sobre a possibilidade de ser usado analgésico no pós-operatório;

Sendo o que nos cumpre, reiteramos protestos de estima e consideração.

Atenciosamente,

Prof. Dra. Lígia Ferreira Gomes
Presidente da CEEA

11.4 Anexo IV - Ficha do Aluno

Janus

- Sistema Administrativo da Pós-Graduação



Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9136 - 5083621/1 - Silvana Sandri

Email: ssandri@usp.br

Data de Nascimento: 05/08/1978

Cédula de Identidade: RG - 1057508325 - RS

Local de Nascimento: Estado do Rio Grande do Sul

Nacionalidade: Brasileira

Graduação: Farmacêutico - Universidade do Vale do Itajaí - Santa Catarina - Brasil - 1999

Curso: Doutorado Direto

Programa: Farmácia (Análises Clínicas)

Área: Análises Clínicas

Data de Matrícula: 04/02/2004

Início da Contagem de Prazo: 04/02/2004

Data Limite: 03/06/2008

Orientador: Prof(a). Dr(a). Ana Campa - 04/02/2004 a 04/08/2008 E.Mail: anacampa@usp.br

Proficiência em Línguas: Inglês, Aprovado em 04/05/2005

Prorrogação: 120 dias
Período de 04/02/2008 a 03/06/2008

Prazo para Aprovação no Exame de Qualificação Segundo Regimento da Pós da 03/12/2007 (verifique em sua CPG se ela possui um prazo anterior)

USP:

Data de Aprovação no Exame de Qualificação: Aprovado em 30/07/2007

Data do Depósito do Trabalho: 03/06/2008

Título do Trabalho: "Amilóide sérica A: efeitos biológicos sobre células mononucleares"

Data Máxima para Aprovação da Banca: 02/08/2008

Data de Aprovação da Banca: 20/06/2008

Data Máxima para Defesa: 18/09/2008

Data da Defesa: 04/08/2008

Resultado da Defesa: Aprovado

Histórico de Ocorrências:

Ingressou no Doutorado Direto em
04/02/2004

Prorrogação em 30/11/2007

Titulado em 04/08/2008

Situação Atual: Titulado em 04/08/2008

Impresso em: 29/08/08 08:26:02

Janus

- Sistema Administrativo da Pós-Graduação



Universidade de São Paulo

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9136 - 5083621/1 - Silvana Sandri

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred. Freq.	Conc. Exc.	Sit. Matric.
BMI5862-4/2	Seminário Didático-científico em Imunologia I	04/03/2004	16/06/2004	45	3	100.0 A N	Concluída

FBC5723-3/1	Mecanismos das Interações Patológicas entre Células Endoteliais e Elementos Circulantes e sua Importância em Processos Vaso-oclusivos	08/03/2004	11/04/2004	105	7	95.0	B	N	Concluída
FBC5793-7/4	Seminários em Análises Clínicas	07/04/2004	20/07/2004	30	2	100.0	A	N	Concluída
FBC5735-1/3	Aspectos da Biologia e Bioquímica de Neutrófilos	06/09/2004	26/09/2004	90	6	100.0	A	N	Concluída
FBC5748-1/2	Trabalhos Científicos: da Elaboração à Publicação	03/03/2005	11/05/2005	60	4	90.0	A	N	Concluída
EDM5791-4/5	Metodologia do Ensino Superior (Faculdade de Educação - Universidade de São Paulo)	17/08/2005	02/12/2005	120	0	0.0	-	N	Matrícula cancelada
MPT5760-3/1	Metodologia de Ensino I: Preparação Pedagógica (Faculdade de Medicina - Universidade de São Paulo)	11/08/2006	03/10/2006	75	5	93.3	B	N	Concluída
BMI5878-2/1	Tópicos em genômica funcional	20/10/2006	30/11/2006	90	6	100.0	A	N	Concluída
FBC5815-1/2	Metodologias "Omics" para Estudos Toxicológicos (1)	22/04/2008	28/04/2008	30	2	90.0	A	N	Concluída

Disciplinas:	25	25	35
Atividades Programadas:			
Seminários:			
Estágios:			
Total:	25	25	35

Créditos Atribuídos à Tese: 167

Observações:

1) Disciplina(s) cursada(s) voluntariamente pelo(a) candidato(a) após ter cumprido as exigências regulamentares.

Conceito até 31/12/1996:

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; D - Insuficiente, sem direito a crédito; E - Reprovado, sem direito a crédito; I - Incompleto; J - Abandono Justificado; T - Transferência.

Um(1) crédito equivale a 12 horas de atividade programada.

Conceito a partir de 02/01/1997:

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.

Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Situação Atual: Titulado em 04/08/2008

Impresso em: 29/08/08 08:26:02



Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9136 - 5083621/1 - Silvana Sandri

Comissão julgadora:

NUSP	Nome	Vínculo	Função
55700	Ana Campa	FCF - USP	Presidente
85711	Ligia Ferreira Gomes	FCF - USP	Membro
2084641	Suzana Beatriz Verissimo de Mello	FM - USP	Membro
2086358	Cristoforo Scavone	ICB - USP	Membro
3442534	Sandro Rogerio de Almeida	FCF - USP	Membro

Situação Atual: Titulado em 04/08/2008

Impresso em: 29/08/08 08:26:02

11.5 *Anexo V - Curriculum Lattes*

Silvana Sandri
Curriculum Vitae

Agosto/2008

Silvana Sandri

Curriculum Vitae

Dados Pessoais

Nome Silvana Sandri

Nome em citações bibliográficas SANDRI, S

Nascimento 05/08/1978 - Ronda Alta/RS - Brasil

Endereço residencial Rua Itatiaia, 91 Apto:81

Vila Guarani, Sao Paulo

04310-010, SP - Brasil

Endereço profissional Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências

Farmacêuticas

Rua: Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco-17, sala 25

Butantã - Sao Paulo

05508-000, SP - Brasil

Telefone: 11 30913741

Endereço eletrônico

e-mail para contato : ssandri@usp.br

e-mail alternativo : ssandri@usp.br

Formação Acadêmica/Titulação

2004 -

Universidade de São Paulo, USP, Sao Paulo, Brasil

Título: Amilóide Sérica A (SAA): efeitos biológicos sobre células mononucleares, Ano de obtenção: 2008

Orientador: Ana Campa

Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

Palavras-chave: Amilóide sérica A (SAA), células mononucleares, quimiocinas, óxido nítrico (NO)

Áreas do conhecimento : Farmácia,Imunologia Celular,Bioquímica

1996 - 2001

Graduação em farmácia-Bioquímica.

Universidade do Vale do Itajaí, UNIVALI, Itajai, Brasil

Título: UTILIZAÇÃO DO POLÍMERO QUITOSANA-FERRO(III) COMO ADSORVENTE ORAL NO TRATAMENTO DE HIPERFOSFATEMIA: estudos "in vitro e in vivo"

Orientador: Cristiani Bürger, Clóvis Antônio Rodrigues

Formação complementar

2000 - 2000 Curso de curta duração em Curso de Atualização em Citopatologia.

Universidade do Vale do Itajaí, UNIVALI, Itajai, Brasil

Palavras-chave: Citologia

2003 - 2003 Curso de curta duração em Curso de Atualização em Hematologia. Pontifícia Universidade Católica do Paraná, PUC-PR, Curitiba, Brasil

Palavras-chave: Anemias

Atuação profissional

1. Universidade de São Paulo - USP

Vínculo institucional

2004 - Atual Vínculo: Pós graduação ,
Enquadramento funcional: Bolsista, Regime:
Dedicação Exclusiva

2. Laboratório Glauco Cesario Pereira - LGCP

Vínculo institucional

2001 - 2003 Vínculo: Farmacêutico- Bioquímico , Enquadramento funcional: Livre , Carga horária: 40, Regime: Dedicção Exclusiva

Outras informações:

Bioquímica responsável pelos Setores:Hematologia, Parasitologia e Urinálises

3. Serviço Nacional de Aprendizado Comercial - SENAC

Vínculo institucional

2003 - 2003 Vínculo: Farmacêutico , Enquadramento funcional: Livre , Carga horária: 10, Regime: Parcial

Outras informações:

Aulas ministradas de Legislação Farmacêutica para estudantes do Curso de Capacitação - Atendente de Farmácia

Áreas de atuação

1. Bioquímica
 2. Metabolismo e Bioenergética
 3. Imunologia
 4. Imunologia Celular
-
-

Idiomas

Inglês Compreende Bem , Fala Bem, Escreve Bem, Lê Bem

Espanhol Compreende Razoavelmente , Fala Pouco, Escreve Pouco, Lê Razoavelmente

Produção em C, T & A

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1. SANDRI, S., RODRIGUEZ, D., Gomes, E., MONTEIRO, H. P., RUSSO, M., CAMPA, A.

Is serum amyloid A an endogenous TLR4 agonist?. *Journal of Leukocyte Biology.* , v.83, p.1174 - , 2008.

2. BURGER, C., VALCARENGHI, D., SANDRI, S., RODRIGUES, C. A.

Cross-linking chitosan-Fe(III), an oral phosphate binder: studies in vitro and in vivo.. *International Journal of Pharmaceutics.* , v.31, p.29 - 33, 2001.

Palavras-chave: cross-linked chitosan iron (III), Hyperphosphatemia, Phosphate

Áreas do conhecimento : Farmácia

Artigos aceitos para publicação

1. SANDRI, S., FRANCO, A. G., PEDROSA, A. M. C., MONTEIRO, H. P., CAMPA, A.

Serum Amyloid A induces CCL20 secretion in mononuclear cells through MAPK (p38 and ERK1/2) signaling pathways. *Immunology Letters.* , 2008.

Palavras-chave: células mononucleares, Amilóide sérica A (SAA), quimiocinas

Áreas do conhecimento : Imunologia Celular

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. SANDRI, S., MONTEIRO, H. P., CAMPA, A.

PERFIL DE FOSFORILAÇÃO DE PROTEÍNAS TIROSINA QUINASES INDUZIDO PELA AMILÓIDE SÉRICA A EM CÉLULAS THP-1 In: XXII Reunião Anual da FeSBE, 2008, Águas de Lindóia.

XXII Reunião Anual da FeSBE. , 2008.

Palavras-chave: sinalização celular

Referências adicionais : Brasil/Português.

2. FRANCO, A. G., SANDRI, S., CAMPA, A.

Proteína Amilóide sérica A versus LPS: efeitos da HDL na produção de citocinas pró-inflamatórias por monócitos estimulados In: XXIII Reunião Anual da FeSBE, 2008, Águas de Lindóia.

XXIII Reunião Anual da FeSBE. , 2008.

Palavras-chave: Amilóide sérica A (SAA), células mononucleares

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Meio digital

3. FRANCO, A. G., SANDRI, S., OKADA, S.S., CAMPA, A.

LIBERAÇÃO DE TNF-alpha INDUZIDA PELA AMILÓIDE SÉRICA A: EFEITOS DE DIFERENTES CONDIÇÕES DE CULTURA. In: XXII Reuniao Anual Federação de Sociedades de Biologia Experimental, 2007, Águas de Lindóia.

XXII Reuniao Anual Federação de Sociedades de Biologia Experimental. ,

2007.

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Meio digital

4. SANDRI, S., FRANCO, A. G., PEDROSA, A. M. C., CAMPA, A.

Serum Amyloid A (SAA) is an inducer of Macrophage Inflammatory Protein- 3 alpha (MIP-3alpha) in human mononuclear cell In: 8th World Congress on Inflammation, 2007, Copenhagen.

Inflammation Research. , 2007. v.56. p.S376 - S376

Referências adicionais : Dinamarca/Inglês. Meio de divulgação: Impresso

5. SANDRI, S., PEDROSA, A. M. C., CAMPA, A.

Macrophage Inflammatory Protein-3alpha (MIP-3alpha) as an element in the maintenance of a pro-inflammatory condition mediated by Serum Amyloid A (SAA) In: XXXI Meeting of the Brazilian Society for Immunology, 2006, Búzios.

XXXI Meeting of the Brazilian Society for Immunology - Signaling in the Immune System. , 2006. p.35 -

Referências adicionais : Brasil/Inglês. Meio de divulgação: Impresso

6. SANDRI, S., RODRIGUEZ, D., MONTEIRO, H. P., RUSSO, M., CAMPA, A.

Serum Amiloyd A (SAA) is an inducer of NO production in macrophages In: Recent Advances in Pattern Recognition - TOLL 2006, 2006, Salvador -BA.

Recent Advances in Pattern Recognition - TOLL 2006. , 2006.

Referências adicionais : Brasil/Inglês. Meio de divulgação: Impresso

7. SANDRI, S., MONTEIRO, H. P., RUSSO, M., CAMPA, A.

Serum amyloid A (SAA), an autologous mammalian protein that exerts similar properties of bacterial products. In: 34 Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular - SBBq, 2005, Águas de Lindóia -SP.

CD-Room -34 Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular - SBBq. , 2005.

Referências adicionais : Brasil/Inglês. Meio de divulgação: Meio digital

8. SANDRI, S., MONTEIRO, H. P., RUSSO, M., CAMPA, A.

Serum amyloid A (SAA), an autologous mammalian protein that exerts similar properties of bacterial products. In: X Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia, 2005, São Paulo.

X Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia. , 2005.

Palavras-chave: Amilóide sérica A (SAA), quimiocinas, óxido nítrico (NO), sinalização celular

Áreas do conhecimento : Bioquímica, Metabolismo e Bioenergética

Referências adicionais : Brasil/Inglês. Meio de divulgação: Meio digital

9. VALCARENGHI, D., RODRIGUES, C. A., BURGER, C., SANDRI, S.

ESTUDOS IN VIVO DA UTILIZAÇÃO DO POLÍMERO QUITOSANA-FERRO (III) COMO ADSORVENTE ORAL NO TRATAMENTO DA HIPERFOSFATEMIA In: 23 Reunião Anual Sociedade Brasileira de Química, 2000, Poços de Caldas.

Anais da 23 Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. , 2000. v.2.

Palavras-chave: quitosana- Fe (III), hiperfosfatemia

Áreas do conhecimento : Farmácia

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso

10. VALCARENGHI, D., SANDRI, S., BURGER, C., RODRIGUES, C. A.

QTS-Fe (III) Reticulado. Um novo adsorvente oral no tratamento de Hiperfosfatemia: estudos In: V seminário Integrado de Iniciação Científica, 1999, Joaçaba/SC.

Anais doV Seminário Integrado de Iniciação Científica. Itajaí/SC: UNIVALI, 1999. p.219 - 219

Palavras-chave: hiperfosfatemia, quitosana- Fe (III)

Áreas do conhecimento : Farmácia

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso

11. VALCARENGHI, D., SANDRI, S., BURGER, C., RODRIGUES, C. A.

QTS-Fe(III) reticulado, um novo adsorvente oral no tratamento de hiperfosfatemia: estudos in vitro. In: V Seminário Integrado de Iniciação Científica, 1999, Joaçaba - SC.

V seminário integrado de iniciação científica. , 1999. p.219 -

Palavras-chave: quitosana- Fe (III), Hiperphosphatemia

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso

12. VALCARENGHI, D., SANDRI, S., BURGER, C., RODRIGUES, C. A.

Utilização do polímero QTS-Fe(III) como adsorvente oral no tratamento de hiperfosfatemia: estudos in vitro In: : 22ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira

de Química, 1999, Poços de Caldas.

Livro de resumos da 22ª reunião anual da SBQ. , 1999. v.2. p.QB026 -

Palavras-chave: quitosana- Fe (III), Hiperphosphatemia

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso

13. VALCARENGHI, D., SANDRI, S., BURGER, C., RODRIGUES, C. A.

Utilização do polímero QTS-Fe(III) reticulado como adsorvente oral no tratamento de hiperfosfatemia: estudos in vitro In: I Jornada de Estudos Farmacêuticos, 1999, Itajaí -SC.

I Jornada de Estudos Farmacêuticos. , 1999.

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso

Demais produções bibliográficas

1. SANDRI, S., CAMPA, A.

Efeitos biológicos e mecanismos de ação da Amilóide sérica A (SAA): produção de óxido nítrico, indução de citocinas e sinalização celular em células monocíticas, 2005. (Conferência ou palestra, Apresentação de Trabalho)

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Outro; Local: Faculdade de Farmácia; Cidade: Itajaí; Inst.promotora/financiadora: Universidade do Vale do Itajaí

2. SANDRI, S., FRANCO, A. G., PEDROSA, A. M. C., CAMPA, A.

Serum Amyloid A (SAA) is an inducer of Macrophage Inflammatory Protein- 3 alpha (MIP-3alpha) in human mononuclear cells, 2007.

(Congresso, Apresentação de Trabalho)

Palavras-chave: células mononucleares, quimiocinas, Amilóide sérica A (SAA)

Áreas do conhecimento : Imunologia Celular

Referências adicionais : Dinamarca/Inglês. Meio de divulgação: Impresso; Local: Copenhagen Conference Center - Bella Center, Copenhagen, Denmark; Cidade: Copenhagen - Denmark; Evento: 8th World Congress on Inflammation

Eventos

Participação em eventos

1. Apresentação de Poster / Painel no(a) **XXII Reunião Anual da FeSBE, 2008.**

(Congresso)

PERFIL DE FOSFORILAÇÃO DE PROTEÍNAS TIROSINA QUINASES INDUZIDO PELA AMILÓIDE SÉRICA A EM CÉLULAS THP-1.

2. Apresentação de Poster / Painel no(a) **XXII Reuniao Anual Federação de Sociedades de Biologia Experimental, 2007.** (Congresso)

LIBERAÇÃO DE TNF-alpha INDUZIDA PELA AMILÓIDE SÉRICA A: EFEITOS DE DIFERENTES CONDIÇÕES DE CULTURA..

3. Apresentação Oral no(a) **8th World Congress on Inflammation, 2007.**

(Congresso)

Serum Amyloid A (SAA) is an inducer of Macrophage Inflammatory Protein-3 alpha (MIP-3alpha) in human monuclear cells.

4. Apresentação de Poster / Painel no(a) **Serum Amyloid A (SAA) is an inducer of NO production in macrophages**, 2006. (Congresso)

TOLL 2006 - Recents Advances in Pattern Recognition.

5. Apresentação de Poster / Painel no(a) **Serum Amyloid A (SAA), an autologous mammalian protein that exerts similar properties of bacterial.**, 2005. (Seminário)

X Semana Farmacêutica e Tecnologia.

6. Apresentação de Poster / Painel no(a) **Serum Amyloid A (SAA), an autologous mammalian protein that exerts similar properties of bacterial products.**, 2005. (Congresso)

XXXIV Reunião Anual da SBBq.

7. **Micologia**, 2003. (Seminário)

.

8. **XI Encontro Estadual de Farmacêuticos e Bioquímicos, IX Congresso Catarinense de Farmacêuticos e Bioquímicos - Urinálise, Principais Alterações no Exame de Urina**, 2002. (Congresso)

XI Encontro Estadual de Farmacêuticos e Bioquímicos, IX Congresso Catarinense

de Farmacêuticos e Bioquímicos - Urinálise Principais alterações no Exame de Urina.

9. Apresentação de Poster / Painel no(a) . **ESTUDOS IN VIVO DA UTILIZAÇÃO DO POLÍMERO QUITOSANA-FERRO (III) COMO ADSORVENTE ORAL NO TRATAMENTO DA HIPERFOSFATEMIA**, 2000. (Congresso)

23 Reunião Anual Sociedade Brasileira de Química.

10. **IX Encontro Estadual de Farmacêuticos e Bioquímicos**, 2000. (Congresso)

.

11. **II Jornada Farmacêutica da UNIVALI e III CAIQFAR.**, 2000. (Congresso)

.

12. Apresentação de Poster / Painel no(a) . **Utilização do polímero QTS-Fe(III) como adsorvente oral no tratamento de hiperfosfatemia: estudos in vitro**, 1999. (Congresso)

: 22ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química.

13. Apresentação de Poster / Painel no(a) **Utilização do polímero QTS-Fe(III) reticulado como adsorvente oral no tratamento de hiperfosfatemia: estudos in vitro**, 1999. (Outra)

I Jornada de estudos farmacêuticos.

14. Apresentação de Poster / Painel no(a) **QTS-Fe (III) Reticulado. Um novo adsorvente oral no tratamento de Hiperfosfatemia: estudos in vitro.**, 1999.

(Seminário)

V Seminário Integrado de Iniciação Científica.

15. **I Jornada Farmacêutica da UNIVALI - Curso de Atualização em Análises Clínicas.**, 1999. (Simpósio)

.

16. **III Jornada de Farmácia Hospitalar do RS**, 1998. (Congresso)

Totais de produção

Produção bibliográfica

Artigos completos publicado em periódico.....	2
Artigos aceitos para publicação.....	1
Trabalhos publicados em anais de eventos.....	13
Apresentações de Trabalhos (Conferência ou palestra).....	1
Apresentações de Trabalhos (Congresso).....	1

Eventos

Participações em eventos (congresso).....	11
Participações em eventos (seminário).....	3
Participações em eventos (simpósio).....	1

Participações em eventos (outra)..... 1

Citações em bases bibliográficas

Web of Science Número total de citações : 5;Número de trabalhos : 2Data :

27/08/2008; Fator H: 2;

Nome(s) do autor utilizado(s) na consulta para obter o total de citações:

Sandri,S

11.6 Anexo VI – Trabalhos

1) Trabalho publicado no período

- ✓ *Is serum amyloid A an endogenous TLR4 agonist?* *J Leukoc Biol.* 2008, 83(5):1174

2) Trabalho aceito para publicação

- ✓ *Serum amyloid A induces CCL20 secretion in mononuclear cells through MAPK (p38 and ERK1/2) signaling pathways .* *Immunol Lett.* 2008, in press

*Is serum amyloid A an endogenous
TLR4 agonist?*

Is serum amyloid A an endogenous TLR4 agonist?

Silvana Sandri,* Dunia Rodriguez,† Eliane Gomes,† Hugo Pequeno Montelro,‡
Montchilo Russo,^{†,1} and Ana Campa*

Departments of *Clinical Analysis and Toxicology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, and †Immunology, Biomedical Science Institute, University of São Paulo, Brazil; and ‡Department of Biochemistry/Molecular Biology/UNIFESP, São Paulo, Brazil

Abstract: Serum amyloid A (SAA), a classical acute-phase protein, is produced predominantly by hepatocytes in response to injury, infection, and inflammation. It has been shown that SAA primes leukocytes and induces the expression and release of proinflammatory cytokines. Here, we report that SAA induces NO production by murine peritoneal macrophages. Using specific inhibitors, we showed that NO production was dependent on inducible NO synthase through the activation of ERK1/2 and p38 MAPKs. Moreover, SAA activity was decreased after proteolysis but not with polymyxin B, a lipid A antagonist. Finally, we found that NO production was dependent on functional TLR4, a receptor complex associated with innate immunity. Macrophages from C3H/HeJ and C57BL/10SeCr mice lacking a functional TLR4 did not respond to SAA stimulation. In conclusion, our study makes a novel observation that SAA might be an endogenous agonist for the TLR4 complex on macrophages. The contribution of this finding in amplifying innate immunity during the inflammatory process is discussed. *J. Leukoc. Biol.* 83: 1174–1180; 2008.

Key Words: Toll like receptors · macrophages · nitric oxide (NO)

INTRODUCTION

Infection, trauma, inflammation, stress, and other injuries can provoke an archetypical range of physiological changes, collectively known as acute-phase response. Part of this response consists of an increased production and release of specific acute-phase proteins such as serum amyloid A (SAA), C-reactive protein, mannose-binding protein, and others [1]. The production of SAA as well as other acute-phase proteins is usually triggered by inflammatory cytokines such as IL-6, IL-1, and TNF- α . These cytokines are produced mainly by activated macrophages and monocytes but also by endothelial cells, lymphocytes, and other cells [2]. SAA appears to have a broad range of biological activities that includes immunomodulation, tissue remodeling [3], and immunosurveillance [2]. We have characterized the immunomodulatory properties of SAA in neutrophils by showing that SAA induces the expression and release of

inflammatory cytokines and enhanced response to opsonized particles [4–7]. Others have shown that SAA mobilizes intracellular calcium and stimulates cyclooxygenase-2 expression and PGE₂ synthesis [8–10].

A plethora of reports in recent years has shown that a number of endogenous molecules might also be potent activators of TLRs (reviewed in ref. [11]). For instance, Ohishi et al. [12], using macrophages from C3H/HeJ mice with point mutation in the Tlr4 gene, demonstrated that macrophage stimulation by recombinant human heat shock protein 60 (rhHsp60) required functional TLR4.

In the present study, we determined whether SAA is capable of activating TLR4. For this, we monitored the production of NO by peritoneal macrophages stimulated with SAA in TLR4-sufficient and TLR4-deficient mice strains. As TLR4 signaling includes the adaptor molecule MyD88 and activation of MAPKs, we also investigated whether MyD88 deficiency or inhibition of specific MAPKs influences NO production induced by SAA.

Here, we show that macrophage activation by SAA is TLR4-dependent. The downstream pathways involved in SAA-induced NO production include ERK1/2 and p38 activation but not the MyD88 pathway. We suggest that SAA might be an endogenous TLR4 agonist.

MATERIALS AND METHODS

Reagents

PeprTech Inc. (Rocky Hill, NJ, USA) supplied the rhSAA. According to the supplier, the amount of endotoxin contaminant is lower than 0.1 ng/1 μ g protein, and purity is greater than 98%, as assessed by SDS-PAGE gel and HPLC analyses. Con A, RPMI 1640, and streptomycin were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Calbiochem Novabiochem Corp. (San Diego, CA, USA) supplied polymyxin B, PD98059, and SB203580. Protease K was purchased from Invitrogen (San Diego, CA, USA). R&D Systems (Minneapolis, MN, USA) supplied the anti-mouse TNF- α antibody.

¹ Correspondence: Department of Immunology, Biomedical Science Institute, University of São Paulo, Av: Prof. Lineu Prestes, 1720, CEP 05505-000, São Paulo, SP, Brazil. E-mail: montchilo@fbc.usp.br

Received April 2, 2007; revised November 6, 2007; accepted November 20, 2007.

doi: 10.1189/jlb.0407203

Animals

Female C57BL/6, C57BL/6Pas, C3H/HeJ, C57BL/10ScCr, and M μ D88^{-/-}, 4- to 8-week-old mice under standard pathogen-free conditions, were bred in the breeding unit of the Institute of Biomedical Sciences (São Paulo, Brazil). The Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo Ethical Committee (Brazil), approved all experiments.

Administration of Con A

When indicated, the animals were injected i.p. with 20 μ g Con A (Con A-primed macrophages) or sterile saline (resident macrophages) and were killed 48 h after treatment.

Cells and cell culture

Macrophages were obtained from mice by washing their peritoneal cavity with 5 ml ice-cold PBS. The cells from individual mice were centrifuged (100 g, 10 min, 4°C), resuspended in complete RPMI-1640 medium, and adjusted to 2.0×10^6 cells/ml. Total and differential cell counts were performed on fixed and stained cell suspensions with 0.05% crystal violet dissolved in 2% acetic acid (final solution). Cell suspensions used in all experiments consisted of at least 85% macrophages, as judged by morphological criteria. For culturing, 100 μ l cell suspension was plated into each well of 96-well, flat-bottom, tissue-culture plates (Corning, Corning, NY, USA), and cultures were incubated at 37°C and 5% CO $_2$.

NO production

NO production was quantified by measuring the accumulation of the stable, oxidative metabolite, nitrite (NO $_2^-$) in culture supernatants by the standard Griess reaction as described previously [12]. All determinations were performed in duplicate and expressed as nanomoles concentration of NO.

Inhibitors of MAPK

The experiments with MAPK include the use of 10 μ M SB203580 (a p38 MAPK inhibitor) or 50 μ M PD98059 (a MAPK ERK, MEK-1). These inhibitors were preincubated with macrophages for 15 min before the administration of SAA and then cultured for 24 h.

Inducible NO synthase (iNOS) expression

iNOS expression was measured by Western blot analysis of total cell lysates. Briefly, cells were lysed in buffer containing 20 mM Hepes, 150 mM NaCl, 1.5 mM MgCl $_2$, 1 mM EGTA, 10% glycerol, 1% Triton X-100, aprotinin (1 μ g/ml), leupeptin (1 μ g/ml), and 1 mM PMSF, pH 7.5, containing phosphatase inhibitors. Total cell lysates (20 μ g/lane) were resolved in 8% SDS-polyacrylamide gel and blotted onto nitrocellulose sheets. Blots were probed using polyclonal antibody against iNOS (BD Transduction Laboratories, BD Biosciences, San Jose, CA, USA), diluted at 1:1000. After incubation with an appropriate HRP-conjugated secondary antibody, blots were developed using the Pierce system.

Measurement of endotoxin activity

The endotoxin activities of rhSAA and LPS from *Escherichia coli* O111:B4 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) were determined using the Limulus amoebocyte lysate (LAL) assay kit (BioWhittaker, Walkersville, MD, USA), which was performed according to the manufacturer's recommendations. We found that 10 μ g/ml rhSAA preparation contained 2.6 endotoxin units (EU) mL, whereas 1 μ g/ml LPS contained 5 EU/mL.

Removal of endotoxin from rhSAA

To remove residual endotoxin of rhSAA, we submitted our preparation to the Triton X-114 method as described by Aida and Palat [14]. The rhSAA was diluted in free endotoxin water (1 μ g/ml), and the solution was submitted to two to three cycles of Triton X-114 extractions. After each cycle, the rhSAA content was determined by SDS-PAGE (15%). We found that after three

cycles, the protein yield was very poor (we lost more than 60% of the protein) and that the endotoxin level of rhSAA was similar to the original preparation. We emphasized that we succeeded to remove endotoxin from other LPS-contaminated protein, such as commercial OVA, rhHsp60, or rhIDO (data not shown). Therefore, we used original rhSAA preparation throughout the experiments.

Proteinase K digestion and polymyxin B treatment

To exclude the effect of possible endotoxin contaminants, proteinase K (30 μ g/ml) or polymyxin B (25 μ g/ml) was added to SAA (10 μ g/ml) for 45 min at 37°C in PBS (containing Ca $^{++}$ and Mg $^{++}$). The samples were then added to macrophage cultures, and 48 h later, the nitrite concentrations were determined.

Statistical analysis

The statistical analysis consisted of the one-way ANOVA with the Student-Newman-Keuls multiple comparisons test.

RESULTS

SAA induces NO production by resident and Con A-primed macrophages

We first determined whether SAA activates resident peritoneal macrophages for the production of NO. As shown in Figure 1A, SAA induced the production of NO in a dose-dependent manner. NO production was below detection at a concentration of SAA lower than 0.5 μ g/mL (data not shown). Next, we evaluated the NO production 24 and 48 h after SAA stimulation (Fig. 1B). At 48 h, although the production of NO was higher than that obtained in 24 h of macrophage cultures, it was not statistically significant. Finally, we determined the production of NO by Con A-primed macrophages. We have previously shown that i.p. injection of Con A, a polyclonal T cell activator, enhances various macrophage functions [15–17]. Thus, to verify whether Con A-primed macrophages were more responsive to SAA, we collected macrophages from mice injected with 10 μ g Con A. It was found that the production of NO by Con A-primed macrophages was higher than that obtained with resident macrophages (Fig. 1C).

We conclude that SAA is a potent inducer of NO and that NO production augments in Con A-primed macrophages.

Involvement of MAPKs but not TNF- α in NO production

We have previously shown that SAA induces the expression and production of TNF- α in human neutrophils [6]. Given the fact that TNF- α is involved in NO production (reviewed in ref. [18]), we evaluated whether the addition of anti-TNF- α antibodies could affect NO production. As shown in Figure 2A, treatment of macrophage cultures with anti-TNF- α antibody did not inhibit NO production. Next, we examined the involvement of MAPKs in NO production, as MAPKs are involved in TNF- α production [6] and other inflammatory mediators [19, 20]. We used two highly selective p38 and ERK1/2 inhibitors (SB203580 or PD98059, respectively) to treat macrophages.

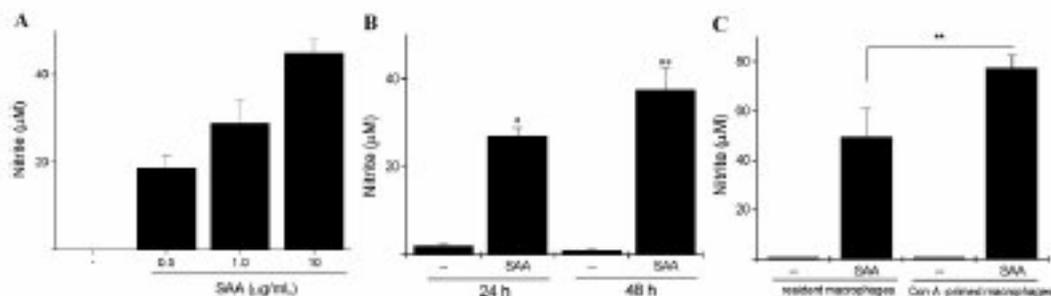


Fig. 1. (A) Dose response of SAA-induced NO production by peritoneal macrophages ($n=6$). (B) NO production found in the supernatants of 24 h- and 48 h-cultured macrophages in the absence and in the presence of SAA (10 µg/mL). *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$, versus control. There was no significant difference between 24- and 48-h groups. (C) The NO production in the supernatants in resident and Con A-primed in vivo macrophage cultures incubated with SAA (10 µg/mL) for 48 h (**, $P < 0.01$). The data represent the average \pm SD of three to five experiments performed in duplicate.

After 15 min of incubation, macrophage cultures were exposed to SAA for 24 h, and the NO production and iNOS expression were determined. Before performing these experiments, we determined cell viability after incubation with 10 µM SB203580 or 50 µM PD080959. We found that at these concentrations, the imidazole inhibitors were not cytotoxic, as assessed by the trypan blue exclusion test (data not shown). Figure 2, B and C, shows that both inhibitors caused a significant decrease in SAA-induced NO production and iNOS expression, with SB being more effective.

Functional TLR4 is required for NO production induced by SAA

Acute-phase proteins are endogenous molecules that ultimately amplify innate immune responses. Although most of them are involved in opsonization and blood clotting, SAA appears to be involved in leukocyte activation and as such, resemble the activities evoked by LPS (cytokine production and NO generation). Therefore, we investigated whether SAA might be an endogenous TLR agonist. To test this hypothesis, we used two mouse strains, C3H/HeJ and C57BL/6J, with defects in the gene encoding the TLR4 complex that

results in unresponsiveness to LPS [21]. As shown Figure 3, A and B, macrophages from TLR4-deficient strains did not produce significant amounts of NO upon SAA stimulation. In contrast, NO production induced by SAA was robust in C3H/HeJ or B6 mice. In addition, we investigated whether MyD88, an adaptor molecule of TLR4 signaling, was involved in the production of NO. We found that NO production by macrophages from MyD88-deficient mice was similar to wild-type (B6) macrophages (Fig. 3C). In summary, our data indicate that functional TLR4 but not MyD88 molecule is required for SAA-induced NO production.

Endotoxin contamination does not reproduce SAA-induced NO production

To rule out the possible LPS effect, we compared the NO production induced by SAA at concentrations of 10 and 1 µg/mL with those obtained with increasing concentrations of LPS with EU/mL ranging from 0.5 to 50, as determined by LAL. As shown in Figure 4, SAA at doses of 10 or 1 µg, which contained, respectively, 3.6 and 0.36 EU/mL, induced a significant NO production. In contrast, LPS, exhibiting similar EU/mL, did not trigger a significant NO production

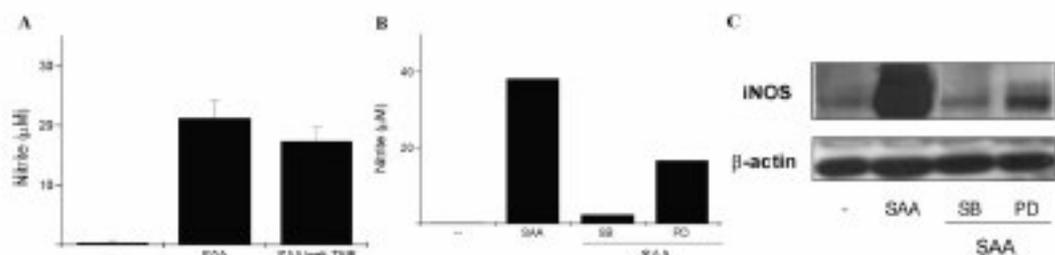


Fig. 2. (A) Effects of anti-TNF- α (5 µg/mL) in the NO production induced by SAA (10 µg/mL) in peritoneal macrophage cultures maintained for 48 h. There was not a significant difference between groups. The data represent average \pm SD of at least three experiments. (B and C) Effects of SB203580 (SB; 10 µM) and PD080959 (PD; 50 µM) in the NO production and iNOS induced by SAA (10 µg/mL) on peritoneal macrophages. The cells were pretreated with the inhibitors 15 min before SAA stimulation and cultured for 48 h. The data are representative of at least three experiments.

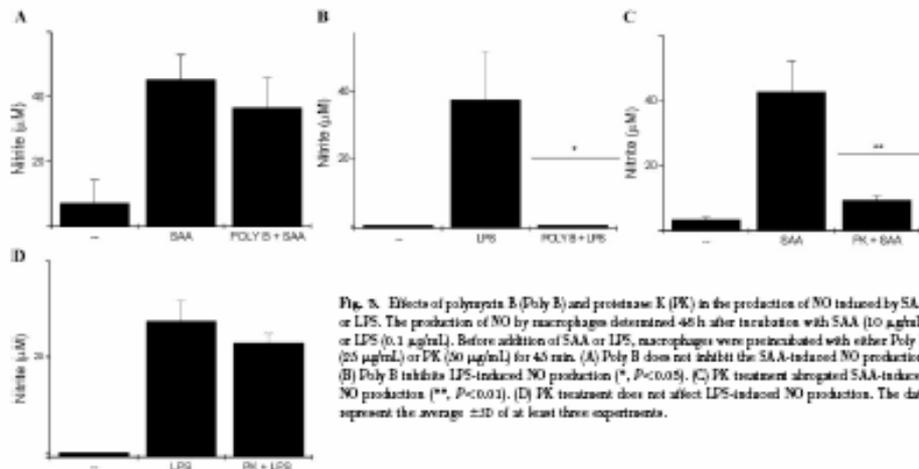


Fig. 3. Effects of polymyxin B (Poly B) and proteinase K (PK) in the production of NO induced by SAA or LPS. The production of NO by macrophages determined 48 h after incubation with SAA (10 µg/mL) or LPS (0.1 µg/mL). Before addition of SAA or LPS, macrophages were pretreated with either Poly B (25 µg/mL) or PK (50 µg/mL) for 45 min. (A) Poly B does not inhibit the SAA-induced NO production. (B) Poly B inhibits LPS-induced NO production (*, $P < 0.05$). (C) PK treatment abrogated SAA-induced NO production (**, $P < 0.01$). (D) PK treatment does not affect LPS-induced NO production. The data represent the average \pm SD of at least three experiments.

mains to be determined whether these hydrophobic regions are critical for TLR4 signaling by SAA.

The production of NO in response to SAA by macrophages from TLR4-sufficient mice was dose-dependent. As purified, endogenous TLR4 agonists are usually obtained from recombinant bacteria, a major concern in relation to our results is whether the recombinant SAA was contaminated with endotoxin. Thus, we first determined the endotoxin activity present in SAA and found that 10 µg SAA contained 3.6 EU/mL, which is near 1 ng LPS. Then, we submitted our rhSAA preparation to the Triton X-114-phase separation method, but we could not remove LPS from our SAA preparation. This was not the case when we used other LPS-contaminated proteins. The low recovery obtained with rhSAA and the difficulty in purifying SAA by Triton X-114 treatment are probably a result of the fact that rhSAA has hydrophobic sites and low molecular weight. Thus, to rule out the possibility that NO production is a result of LPS contamination, we used two experimental approaches that have been used by other authors when the SAA preparation is not LPS-free [27–29]. First, we added LPS at a different concentration starting with a similar concentration that we detected in our SAA preparation and increasing the concentration to 10- to 100-fold. We found 5 EU/mL LPS, which is equivalent to 1 ng, induced negligible production of NO by resident macrophages. Significant production of NO was only observed with a tenfold-higher dose, and the amount of NO produced was roughly threefold lower than that induced by SAA. Even with concentrations of LPS 100-fold higher, the NO production was still lower than that obtained with SAA (data not shown). We also ruled out a possible synergism between SAA and LPS, as addition of LPS at different doses to 1 µg SAA did not enhance NO

production. Second, pretreatment of SAA solution with polymyxin B did not interfere in NO production. In contrast, pretreatment of SAA with proteinase K decreased SAA-induced NO production significantly.

We also found that SAA stimulated the production of TNF- α [6], which subsequently could induce NO. However, we excluded the participation of TNF- α in mediating NO production, as neutralizing antibodies against TNF did not inhibit SAA-induced NO release. The induction of iNOS expression and NO production by SAA was dependent on p38 and ERK1/2 pathways, as specific MAPK inhibitors SB203580 and PD98059 inhibited iNOS expression and NO production. This finding is in agreement with the recognized signaling pathway for iNOS expression promoted in macrophages by other stimuli [19, 20] and in other cell types [30]. Moreover, priming of macrophages by *in vivo* injection of a plant lectin Con A resulted in an enhanced production of NO after stimulation *in vitro* with SAA. Con A is a polyclonal T cell activator and mimics an IFN- γ -dependent macrophage activation as previously reported [15–17] (reviewed in ref. [31]). Thus, it is likely that enhanced NO production resulted from a synergy between IFN- γ signaling and SAA signaling through the TLR4 molecule.

Results obtained in MyD88-deficient mice indicate that this pathway is dispensable for SAA-induced NO production. Thus, it is likely that the Toll/IL-1R domain-containing, adaptor-inducing IFN- β pathway might be responsible for NO production [32]. Although a functional TLR4 is required for NO production, we do not know whether additional receptors are involved in optimal TLR4 signaling. It is known that SAA interacts with at least four distinct receptors: formyl peptide-receptor like-1, found in neutrophils [33]; Tants, expressed on the hepatic tissue [34]; CD36 and lysosomal

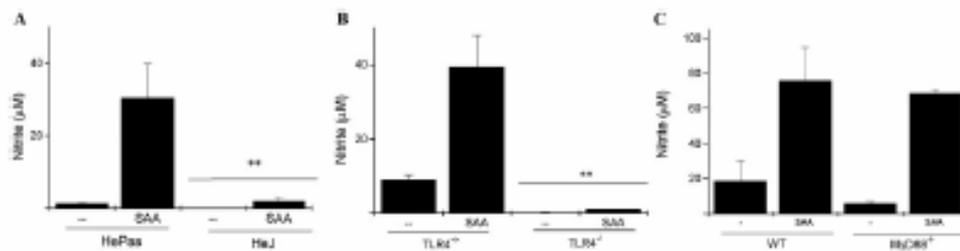


Fig. 3. (A) The effect of SAA (10 µg/ml) in the production of NO in macrophages from C3H/HePas (TLR4-sufficient) and C3H/HeJ (TLR4-deficient). (B) Effect of SAA in the production of NO in macrophages from B6 [TLR4-sufficient (TLR4^{+/+})] and C57BL/10ScCr [TLR4-deficient (TLR4^{-/-})]. The production of NO was abolished in macrophages from TLR4-deficient (C3H/HeJ and C57BL/10ScCr) when compared with TLR4-sufficient mice (**, $P < 0.01$). (C) Effects of SAA in the production of NO in macrophages from B6 [wild-type (WT)] and MyD88^{-/-}. The data represent the average \pm SD of at least five experiments.

(Fig. 4). LPS only induced a significant NO release when 50 EU/mL LPS was added to the cultures. However, the levels of NO produced at this dose of LPS were about one-third of that obtained with 10 µg/mL SAA (Fig. 4). Another possibility was that SAA and LPS act in a synergistic way. To test this hypothesis, we added LPS at increasing concentration to 1 µg/mL SAA. As shown in Figure 4, addition of LPS up to 50 EU/mL did not enhance NO production, ruling out, therefore, the possible synergistic effect of LPS on SAA activity.

Proteinase K but not polymyxin B impairs SAA-induced NO production

Finally, we tested whether polymyxin B or proteinase K treatment would affect rhSAA activity. Polymyxin B is a cationic cyclic lipopeptide that binds stoichiometrically to the lipid A moiety of LPS and blocks its biological effects, whereas proteinase K is a serine protease that cleaves peptide bonds at the carboxylic sides of amino acids [22, 23]. We found that polymyxin B added to SAA did not affect NO production, and its addition to LPS totally abrogated the NO production (Fig. 5, A and B). Conversely, proteinase K treatment inhibited NO pro-

duction by SAA but not by LPS (Fig. 5, C and D). Although indirectly, these results suggest that rhSAA but not LPS is responsible for NO production.

DISCUSSION

This study makes the novel observation that SAA induces NO production by macrophages via TLR4 and suggests that SAA acts as an endogenous TLR4 ligand. This assumption was based on experiments performed in TLR4-deficient strains. Indeed, studies with TLR4 mutant mice, C3H/HeJ or C57BL/10ScCr, were valuable tools to identify many endogenous TLR4 ligands such as fibrinogen, heparan sulfate, hyaluronic acid, and fibronectin extra domain A (reviewed in ref. [24]). Seong and Matzinger [25] have hypothesized that endogenous TLR4 ligands are characterized by the exposure of hydrophobic portions that would act as a universal damage-associated molecular pattern to initiate repair, remodeling, and immunity. Indeed, SAA contains hydrophobic amino acid-rich regions that associate with lipoprotein and other ligands [26]. It re-

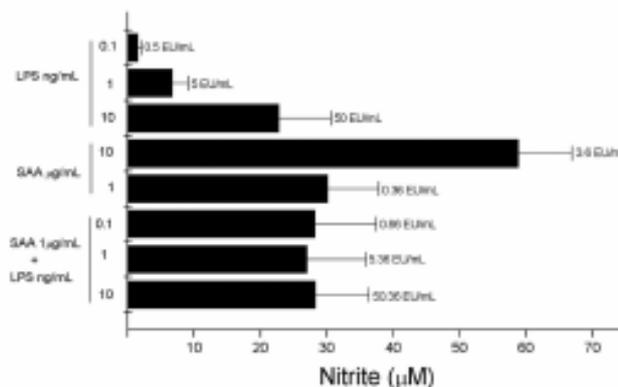


Fig. 4. Effect of different concentrations of SAA, LPS, and SAA plus LPS on the production of NO. Macrophages were stimulated with SAA (1 and 10 µg/mL), LPS (0.1, 1.0, and 10 ng/mL), or SAA (1 µg/mL) + LPS (0.1, 1.0, and 10 ng/mL) and maintained in culture for 48 h. The data represent the average \pm SD of at least three experiments.

integral membrane protein-II analogous-1, a scavenger of high-density lipoprotein, found in various types of cells [35]; and receptor for advanced glycation end-products, a multi-ligand receptor [28]. Whether these receptors are essential or dispensable for optimal TLR4 signaling remains to be determined, but they could act like the CD14 molecule in the activation of TLR4 [36]. It is also important to determine whether SAA itself binds to the TLR4 receptor or is a carrier of other substances that activate the receptor. Another possibility is that SAA binds to LPS, and the complex SAA/LPS decreases the threshold of pathogen-associated molecular pattern detection, which in turn, enhances TLR4 signaling. This was demonstrated recently to occur with Hsp60, a putative, endogenous TLR4 ligand [37].

SAA, like other acute-phase proteins, is thought to play a role in innate defense by binding Gram-negative bacteria and acting as an opsonin [38]. However, it is becoming clear that SAA fulfills other immunological functions more related with cellular immunology that include its ability to associate with leukocytes, to induce the release of cytokines [4–6, 27, 39], to prime leukocytes for the release of reactive oxygen species [7], and to inhibit apoptosis [29]. Our finding that SAA triggers NO release adds a new, immunological function to this protein. Most of the biological effects mediated by SAA, such as augmentation of microbicidal activity [9] and angiogenesis [40], could be partly mediated by NO.

In conclusion, the activities of SAA are far from being restricted to opsonin-like activity, as our work indicates SAA could be a key element in the progression and/or resolution of the inflammatory process triggered by infection or injury.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are indebted to the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP; Brazil) and the Conselho de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES; Brazil) for financial support.

REFERENCES

1. Steel D. M., Whitehead A. S. (1994) The major acute phase reactant: C-reactive protein, serum amyloid P component and serum amyloid A protein. *Immunol Today* 15, 61–66.
2. Urieli-Shoval S., Limb P. R., Matzner Y. (2000) Expression and function of serum amyloid A, a major acute-phase protein, in normal and disease states. *Curr Opin Immunol* 7, 64–69.
3. Lee H. Y., Kim M. K., Park K. S., Bae Y. H., Yun J., Park J. I., Kwak J. Y., Bae Y. S. (2005) Serum amyloid A stimulates matrix-metalloproteinase-9 upregulation via formyl peptide receptor-like-1-mediated signaling in human neutrophil cells. *Biochem Biophys Res Commun* 330, 989–993.
4. Furlaneto, C. J., Campa, A. (2000) A novel function of serum amyloid A: a potent stimulator for the release of tumor necrosis factor- α , interleukin-1 β , and interleukin-8 by human blood neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun* 268, 405–408.
5. Ribeiro, F. P., Furlaneto, C. J., Hatanaka, E., Ribeiro, W. B., Souza, C. M., Casatella, M. A., Campa, A. (2002) mRNA expression and release of interleukin-8 induced by serum amyloid A in neutrophils and monocytes. *Mediators Inflamm* 12, 173–176.

6. Hatanaka, E., Furlaneto, C. J., Ribeiro, F. P., Souza, C. M., Campa, A. (2004) Serum amyloid A induced mRNA expression and release of tumor necrosis factor- α (TNF- α) in human neutrophils. *Immunol Lett* 91, 33–37.
7. Hatanaka, E., Ribeiro, F. P., Campa, A. (2002) The acute phase protein serum amyloid A primes neutrophils. *FEMS Immunol Med Microbiol* 38, 61–64.
8. Badolato, R., Johnston, J. A., Wang, J. M., McVicar, D., Xu, L. L., Oppenheim, J. J., Kolva, D. J. (1993) Serum amyloid A induces calcium mobilization and chemotaxis of human monocytes by activating a pertussis toxin-sensitive signaling pathway. *J Immunol* 155, 4004–4010.
9. Badolato, R., Wang, J. M., Strassler, S. L., Doni, A. N., Dase, M., Muroi, T. (2003) Serum amyloid A is an activator of PMN antimicrobial functions: induction of degranulation, phagocytosis, and enhancement of anti-Candida activity. *J Leukoc Biol* 67, 381–386.
10. Lee, H. Y., Jo, S. H., Lee, C., Baik, S. H., Bae, Y. S. (2006) Differential production of leukotriene B $_4$ or prostaglandin E (2) by WKYMVm or serum amyloid A via formyl peptide receptor-like 1. *Biochem Pharmacol* 72, 860–868.
11. Beg, A. A. (2002) Endogenous ligands of Toll-like receptors: implications for regulating inflammatory and immune responses. *Trends Immunol* 23, 309–312.
12. Ohishi, K., Barkart, V., Flohe, S., Kolik, H. (2000) Cutting edge: heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the Toll-like receptor-4 complex. *J Immunol* 164, 558–561.
13. Ding, A. H., Nathan, C. F., Storm, D. J. (1988) Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages: comparison of activating cytokines and evidence for independent production. *J Immunol* 141, 2407–2412.
14. Arda, Y., Palut, M. J. (1990) Removal of endotoxin from protein solutions by phase separation using Triton X-114. *J Immunol Methods* 132, 191–195.
15. Rodrigues, D., Cavada, B. S., Abreu-de-Oliveira, J. T., de-Azevedo-Monteira, R., Russo, M. (1992) Differences in macrophage stimulation and leukocyte accumulation in response to intraperitoneal administration of glucose/glucosamine-binding plant lectins. *Braz J Med Biol Res* 25, 823–829.
16. Rodrigues, M. R., Rodrigues, D., Russo, M., Campa, A. (2002) Macrophage activation includes high intracellular myeloperoxidase activity. *Biochem Biophys Res Commun* 292, 869–873.
17. Rodrigues, M. R., Rodrigues, D., Henrique Catalani, L., Russo, M., Campa, A. (2003) Interleukin- γ independent oxidation of radiolabels by macrophages. *J Physiol Res* 34, 69–74.
18. Bogdan, C. (2001) Nitric oxide and the immune response. *Nat Immunol* 2, 907–910.
19. Bawa, S. K., Sodhi, A., Paul, S. (2001) Regulation of nitric oxide production by murine peritoneal macrophages treated in vitro with chemokine monocyte chemoattractant protein 1. *Nitric Oxide* 5, 569–579.
20. Sodhi, A., Bawa, S. K. (2002) Indol-3-pyruvate in vitro nitric oxide production and its regulation in murine peritoneal macrophages. *J Leukoc Biol* 71, 262–270.
21. Fukuzaki, A., He, X., Semirnova, I., Liu, M. Y., Van Huijfel, C., Du, X., Birdwell, D., Alejos, E., Silva, M., Calzavara, C., Freudenberg, M., Ricciardi-Castagnoli, P., Layton, B., Bantler, B. (1998) Defective LPS signaling in CD14^{hi} and CD14^{lo}/CD16⁺ cells: mutations in TIR4 gene. *Science* 282, 2085–2088.
22. Buzay, A., Ruffet, P. A., Leifer, C. A., Klyachnikova, I., Shakhov, A., Cherov, O., Shirakawa, A. K., Farber, J. M., Segal, D. M., Oppenheim, J. J., Kwak, I. W. (2002) Toll-like receptor 4-dependent activation of dendritic cells by β -defensin 2. *Science* 298, 1023–1029.
23. Palliser, D., Huang, Q., Hachem, N., Lamontagne, S. P., Guillen, E., Young, R. A., Isaacs, H. N. (2004) A role for Toll-like receptor 4 in dendritic cell activation and cytolytic CD8⁺T cell differentiation in response to a recombinant heat shock fusion protein. *J Immunol* 172, 2835–2840.
24. Tian, M. F., Cao, B. (2004) Endogenous ligands of Toll-like receptors. *J Leukoc Biol* 76, 514–519.
25. Seong, S. Y., Mattinger, P. (2004) Hydrophobicity: an ancient damage-associated molecular pattern that initiates innate immune responses. *Nat Rev Immunol* 4, 469–478.
26. Wang, L., Colon, W. (2004) The interaction between apolipoprotein serum amyloid A and high-density lipoproteins. *Biochem Biophys Res Commun* 317, 157–161.

27. He, R., Shepard, L. W., Chen, J., Dai, Z. K., Ye, R. D. (2005) Serum amyloid A is an endogenous ligand that differentially induces IL-12 and IL-23. *J. Immunol.* 177, 4072–4079.
28. Cai, H., Song, C., Endoh, I., Coyette, J., Jessup, W., Frenkel, S. B., McNeil, H. P., Georg, C. L. (2007) Serum amyloid A induces monocyte tissue factor. *J. Immunol.* 178, 1899–1909.
29. Christensen, K., Björkman, L., Tangemo, C., Bylund, J. (2007) Serum amyloid A inhibits apoptosis of human neutrophils via a P2X7-sensitive pathway independent of formyl peptide receptor-like 1. *J. Leukoc. Biol.* 83, 139–146.
30. Panjwani, N. N., Popona, L., Srivastava, P. K. (2002) Heat shock proteins gp96 and hsp70 activate the release of nitric oxide by APCs. *J. Immunol.* 168, 2997–3003.
31. Schroder, K., Sweet, M. J., Hume, D. A. (2006) Signal integration between IFN- γ and TLR signaling pathways in macrophages. *Immunobiology* 211, 511–524.
32. Lee, J. Y., Lowell, C. A., Lemay, D. C., Yoon, H. S., Rhoo, S. H., Sohn, K. H., Jang, B., Ye, J., Chung, J. H., Hwang, D. H. (2005) The regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase by Src-family tyrosine kinases mediated through MyD88-independent signaling pathways of Toll-like receptor 4. *Biochem. Pharmacol.* 70, 1231–1240.
33. He, R., Yang, H., Ye, R. D. (2005) Serum amyloid A induces IL-8 secretion through a G protein-coupled receptor, FPRL1/LXA4R. *Blood* 101, 1572–1581.
34. Walder, K., Kaufman, L., McMillan, J. S., Tsvetkov, J., Kerr, L., De Silva, A., Sunderland, T., Colledge, N., Cao, Y., Bhargava, N., Windmill, K., Teas-Brown, J., Augbert, C., Zimmet, P. Z., Collier, G. R. (2002) Tactic a link between type 2 diabetes and inflammation? *Diabetes* 51, 1850–1860.
35. Baranova, I. N., Vishnyakova, T. G., Buzakov, A. V., Karlander, R., Chen, Z., Friedman, M. L., Henaley, A. T., Cooke, C., Thomas, T., Eggerman, T. L., Patterson, A. P. (2005) Serum amyloid A binding to CLA-1 (CD35 and LIMP1 analogues-1) mediates serum amyloid A protein-induced activation of ERK1/2 and p38 mitogen-activated protein kinases. *J. Biol. Chem.* 280, 8031–8040.
36. Jiang, Z., Georgel, P., Du, X., Stummel, L., Sovath, S., Mudd, S., Haber, M., Kaliv, C., Keck, S., Calzavara, C., Frenkelberg, M., Bentler, B. (2005) CD14 is required for MyD88-independent LPS signaling. *Nat. Immunol.* 6, 365–370.
37. Osterich, A., Kalinke, U., Weiss, S., Fletscher, B., Bredius, M. (2007) Synergistic and differential modulation of immune responses by Hsp90 and lipopolysaccharide. *J. Biol. Chem.* 282, 4699–4699.
38. Shah, C., Hart-Dam, R., Bryson, J. C. (2005) Serum amyloid A is an innate immune opsonin for Gram-negative bacteria. *Blood* 106, 1751–1757.
39. Lee, H. Y., Kim, M. K., Park, K. S., Shin, E. H., Jo, S. H., Kim, S. D., Jo, E. J., Lee, Y. N., Lee, C., Bae, S. H., Bae, Y. S. (2006) Serum amyloid A induces contrary immune responses via formyl peptide receptor-like 1 in human monocytes. *Mol. Pharmacol.* 70, 241–248.
40. Lee, M. S., Yoo, S. A., Cho, C. S., Suh, P. G., Kim, W. U., Rya, S. H. (2006) Serum amyloid A binding to formyl peptide receptor-like 1 induces epivital hyperplasia and angiogenesis. *J. Immunol.* 177, 5885–5894.

Serum amyloid A induces CCL20
secretion in mononuclear cells
through MAPK (p38 and ERK1/2)
signaling pathways



Serum amyloid A induces CCL20 secretion in mononuclear cells through MAPK (p38 and ERK1/2) signaling pathways

Silvana Sandri^{a,*,} Elaine Hatanaka^{b,c,} Andressa G. Franco^{a,} Alziana M.C. Pedrosa^{a,} Hugo P. Monteiro^{d,} Ana Campa^a

^a Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Ciências Farmacéuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP 13508-866, Brazil

^b Departamento de Biologia e Biófitica, Instituto de Química Biológica, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

^c Área de Diagnóstico Biológico e de Saúde, Universidade Cruzeiro do Sul, São Paulo, Brazil

^d Departamento de Bioprocessos, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:
Received 26 May 2008
Received in revised form 14 July 2008
Accepted 21 July 2008
Available online xxx

Keywords:
CCL20
Mononuclear cells and serum amyloid A (SAA)

ABSTRACT

Although the serum levels of SAA had been reported to be upregulated during inflammatory/infectious process, the role of this acute-phase protein has not been completely elucidated. In previous studies, we demonstrated that SAA induced the production of TNF- α , IL-1 β , IL-8, NO, and ROS by macrophages and/or mononuclear cells. Herein we demonstrate that SAA induces the expression and release of CCL20 from cultured human blood mononuclear cells. We also focus on the signaling pathways triggered by SAA. In THP-1 cells SAA promotes phosphorylation of p38 and ERK1/2. Furthermore, the addition of SB203580 (p38 inhibitor) and PD68059 (ERK1/2 inhibitor) inhibits the expression and release of CCL20 in mononuclear cells treated with SAA. Our results point to SAA as an important link of innate to adaptive immunity, once it might act on the recruitment of mononuclear cells.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

In mammals, the acute-phase response is a systemic reaction to inflammation/infection and tissue injury that protects the host, minimizing tissue damage, and promoting healing [1,2]. A characteristic of the acute-phase response is the rapid increase in production of acute-phase proteins (APPs), including C-reactive protein (CRP), serum amyloid A (SAA) and others [3]. Secretion of these APPs by hepatocytes results in a marked increase (up to 1000-fold for SAA; higher for CRP) in their plasma concentrations above the basal level, reaching as much as 100 μ M or 1 mg/ml for SAA [3,4]. Like other APPs, the production of SAA is usually triggered by inflammatory cytokines and secreted mainly by activated macrophages and monocytes, and also by endothelial cells, lymphocytes and other cells [2]. However, little is known about the precise role of SAA in inflammation and immunity.

In previous studies, we had demonstrated immunomodulatory activities of SAA in human leukocytes, such as the induction of expression and release of tumoral necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-8 (IL-8), the priming activity for opsonized particles [5–8]. Recently, we showed that SAA is an inducer of the nitric oxide (NO) production in macrophages

and that it might be an endogenous agonist for the TLR4 complex [9]. These and other effects of SAA on leukocyte migration, adhesion, and calcium mobilization make SAA an important mediator of the inflammatory process [10]. Furthermore, SAA is triggered in chronic conditions such as diabetes [11], in that case the basal SAA serum levels are persistently elevated and are probably an important factor for the maintenance of a proinflammatory status contributing to the development of further diabetic complications [11].

The chemokine system coordinates leukocyte migration in immunity and inflammation, and is also implicated in the pathogenesis of many diseases. Among the arrangements of chemokines, CCL20, also known as macrophage inflammatory protein-3 α (MIP-3 α) or LARC, has been linked to a variety of diseases, including cancer [12], rheumatoid arthritis [13], and periodontal disease [14]. It attracts memory T and natural killer cells to sites of inflammation and immature dendritic cells [15]. CC chemokine receptor 5 (CCR5) is the only known receptor for CCL20 and it, in turn, is bound only this chemokine [16]. CCL20 has been shown to be expressed predominantly in lymph nodes, appendix, fetal liver, fetal lung and several cell lines (for review [17]). The expression of CCL20 is strongly upregulated by inflammatory signals and down-regulated by the anti-inflammatory cytokine IL-10 [18].

Herein, our attention focuses on the description of the effect of SAA on the expression and release of CCL20 by mononuclear cells and the signaling pathway involved in this induction.

* Corresponding author. Tel.: +55 11 3091 3740; fax: +55 11 3013 2397.
E-mail address: sandri@usp.br (S. Sandri).

2. Materials and methods

2.1. Reagents

Bovine fetal serum, Histoopaque[®], penicillin, RPMI 1640 supplemented with glutamine, sodium bicarbonate, streptomycin, toxin pertussis and cycloheximide were supplied by Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). The recombinant human SAA was purchased from Peprotech Inc. (Rocky Hill, NJ, USA). According to the supplier the amount of endotoxin was lower than 0.1 ng/ μ g of protein. As we have shown recently the amount of endotoxin found in SAA preparation was not responsible for production of NO [5]. PD98059, SB203580 and actinomycin D were supplied by Calbiochem-Novabiochem Corp. (San Diego, CA, USA). These three compounds were solubilized in dimethyl sulfoxide (DMSO), resulting in a final concentration of DMSO of less than 0.1% per assay. These concentrations are not toxic for the cells as demonstrated in our previous studies [5].

2.2. Cell preparation and culture

Human peripheral blood cells were prepared from fresh and heparinized venous blood by density-gradient centrifugation, as described previously [19]. Blood drawing followed a protocol approved by FCF Ethical Committee at Universidade de São Paulo. Human blood mononuclear and THP-1 cells were kept in RPMI 1640 medium supplemented with 10% FBS, 100 IU/ml penicillin, and 100 μ g/ml streptomycin.

2.3. Measurement of secreted CCL20

Mononuclear cells (2.5×10^6 cells/ml) were placed in the culture medium and kept in a 5% CO₂ incubator at 37 °C. After stimulation of the cells with SAA, cell-free supernatants were collected, centrifuged, and assayed for CCL20 by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (DuoSet, R&D System, Minneapolis, MN, USA) according to the instruction of the supplier.

2.4. RNA extraction and RNase protection assay

Mononuclear cells (0.8×10^7 cells/ml) were stimulated with SAA (20 μ g/ml) for different lengths of time (2, 4 and 12 h). Cell-free supernatants were collected and storage for posterior analysis. Total RNA was isolated with Trizol[®] (Invitrogen, Carlsbad, CA). The level of expression of IL-10, CCL20 and L32 mRNA was analyzed by RiboQuant RNase protection assay using a customer multiprobe template set from BD Pharmingen (San Diego, CA). For this purpose, riboprobes were labeled with [α -³²P] UTP in the presence of T7 RNA polymerase and used for overnight hybridization with 0.5 μ g of RNA. The hybridized RNA was digested with RNase and proteinase K, and the RNase-protected probes were purified and resolved on denaturing gel. The identification of the specific chemokine bands was conducted on the basis of their individual migration patterns in comparison with the undigested probes. Radiolabeled bands on the gel were acquired using the Storage Phosphor System (Molecular Dynamics, Waltham, MA). Sample loading was normalized by the housekeeping gene L32.

2.5. Western blot

THP-1 cells (1.0×10^6 cells/ml) were stimulated with SAA (10 μ g/ml) and maintained in culture for different lengths of time. The phosphorylation of ERK1/2 and p38 was measured by Western blot analysis of total cell lysates. Briefly, cells were lysed in buffer containing 20 mM HEPES, 150 mM NaCl, 1.5 mM MgCl₂,

1 mM EGTA, 10% glycerol, 1% Triton X-100, aprotinin (1 μ g/ml), leupeptin (1 μ g/ml) and 1 mM PMSF, pH 7.5, containing phosphatase inhibitors. Total cell lysates (40 μ g/lane) were resolved in 12% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gels, and blotted into nitrocellulose sheets. Blots were probed using polyclonal antibody against ERK 1/2 and p38 (Cell Signaling) diluted at 1:2000 and 1:1000, respectively. After incubation with an appropriate horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody, blots were developed using the Pierce system.

2.6. Statistical analysis

The statistical analysis consisted of the one-way analysis of variance (ANOVA) with the Student–Newman–Keuls multiple comparison test.

3. Results

3.1. Serum amyloid A stimulates the release of CCL20 in human mononuclear cells

The levels of CCL20 released in the supernatant of cultured mononuclear cells shows a positive correlation with the SAA treatment (1.5–34 μ g/ml) (Fig. 1A). It is important to note that, in the range studied, the concentrations of SAA treatment were much lower than those present in serum in acute-phase conditions (up to 400 μ g/ml) and were similar to those present in serum in chronic disease, e.g., diabetes and rheumatic disease (6.2 μ g/ml). Additionally, mononuclear cells were incubated with SAA (17 μ g/ml) and the concentration of CCL20 was measured in the supernatant of the cell cultures. The amounts of CCL20 found in the supernatant of cellular cultures were similar at 12, 24 and 42 h (Fig. 1B). Given that at the same experimental conditions used in this study SAA induces the release of TNF- α by mononuclear cells [5] and TNF- α induces the release of CCL20 [20], we evaluated whether the TNF- α could mediate the release of CCL20 induced by SAA. For this purpose, mononuclear cells were incubated with anti-TNF- α antibodies and SAA. As shown in Fig. 1C, the addition of TNF- α antibodies did not affect the release of CCL20 induced by SAA.

3.2. CCL20 released by serum amyloid A is transcriptionally and translationally mediated

To investigate the signaling mechanism involved in SAA-induced CCL20 release, we pretreated mononuclear cells with the transcription inhibitor actinomycin D (ACTD), or the protein synthesis inhibitor cycloheximide (CHX). Before performing these experiments we determined cell viability. We found that these compounds were not cytotoxic as assessed by trypan blue exclusion test (data not shown). As shown in Fig. 2A, the release of CCL20 induced by SAA was completely abolished in mononuclear cells pretreated with ACTD or CHX. This suggests that release of the CCL20 induced by SAA requires transcriptional activation and *de novo* protein synthesis. We also examined the effect of SAA on the accumulation of CCL20 mRNA by using RNA technique. CCL20 mRNA expression was detectable from 2 to 12 h after the treatment of the cells with SAA (20 μ g/ml). At 4 h, the amount of CCL20 mRNA expression was maximal; after 12 h most of the CCL20 transcripts were preserved, suggesting a relatively stability of the CCL20 mRNA (Fig. 2B). At 12 h of incubation, while the CCL20 mRNA expression decreased, there was an increase in IL-10 mRNA expression (Fig. 2B).

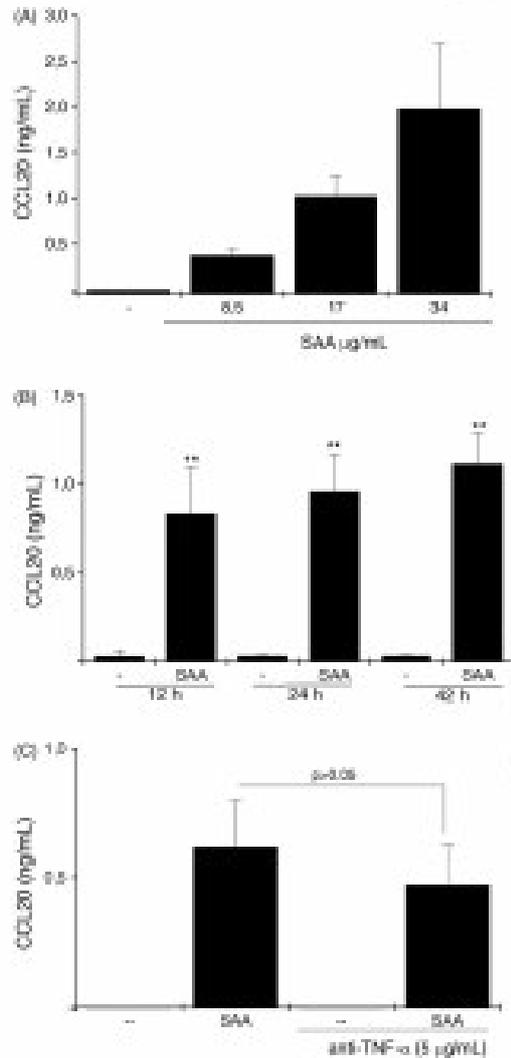


Fig. 1. SAA stimulates secretion of CCL20. (A) SAA stimulated the concentration-dependent release of CCL20 by human mononuclear cells (1.5×10^6 cells/ml). Mononuclear cells (1.5×10^6 cells/ml) were stimulated with different concentrations of SAA and maintained for 12 h. (B) Induction of CCL20 secretion in SAA-stimulated mononuclear cells. Mononuclear cells (1.5×10^6 cells/ml) were incubated with or without SAA for the indicated periods of time ($^{**}P < 0.01$, SAA vs. control). (C) Anti-TNF- α does not affect the release of CCL20 induced by SAA in mononuclear cells cultures maintained for 12 h. Data shown are means \pm S.E.M. of the three experiments (A–C).

3.3. The activation of MAPK pathway and G protein coupled-receptor is involved in the CCL20 induced by SAA

The involvement of MAPK pathway on SAA-stimulated CCL20 expression and release was investigated by using two specific MAPK inhibitors (PD98059 and SB203580). Pretreatment of the cells with these inhibitors impaired the expression and release of CCL20 induced by SAA (Fig. 3A and B). Indeed, in THP-1 cells, we con-

firmed that SAA phosphorylates both p38 and ERK1/2 as shown by western blot analysis (Fig. 3C and D). We also verified the participation of G protein-coupled receptor. For this purpose we used pertussis toxin (PTX), a specific inhibitor that mediates adenosine diphosphate (ADP) ribosylation of the Gi class of G proteins that are known for coupling most chemotactant receptors. Pretreatment of mononuclear cells with PTX led to a decrease of CCL20 mRNA expression and release (Fig. 3A and B). These results suggest the participation of MAPK pathway and G protein coupled receptor in the expression and release of CCL20 induced by SAA.

4. Discussion

Herein we demonstrated that SAA is able to induce the expression and release of CCL20 by human mononuclear cells in a dose-dependent manner. Previous reports had demonstrated that CCL20 is inducible in several cell lines and primary cells by various other inducers of inflammation [22], such as some cytokines [20], bacterial [21], and plant products [23]. The main characteristic of the SAA-induced CCL20 expression is that the expression of CCL20 is lengthened when compared with other inducers [20].

The receptors involved and the signaling pathway responsible for SAA-induced cytokines expression and release have not been fully established. Using inhibitors, we demonstrated that p38 MAPK and p42/44 ERK kinase pathways are involved in SAA-mediated CCL20 expression. We confirmed the participation of p38 and ERK1/2 by Western blot analysis. These signaling

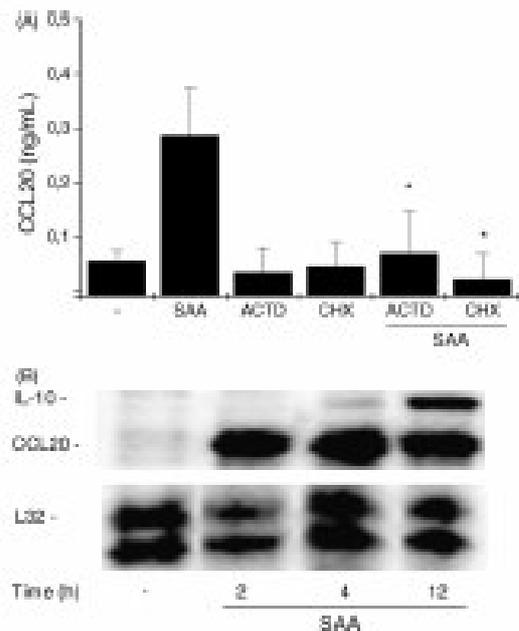


Fig. 2. (A) SAA-induced CCL20 secretion requires transcription and de novo protein synthesis. Mononuclear cells (1.5×10^6 cells/ml) were pretreated for 30 min with or without 10 μg/ml of ACTD or 100 μM of CHX before SAA (17 μg/ml) stimulation and maintained in culture for 12 h. Data shown are means \pm S.E.M. of the three experiments ($^{**}P < 0.05$, SAA vs. SAA plus different treatments). (B) Time-dependent changes in CCL20 transcript level in SAA-stimulated mononuclear cells. Mononuclear cells (1.5×10^6 cells/ml) were stimulated with SAA (17 μg/ml) for indicated times. Messenger RNA level were analyzed by RT-PCR. The data are representative from three independent experiments.

Please cite this article in press as: Sankri S, et al. Serum amyloid A induces CCL20 secretion in mononuclear cells through MAPK (p38 and ERK1/2) signaling pathways. Immunology Letters (2008) doi:10.1016/j.iml.2008.07.013

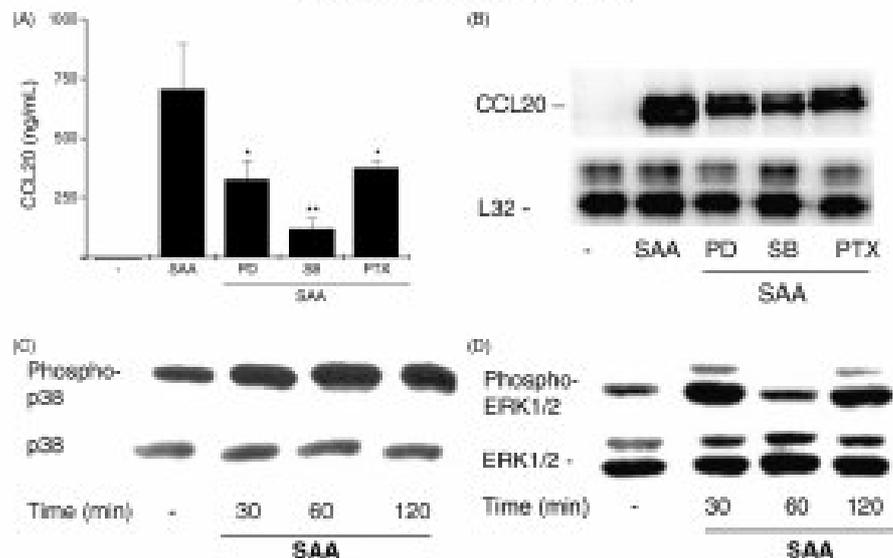


Fig. 3. Effects of inhibitor and PTX on the release and expression of CCL20 induced by SAA. (A) Pretreatment with SB203580, PD98059 and PTX inhibited SAA-induced CCL20 release by mononuclear cells. Mononuclear cells (1.5×10^6 cells/ml) were preincubated with SB203580 (10 μ M), PD98059 (50 μ M), and PTX (100 ng/ml) for 15 min before the addition of SAA (30 μ g/ml). After 6 h, the CCL20 in the cell-free medium was detected with ELISA. Data shown are mean \pm SEM of the three experiments. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; SAA vs. SAA plus different treatments. (B) Changes in CCL20 messenger level using cell pellets from the above experiments. (C and D) SAA (30 μ g/ml) phosphorylates p38 and ERK1/2 at indicated times in THP-1 cells. (B, C and D) Representative from three independent experiments.

pathways are also active in the SAA-induced expression of other cytokines including IL-8 [23], TNF- α [5], IL-10 [24] and IL-12 [25] in human leukocytes. Our results suggest that p38 is more involved in SAA-stimulated CCL20 mRNA expression and production in mononuclear cells than ERK1/2. These findings were similar to that promoted by SAA to the expression and release of IL-10 and IL-12 by human monocytes [24,25].

Published studies have shown that PPAR1 is able to mediate effects of SAA to the induction of IL-8 [23], MMP-9 [26] and IL-12 [25]. PPAR1 is a G protein-coupled receptor type G1 pertains toxin sensitive. Herein, we observed that pertussis toxin inhibited the expression and release of CCL20 promoted by SAA suggesting that activation G-protein-coupled receptor type G1 could mediate the effects of SAA.

The expression and release of CCL20 induced by SAA leave us to consider that the effects of SAA are not restricted to acute-phase, but they are also involved in the transition of innate to adaptive immune response. This idea is supported by a recent report which showed that SAA induces IL-12 production [25]. While IL-12 has been widely accepted as an important regulator of Th1 immune response which enhances innate immunity by stimulating NK cells and a selected group of T cells to produce IFN γ , an important factor for microbial killing [27]. CCL20 recruits immature dendritic cells and CCR6 high memory lymphocytes. The combined action of CCL20 and IL-12 leads to a prompt pathogen recognition and defense by the host.

All normal immune responses, including innate and adaptive immunity, are self-limited. For instance, in most of the acute inflammation the hepatic synthesis of SAA waxes with time. In a broad sense, the return to homeostasis is essential to prevent uncontrolled tissue damage. So, it is difficult to interpret the biological significance and impact on disease progression of persistently elevated levels of SAA in some chronic diseases [28–30]. The intriguing positive correlation that exists between elevated serum levels of

SAA and coronary artery disease [31], and the presence of SAA in human atherosclerotic lesions [32], suggest a role of SAA in the genesis and progression of chronic disease. Besides being an important element between innate and adaptive immune response mediated by CCL20 production at the inflammatory focus, an autocrine effect of SAA produced by monocytes/macrophages and lymphocytes could lead to a persistent production of CCL20 that would contribute to the development of long-term conditions and diseases, for instance rheumatic and other chronic inflammatory diseases.

In conclusion, the ability of mononuclear cells to produce CCL20, in response to SAA might be significant to orchestrate the recruitment of specific cell types to the inflamed sites, and may contribute to and regulate the immune response and maintenance of chronic inflammatory status.

Acknowledgments

The authors are indebted to Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (Brazil), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CNPq) (Brazil), and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (Brazil) for their financial support.

References

- [1] Cahoy C, Kushner I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N Engl J Med* 1989;321:321–324.
- [2] Baumann H, Gauldie J. The acute phase response. *Immunol Today* 1994;15:14–19.
- [3] Ullrich CM, Weinhandl AJ. Serum amyloid A, the major vertebrate acute-phase reactant. *Eur J Biochem* 1999;265:321–33.
- [4] Ulevi-Skornjic T, Ulevi S, Muzum Y. Expression and functions of serum amyloid A, a major acute-phase protein, in normal and diseased states. *Curr Opin Hematol* 2003;7:4–9.

[5] Haraoka E, Furlaneto C, Ribeiro FR, Sora GM, Campa A. Serum amyloid A induced mRNA expression and release of tumor necrosis factor- α (TNF- α) in human neutrophils. *Immunol Lett* 2004;91:33–7.

[6] Ribeiro FR, Furlaneto C, Haraoka E, Ribeiro WB, Sora GM, Campa MA, Campa A. mRNA expression and release of interleukin-8 induced by serum amyloid A in neutrophils and monocytes. *Media Inflamm* 2006;11:173–8.

[7] Furlaneto C, Campa A. A novel function of serum amyloidA: a potent stimulus for the release of tumor necrosis factor- α , interleukin-1 β & interleukin-8 by human blood neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;335:485–8.

[8] Haraoka E, Ribeiro FR, Campa A. The acute phase protein serum amyloid A primes neutrophils. *Immunol Med Microbiol* 2005;11:13–4.

[9] Sandri S, Rodriguez D, Garcia E, Montano NP, Russo M, Campa A. Is serum amyloid A an endogenous TLR4 agonist? *Leukot Res* 2006;31:174–8.

[10] Redolats R, Johnson JA, Wang JM, McAvoy D, Xu L, Oppenheim JJ, et al. Serum amyloid A induces calcium mobilization and chemotaxis of human monocytes by activating a protein tyrosine-kinase signaling pathway. *J Immunol* 1999;163:4004–10.

[11] Haraoka E, Montano NP, Watanabe MI, Campa A. Interaction between serum amyloid A and leukocytes—a possible role in the progression of vascular complications in diabetes. *Immunol Lett* 2003;95:35–6.

[12] Kim YJ, Kazama T, Bori DL, Ishikawa T, Maruyama H, Rhee H, et al. Detection and localization of M α -1 (M α 1), a macrophage proinflammatory chemokine, and its CD86 receptor in human prostatic cancer. *Int J Cancer* 1999;81:650–7.

[13] Roth JH, Shehama S, Park DC, Wood JC, Kumar P, Gao J, et al. Role of macrophage inflammatory protein-1 α and its ligand CD86 in rheumatoid arthritis. *Lab Invest* 2003;83:93–101.

[14] Haraoka E, Yamamoto T, Yamaguchi D, Takahashi K, Nomoto H, Matsuo T. Macrophage inflammatory protein 1 α -CD86 chemokine receptor 6 interactions play an important role in CD4⁺ T-cell accumulation in periodontal diseased tissue. *Clin Exp Immunol* 2003;134:541–54.

[15] Diaz MC, Vanderder E, Vicari A, Bilton JM, Ohtsuka E, Ali-Yahya E, et al. Selective recruitment of immature and mature dendritic cells by distinct chemokines expressed in different anatomical sites. *J Exp Med* 1998;191:1771–82.

[16] Liao F, Alderman EL, Li J, Ulrich S, Reider RL, Farber JM. STRE12 is a receptor for the DC chemokine MIP-1 α . *Biochem Biophys Res Commun* 1997;236:112–7.

[17] Diaz-Monje MC, Vicari A, Loberpez S, Cruz C. Regulation of dendritic cell trafficking: a process that involves the participation of selective chemokines. *Leukot Res* 2004;31:31–3.

[18] Bori DL, Vicari AP, Franz-Soren K, McClellan TK, Zlotnik A. Mobilization through chemotaxis of two new macrophage proinflammatory human chemokines: MIP-1 α and MIP-1 β . *J Immunol* 1997;158:1033–9.

[19] Royan A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. *Scand J Clin Lab Invest* 1965;21:75–100.

[20] Scapini P, Landmann C, Pizzardi C, Allavena P, Mantovani A, Santoni D, et al. Neutrophils produce biologically active macrophage inflammatory protein 1 α (MIP-1 α /CCL20) and MIP-1 β /CCL26. *Eur J Immunol* 2001;31:1981–8.

[21] Akbarbali T, Saitoh T, Kamai R, Matsui T, White H, Kusano H, et al. Production of macrophage inflammatory protein 1 α (MIP-1 α) (CCL20) and MIP-1 β (CCL26) by human peripheral blood neutrophils in response to microbial pathogens. *Immunol Immun* 2003;71:524–6.

[22] Schroyer E, Stray E, Mowbray J, Cummings B, Post W, et al. Regulated production and molecular diversity of human liver and activation-regulated chemokine/macrophage inflammatory protein-1 α from normal and transformed cells. *J Immunol* 2000;165:4070–7.

[23] Ho R, Sang H, Ye RD. Serum amyloid A induces IL-8 secretion through a G protein-coupled receptor FPR1/EXAE5. *Blood* 2000;95:1572–81.

[24] Lee HY, Kim KM, Park KS, Shin EH, Jo SH, Kim SD, et al. Serum amyloid A induces matrix metalloproteinase-9 upregulation via chemokine receptor-like-1-mediated signaling in human monocyte cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;338:540–6.

[25] Ho R, Sheppard LW, Chen J, Pan DC, Ye RD. Serum amyloid A is an endogenous ligand of the chemokine receptors CXCR1 and CXCR2. *J Immunol* 2002;169:4072–8.

[26] Lee HY, Kim KM, Park KS, Lee YH, Park J, Park J, et al. Serum amyloid A stimulates matrix metalloproteinase-9 upregulation via chemokine receptor-like-1-mediated signaling in human monocyte cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;338:540–6.

[27] Chinn H, Peruzzi B, Gupta JW, Kohyama M, Fungini M, Young HA, et al. Induction of interleukin gamma production by natural killer cell secondary structure: characterization of the responder cells and synergy with other inducers. *J Exp Med* 1991;173:68–83.

[28] Kameo Y, Saitoh T, Hashizume K, Matsuda K, Toge T. Local expression of acute phase serum amyloid A mRNA in rheumatoid arthritis synovial tissue and cells. *Rheumatol* 1999;38:78–83.

[29] Gofford O, Pons D, Ackerman Z, Dahan S, Lindor SF, Levin M, et al. Expression of serum amyloid A, in normal, dysplastic, and neoplastic human colonic mucosa: implication for a role in stromal tumorigenesis. *Histochem J* 2006;38:67–73.

[30] Miida T, Yamada T, Saito U, Ito M, Rishi Y, Takahashi A, et al. Serum amyloid A (SAA)-induced remodeling of CSP-4/CD. *Biochim Biophys Acta* 2006;1761:424–33.

[31] Pyle AJ, Robinson JF, DeWitt DL, Cantor RM, Boker J, Luster AJ. Association between serum amyloid A proteins and coronary atherosclerosis: evidence from two distinct transgenic mouse models. *Circulation* 1997;95:2818–25.

[32] Yamada T, Kohhara T, Yamashita T, Fukuda T, Kawai T. Both acute phase and constitutive serum amyloid A are present in atherosclerotic lesions. *Pathol Int* 1995;45:797–802.