HERALDO POSSOLO DE SOUZA

**Mecanismos de modulação da via de
sinalização CD40/CD40L**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção
do título de Professor Livre-Docente junto ao
Departamento de Clínica Médica (Disciplina
Emergências Clínicas)

**SÃO PAULO
2007**

*Science may set limits to knowledge, but should
not set limits to imagination.*

*The greatest challenge to any thinker is stating
the problem in a way that will allow a solution.*

Bertrand Russell

Dedicatória

Para Cristina e Fernanda

“There's no vocabulary for love within a family, love that's lived in but not looked at, love within the light of which all else is seen, the love within which all other love finds speech. This love is silent.”

T.S. Elliot

A meu pai e minha mãe,

que propiciaram os meios e a estrutura onde me formei, intelectualmente e moralmente. Sem seu suporte e orientação, não teria tido as oportunidades de aprendizado que tive, nem saberia usar, de maneira ética, o que aprendi.

AGRADECIMENTOS

Prof. Dr. Irineu Velasco, que abriu as portas para que eu desenvolvesse uma nova carreira e apoiou-a em todos os momentos.

Prof. Dr. Francisco Laurindo, que me guiou nos primeiros passos na ciência e continua sendo uma referência como pesquisador.

Dr. Luiz Monteiro, um grande amigo nas horas difíceis, e nas horas não tão difíceis, também.

Dr. Murilo Chiamolera, por toda a ajuda que vem me dando ao longo desses anos, como amigo, companheiro de trabalho e de laboratório.

Dr. Mariano Janiszewski, com quem muito tenho aprendido, dentro e fora do laboratório.

Dr. Luiz Cláudio Godoy, cientista brilhante e uma das melhores pessoas com quem trabalhei dentro de um laboratório.

Prof. Dr. José Eduardo Krieger, cujo entusiasmo pela ciência e o ensino contagiam a mim e a todos que com ele convivem.

Prof. Dr. Francisco Soriano, companheiro com quem divido as alegrias e frustrações do dia-a-dia no laboratório.

Prof. Dr. Augusto Scalabrini, pela grande ajuda dentro da vida acadêmica.

Prof^a. Dr^a. Marta Krieger, não só pela ajuda na execução de projetos, mas também pelo estímulo constante.

Ana Iochabel Moretti, Daniella Ozer Teixeira, Flavia Llimona, Lisia Kiehl, Luis Fonseca, Nancy Canavezi, Thadeu Fernandes e Themis Cardinot, são esses os alunos que me estimulam a prosseguir e me auxiliam em todos os projetos.

Fatima Abatepaulo, pela ajuda inestimável em todos os trabalhos do laboratório.

Kelli Gouveia, por estar sempre presente nos momentos necessários.

Sueli Kubo e Denise Frediani Barbeiro, pelo suporte em todos os experimentos realizados.

Vera Pontieri, com quem eu muito aprendi sobre tantas coisas.

Hermes Barbeiro, Maria Carolina Guido, Marcia Koike e Geraldo Gonçalves Sobrinho, pela colaboração em todos os momentos do laboratório.

Dr^a. Elnara Negris Abreu, Dr. Fabiano Pinheiro, Dr. Clóvis Frimm e Dr. Bonfim Alves Filho, pela ajuda nos projetos em comum do laboratório.

Prof. Dr. Carlos Eduardo Negrão, Profª. Drª. Patricia Brum, Profª. Drª. Eloisa Bonfá, Dr. Eduardo Borba, Profª. Drª. Ana Maria de Oliveira, Drª. Claudia Oliveira e Drª. Patricia Cazita, sem cuja colaboração nosso trabalho não poderia ser completado.

Angélica, Rose, Kátia e Marta, por resolverem tantos problemas criados por mim na Disciplina e na Pós-Graduação.

Aos funcionários do centro de bioterismo (Cristina, Flávio, Milena e Adilamar e todos os outros), pela ajuda na criação e manejo dos animais geneticamente modificados.

Agradecimentos Especiais

**À FAPESP - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo e
ao CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e
Tecnológico**, que aprovaram e financiaram a execução deste projeto, pela
confiança que dedica aos pesquisadores e à pesquisa científica.

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2ª ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas e siglas
 Lista de figuras
 Resumo
 Summary

INTRODUÇÃO	001
PARTE 1 - A FISIOLÓGIA DA VIA DE SINALIZAÇÃO CD40/CD40L.....	005
1.1 O Receptor de Membrana CD40	006
1.2 O Ligante do CD40: CD154 ou CD40L.....	009
1.3 Sinalização Através de CD40/CD40L	010
1.4 Função biológica da via de sinalização CD40/CD40L.....	013
1.5 Expressão Constitutiva de CD40 e CD40L.....	018
1.6 Regulação da Expressão de CD40 e CD40L.....	020
1.7 ERO como Mecanismo de Transdução de Sinal	024
1.8 ERO como Segundos Mensageiros na Expressão de CD40 e CD40L.....	027
1.9 Sinalização Através de CD40/CD40L: Importância e Complexidade	032
PARTE 2 - A VIA DE SINALIZAÇÃO CD40/CD40L EM SITUAÇÕES PATOLÓGICAS	033
2.1 Introdução	034
2.2 A Via de Sinalização CD40/CD40L na Aterosclerose.....	035
2.2.1 Aterosclerose, doença inflamatória.....	035
2.2.2 Eventos coronarianos agudos	036
2.2.3 A via de sinalização CD40/CD40L na fisiopatologia da aterosclerose.....	038
2.2.4 A via de sinalização CD40/CD40L na ruptura da placa aterosclerótica	039
2.2.5 Evidências clínicas	040
2.2.6 Angiotensina e a via de sinalização CD40/CD40L	041
2.2.7 A via de sinalização CD40/CD40L em modelos de aterosclerose experimental.....	048
2.3.7.1 Os camundongos deficientes em receptor de LDL e CD40L.....	048
2.2.8 A via de sinalização CD40/CD40L na aterosclerose experimental.....	049
2.2.9 Os camundongos deficientes em receptores de LDL e toll-like 4	051
2.2.10 CD40/CD40L: Essencial para a evolução da aterosclerose.....	056
2.3 A Via de Sinalização CD40/CD40L nas Doenças Automunes.....	058
2.3.1 A via de sinalização CD40/CD40L na lupus eritematoso sistêmico.....	060
2.3.2 Os receptores ativados por proliferadores de peroxissomos - PPARs.....	062
2.3.2.1 Estrutura e distribuição.....	062
2.3.2.2 Funções dos PPARs	063
2.3.2.3 Papel antiinflamatório dos PPARs	064
2.3.3 Interações entre as vias de sinalização PPAR e CD40/CD40L	067
2.3.4 Estudos visando determinar interações entre CD40/CD40L e PPARs.....	069
2.3.5 Ativadores de PPARs: coadjuvantes na terapia de doenças autoimunes?	071

2.4	Sepse e a Via de Sinalização CD40-CD40L	072
2.4.1	Sepse grave e choque séptico	072
2.4.2	A via de sinalização CD40/CD40L na sepse.....	076
2.4.2.1	CD40-CD40L na sepse: estudos in vitro	076
2.4.2.2	CD40-CD40L na sepse: modelos experimentais.....	077
2.4.2.3	CD40-CD40L na sepse: estudos clínicos.....	078
2.4.3	Marcadores de prognóstico no paciente em sepse	078
2.4.4	Sinalização por S-Nitrosilação na sepse	082
2.4.4.1	Óxido nítrico e tióis em sistemas biológicos.....	082
2.4.4.2	Nitrosilação de cisteína como mecanismo de transdução de sinal.....	086
2.4.5	S-Nitrosilação protéica e inflamação.....	089
2.4.6	Nitrosilação do CD40.....	091
2.4.7	A via de sinalização CD40/CD40L na sepse: ainda muito a compreender	100
	CONCLUSÃO E DESDOBRAMENTOS	102
	ANEXOS - METODOLOGIAS.....	105
	REFERÊNCIAS.....	143

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Aminoácidos
APC	Célula apresentadora de antígeno
CASMC	Células musculares lisas vasculares de coronária humana
CCL-17	“Chemokine (C-C motif) ligand 17”
CCR	“Chemokine (C-C motif) receptor”
Cdk	“Cyclin-dependent kinase”
CLP	Punção e ligadura cecal
COX	Ciclooxigenase
DEPC	Dietilpirocarbonato
DHA	Ácido docosahexanóico
DMPO	“5,5'-dimethyl-pyrroline-N-oxide”
DMPO-OH	Aduto formado por DMPO e hidroxila
DNA	Ácido desoxirribonucléico
ELISA	“Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay”
EPA	Ácido eicosapentaenóico
EPR	Ressonância eletrônica paramagnética
ERK	“Extracellular signal-regulated kinase”
ERO	Espécies reativas de oxigênio
GAPDH	“Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase”
GM-CSF	“Granulocyte macrophage colony-stimulating factor”
GMPC	Guanosina monofosfato cíclica
GSNO	Nitrosoglutationa
HDL	Lipoproteína de alta densidade
IκB	“Inhibitor of kappa B”
ICAM	“Intercellular adhesion molecule”
IFN	Interferon
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
JNK	“c-Jun N-terminal kinases”
KDa	Kilodalton

LDL	“Low density lipoprotein”
LDLr	Receptor de LDL
LFA	“Lymphocyte function-associated antigen”
L-NAME	“NG-nitro-L-arginine methyl ester”
LPS	Lipopolissacáride
LTB-4	Leucotrieno B-4
MAPK	“Mitogen-activated protein kinase”
MHC	Complexo de histocompatibilidade maior
MMP	Metaloproteinase
MyD88	Fator de diferenciação mielóide 88
NADH	Nicotinamida adenina nucleotídeo, forma reduzida
NADPH	Nicotinamida adenina nucleotídeo fosfato, forma reduzida
NF-AT	Fator nuclear ativador de transcrição
NF-κB	Fator de transcrição nuclear - κB
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
PBS	Tampão fosfato
PI3K	Fosfoinositol 3 kinase
PLC	Fosfolipase C
PPAR	“Peroxisome proliferator activated receptor”
PPRE	“Peroxisome proliferator response element”
RANTES	“Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed, and Secreted”
RAR	“Retinoic acid receptor”
RNA	Ácido ribonucleico
RNAi	RNA de interferência
RNA _m	RNA mensageiro
SCF	“Stress concentration factor”
SDS/PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida e dodecil sulfato de sódio
SNAP	S-N-acetilpenicilamina
STAT	“Signal transducers and activator of transcription”
TCR	Receptor de células T

TF	Fator tecidual
TGF	“Transforming growth factor”
TLR	“Toll-like receptor”
TNF	Fator de necrose tumoral
TNFR	Receptor de TNF
TRAF	“TNF associated receptors”
TZD	Thiazolidinedionas
UV	Ultravioleta
VCAM	“Vascular cellular adhesion molecule”
VLA	“Very low antigen”
VLDL	“Very low density lipoprotein”

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Desenho esquemático do ligante CD40L e receptor CD40.....	008
Figura 2 -	Sinalização pelo CD40 pode induzir à proliferação celular ou apoptose.....	012
Figura 3 -	Esquema da ativação de linfócito T por célula dendrítica	016
Figura 4 -	A interação entre CD40 e CD40L na regulação imune	017
Figura 5 -	Geração de ERO após lesão vascular ativa o fator de transcrição NF- κ B.....	025
Figura 6 -	Produção de superóxido por células musculares lisas de coronária humana.....	029
Figura 7 -	Expressão de CD40 induzida por IL-1 β ou TNF- α depende de ERO	030
Figura 8 -	Bloqueio da oxidase vascular diminui a expressão de CD40 em células musculares lisas vasculares de coronárias humanas tratadas com IL-1 β ou TNF- α	031
Figura 9 -	Células musculares lisas vasculares de coronárias humanas em cultura, tratadas com peróxido de hidrogênio apresentam expressão aumentada de CD40, mas não de CD40L	031
Figura 10 -	Tratamento de CSMCs com AngII provoca aumento na expressão de RNAm para CD40.....	043
Figura 11 -	Antioxidantes diminuem a expressão de CD40 induzida por AngII	044
Figura 12 -	Aumento da expressão de CD40 induzida por AngII leva a aumento da produção de IL-1 β e expressão de citoxigenase II	045
Figura 13 -	Ratos hipertensos dependentes de AngII apresentam maior expressão de CD40 na parede vascular.....	046
Figura 14 -	Ratos hipertensos dependentes de AngII apresentam maior expressão de CD40 na parede vascular	047
Figura 15 -	Expressão de CD40L na parede vascular de camundongos deficientes em receptor de LDL alimentados com dieta rica em gordura e colesterol.....	050
Figura 16 -	Estrutura da placa de atheroma em camundongos LDLr ^{-/-} e LDLr ^{-/-} TLR4 ^{-/-}	054
Figura 17 -	Concentrações séricas de Colesterol e Triglicérides em camundongos deficientes em receptores para LDL e tol-like 4	055
Figura 18 -	Modelo de transrepressão da expressão de iNOS induzida por PPAR γ	066

Figura 19 -	Expressão de PPARs após estimulação de macrófagos com rhCD40L.....	070
Figura 20 -	Expressão de RNAm para PPARs em monócitos de pacientes lúpicos.....	070
Figura 21 -	Expressão de RNAm para CD40 em pacientes sépticos	080
Figura 22 -	Expressão de RNAm para CD40L em pacientes sépticos	081
Figura 23 -	Reações entre NO e tióis em sistemas biológicos	085
Figura 24 -	NO diminui a responsividade do C40	094
Figura 25 -	S-nitrosilação do CD40 humano	095
Figura 26 -	Sinalização pelo CD40 é bloqueado por NO em macrófagos murinos.....	096
Figura 27 -	Nitrosilação do CD40 em macrófagos murinos.....	097
Figura 28 -	Trimerização do CD40 é inibida por NO.....	098
Figura 29 -	Perda da nitrosilação do CD40 ocorre in vivo, em murinos.....	098
Figura 30 -	Nitrosilação do CD40 em pacientes sépticos	099
Figura 31 -	Modelo para regulação da sinalização CD40/CD40L pelo NO	099

RESUMO

Souza HP. *Mecanismos de modulação da via de sinalização CD40/CD40L* [tese livre docência]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2007. 172p.

O receptor de membrana CD40 é expresso em células do sistema imune, (linfócitos, macrófagos, células dendríticas) e em células da parede vascular (células endoteliais, musculares lisas). Quando ativado, através de seu ligante CD154 (comumente chamado de CD40L), desencadeia uma série de processos celulares destinados à ativação da resposta imune. Sinalização através dessa via é necessária para a maturação e diferenciação, bem como para troca da classe de imunoglobulinas produzidas pelos linfócitos B. Nas células apresentadoras de antígenos, a ativação de CD40 é fundamental para decisão do sistema imune de criar uma resposta eficaz ou tolerância. Disfunção nessa via de sinalização está presente na patogênese de doenças autoimunes, aterosclerose e sepse. Nessa tese, descrevemos nossos trabalhos na área, alguns deles ainda não publicados. Demonstramos que angiotensina II é indutor da expressão de CD40, mas não de CD40L, na parede vascular e espécies reativas de oxigênio agem como segundos mensageiros nesse fenômeno. Mostramos também que existe interferência dessa via de sinalização com a dos receptores ativados por proliferadores de peroxissomos, tanto em culturas de células quanto em monócitos obtidos de pacientes com lúpus eritematoso sistêmico. Descrevemos um aumento importante da expressão de CD40 e CD40L em leucócitos circulantes de pacientes em sepse grave ou choque séptico e por último, mostramos que o receptor CD40 pode sofrer ntilosilação em resíduo de cisteína, diminuído sua atividade, tanto *in vitro*, quanto *in vivo*. Devido à importância da via de sinalização CD40/CD40L e a ausência de uma terapêutica direta eficaz para seu controle, o conhecimento sobre os meios de manipulação dessa via por meios indiretos é essencial.

Descritores: Ligante a CD40, Aterosclerose, Auto-imunidade, Imunidade, Sepse, Óxido nítrico

SUMMARY

Souza HP. *Mechanisms of control of CD40/CD40L signaling pathway* [thesis for teaching profession]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2007. 172p.

The membrane receptor CD40 is expressed in cells from the immune system (monocytes, lymphocytes, macrophages, dendritic cells) and from the vascular wall (endothelia and smooth muscle cells). Upon activation, through CD154 (better known as CD40L), it triggers a series of cellular processes, designed to activate immune response. This signaling pathway is necessary for maturation, differentiation and immunoglobulin switch in B lymphocytes. In antigen presenting cells, CD40 activation is necessary for the immune system to decide between an efficient immune response or tolerance. Dysfunction in CD40/CD40L function is reported in autoimmune diseases, atherosclerosis and sepsis. Here we will report some of our findings in this field. We demonstrate that angiotensin II induces CD40, but not CD40L expression in vascular cells, and that reactive oxygen species act as second messengers in this phenomenon. We also show that there is a functional crosstalk between CD40/CD40L and peroxisome proliferator activated receptors signaling, both in cell cultures and in monocytes from patients with diagnosis of systemic erythematous lupus. We describe a marked increase in CD40 and CD40L expression in leukocytes from patients in severe sepsis and that the receptor CD40 can be modulated by nitrosylation of cysteine residues in its extracellular domain, which decreases its activity. Due to its importance and absence of a direct approach to control its function, knowledge about indirect manners to modulate CD40/CD40L function is essential.

Descriptors: CD40 ligand, Atherosclerosis, autoimmunity, Immunity, Sepsis, Nitric oxide

INTRODUÇÃO

Imunodeficiência com hipergamaglobulinemia M já era uma síndrome conhecida nos anos 80, caracterizada por uma suscetibilidade maior a infecções oportunistas como *Pneumocystis carinii* e *Cryptosporidium*, elevados níveis séricos de imunoglobulina (IgM) e baixos níveis ou ausência de IgG e IgA (Mayer *et al.* 1986). Em relação à sua fisiopatologia, sabia-se apenas que o defeito principal nessa síndrome residia nos linfócitos B, incapazes de realizar a troca (“switching”) na classe de imunoglobulinas de IgM para IgG ou IgA. A elucidação do mecanismo molecular dessa síndrome só veio ocorrer na década de 90, quando foi descrito que células T ativadas de portadores dessa síndrome eram incapazes de expressar o antígeno de membrana CD40L. Dessa maneira, não ocorre ativação do receptor de membrana CD40, presente nas células B, que são, então, incapazes de realizar a troca de classe das imunoglobulinas (Allen *et al.*, 1993).

Assim, pela primeira vez, foi demonstrado que a via de sinalização CD40/CD40L estava envolvida na fisiopatologia de uma doença imunoinflamatória humana. Logo, a importância dessas moléculas passou a ficar mais clara, quando foi descrita sua participação em diversas situações patológicas, como a aterosclerose e sua mais temida complicação, as síndromes coronárias agudas (Schonbeck e Libby, 2001a), as doenças

autoimunes (Cheng e Schoenberger, 2002; Kweon e Kiyono *et al.*, 2002) e a rejeição a transplante (Clarkson e Sayegh, 2005).

Como consequência natural, essa via de sinalização passou a ser estudada, não só para elucidação de mecanismos fisiopatológicos, mas também como potencial alvo de novas alternativas terapêuticas para essas diversas doenças onde sua participação é importante.

Realmente, não demorou a entrar em ensaios clínicos um tratamento basea no bloqueio dessa via de sinalização. Já no final da década de 90 iniciaram-se estudos com anticorpos anti-CD40L para o tratamento do lúpus eritematoso sistêmico (Davis *et al.*, 2001). Efeitos colaterais importantes, com aumento significativo da incidência de fenômenos trombóticos obrigaram a paralisação desses ensaios clínicos (Sidiropoulos e Boumpas, 2004).

Essas tentativas iniciais frustradas de se manipular essa via de sinalização de maneira mais direta, com fim terapêutico, associado à sua importância cada vez mais bem documentada em diversas doenças, intensificaram os estudos sobre mecanismos outros capazes de modular a sua função.

Foi nesse momento que recrudesceu meu interesse sobre o assunto. Eu já havia entrado em contato com essas moléculas durante meu pós-doutoramento no laboratório do Dr. Jay Zweier, na The Johns Hopkins University, porém foi em 2002, quando retornei ao Brasil, que passei a dedicar meu interesse a explorar os mecanismos de controle da via de sinalização CD40/CD40L. Desde então, a partir dessa linha de pesquisa principal, surgiram algumas ramificações que, embora algumas vezes

tenham me afastado um pouco mais do que o desejado do foco de meus estudos, por outro lado trouxeram informações importantes sobre ligações entre várias vias de transdução de sinal. Fica claro, entretanto, nesses próximos capítulos, que o eixo principal da nossa linha de pesquisa segue um rumo claro, desvendando alguns dos mecanismos que podem exercer modulação, positiva ou negativa sobre essa via de sinalização.

Inicialmente, faremos uma breve exposição de alguns conhecimentos básicos sobre os componentes CD40 e CD40L. Nesse capítulo ainda, descreveremos nossos estudos sobre o controle da expressão de CD40 e CD40L em células da parede vascular, especificamente o papel das espécies reativas de oxigênio como segundos mensageiros nesse fenômeno. Em seguida, discutiremos o papel da atividade do CD40 em diversas situações patológicas. Primeiro a aterosclerose, especificamente em modelos experimentais e em seguida, as doenças autoimunes, com atenção especial para o lúpus eritematoso sistêmico, e a sepse. Mostraremos nossos estudos nessas áreas, designados para um melhor entendimento da função da via de sinalização CD40/CD40L nessas doenças. Alguns desses estudos ainda não foram publicados e a metodologia neles utilizada será detalhada nos apêndices.

Nesse momento, resumindo os dados que já obtivemos e estamos obtendo na área, permaneço com a sensação de que mecanismos indiretos de controle da via de sinalização CD40/CD40L são no futuro, uma importante alternativa terapêutica no tratamento de diversas doenças.

PARTE 1

A FISIOLOGIA DA VIA DE SINALIZAÇÃO CD40/CD40L

1.1 O Receptor de Membrana CD40

CD40 é uma proteína de aproximadamente 50 KDa, membro da superfamília dos receptores do fator de necrose tumoral (TNFR), que foi inicialmente descrita em estudos imunohistoquímicos na parede de linfócitos B (Koho *et al.*, 1984; Paulie *et al.*, 1984 e 1985). Nesses estudos iniciais foi descrito que o nível de expressão dessa molécula variava com o estado de ativação das células B, tendo relação direta com diferenciação e sobrevivência. Além disso, a expressão dessa proteína na parede flutuava com sua progressão através do ciclo celular, dependendo da ligação de um agente, na época, desconhecido (Clark e Ledbetter, 1986). Esses dados iniciais permaneceram enigmáticos até a década seguinte, quando foi descrito o ligante específico para o CD40 e, a partir daí, as funções da via de sinalização puderam ser esclarecidas (Armitage *et al.*, 1992).

O gene do CD40 humano foi mapeado ao cromossomo 20 e é expresso como um único ácido ribonucléico mensageiro (RNAm), com 1,5 kb (Lafage-Pochitaloff *et al.*, 1994). A proteína resultante é composta de 277 aminoácidos, com um domínio extracelular de 193 AA, um domínio transmembrana de 22 AA e um domínio intracelular de 62 AA, tendo, portanto, uma estrutura típica de um receptor de membrana tipo I (van Kooten e Banchereau, 2000). Em seu

domínio extracelular, encontramos 22 resíduos de cisteína, um dado importante para o controle da atividade do receptor, como veremos em capítulo posterior. Em sua forma ativa, o CD40 possui peso molecular de aproximadamente 48 KDa e compartilha uma homologia de 62% com seu correspondente murino. Um dado interessante é o fato de que os 22 resíduos de cisteína da porção extracelular da proteína humana encontram-se conservados, tanto na proteína murina, quanto na bovina murino (van Kooten e Banchereau, 2000).

Em sua localização, na membrana, apresenta-se como uma glicoproteína fosforilada, única modificação pós-translacional que havia sido descrita nessa molécula até o momento. Como veremos adiante, descrevemos em nosso laboratório que essa proteína pode também sofrer nitrosilação em resíduo de cisteína, modificando sua função.

Figura 1 - Desenho esquemático do ligante CD40L e receptor CD40. A estrutura tridimensional do ligante já é conhecida, o mesmo não acontecendo para o receptor. Fica claro no esquema acima, entretanto, a importância das pontes dissulfeto na porção extracelular do receptor para a ativação pelo ligante. Como dito acima, os resíduos de cisteína nessa porção extracelular se conservam, desde murinos até os humanos

1.2 O Ligante do CD40: CD154 ou CD40L

O gene para a proteína CD40L é encontrado no cromossomo X (Graf *et al.*, 1992) e gera uma proteína de aproximadamente 39 KDa, que compartilha 78% de homologia com seu correspondente murino (Tsitsikov *et al.*, 1994). Apesar da homologia estrutural com outros membros da superfamília do fator de necrose tumoral (TNF), diferenças consideráveis existem em diversas alças, principalmente aquelas envolvidas na ligação ao CD40 (Schonbeck e Libby, 2001b). Foi denominado de CD154, porém o nome CD40L se manteve, e é o mais utilizado nas publicações da área.

Um dado importante é que, ao lado de sua forma membranosa, CD40L pode ser gerado em duas formas solúveis, de 18 e 31 KDa. A proteína com 18 KDa é formada após perda da porção citoplasmática e transmembrana; mesmo assim a forma solúvel ainda mantém sua habilidade de gerar trímeros e se ligar ao seu receptor, CD40 (Wykes *et al.*, 1998). Esse fenômeno fez com que muitos autores classificassem CD40L como uma verdadeira citocina, pela sua capacidade de ser transportada na corrente sangüínea e desencadear respostas em locais diferentes de onde foi produzida.

Ensaio desenvolvidos para a detecção do CD40L solúvel foram fundamentais para a compreensão do papel dessa via de sinalização em doenças humanas, pela facilidade de se determinar quantitativamente a expressão dessa molécula em líquidos biológicos, como o plasma, sem a necessidade de métodos mais invasivos.

1.3 Sinalização Através de CD40/CD40L

Apesar de uma enorme quantidade de trabalhos sobre o assunto, ainda não existe um total consenso sobre as vias de sinalização envolvidas após ligação do CD40L ao receptor CD40. Muito dessa controvérsia se deve a dados conflitantes, obtidos em diferentes células e até mesmo em estágios de diferenciação de um mesmo tipo celular. O fato de existir tamanha variabilidade na sinalização pela via CD40/CD40L é, por si só, relevante, pois sugere existir uma grande complexidade na transdução do sinal por essa via.

Assim como outros membros da superfamília dos ligantes dos receptores do TNF, o ligante do CD40 forma estruturas triméricas, resultando em trimerização do receptor após a ligação (Fanslow *et al.*, 1994a; Mazzei *et al.*, 1995). Esse fenômeno é o ponto de partida para uma extensa cascata de eventos. Embora o CD40 não tenha, per se, atividade de quinase, sua ligação leva à ativação de várias quinases que vão transferir informação através da célula.

A análise funcional e estrutural do domínio citoplasmático do CD40 indica claramente o potencial para a conexão com múltiplas vias de sinalização. Proteínas intracelulares da família dos fatores associados aos receptores de TNF (TRAF) parecem mediar algumas dessas conexões (Bishop e Hostager, 2001). A seqüência de aminoácidos dessas proteínas sugere que elas possam exercer uma função adaptadora, congregando outras proteínas sinalizadoras, embora isso ainda seja especulativo. O que sabemos com certeza é que o CD40 parece se ligar aos TRAFs 2, 3, 5 e 6,

apesar da exata função de cada uma dessas vias de transdução de sinal ainda não estar completamente esclarecida (Bishop e Hostager, 2001).

Ativação inicial pelos TRAFs desencadeia cascatas de sinalização complexas, envolvendo diversos mediadores e culminando com a ativação de diferentes fatores de transcrição. O principal deles parece ser o fator de transcrição NF- κ B, responsável por diversos efeitos pró-inflamatórios da ligação ao CD40 (Bishop e Hostager, 2001).

Descrição detalhada dessas cascatas de sinalização sai fora do objetivo de nosso trabalho, mas é interessante notar que a ligação ao CD40 pode ativar fatores de transcrição diversos; por exemplo, em linfócitos B, ativação do fator de transcrição NF- κ B ocorre através de TRAF2, enquanto através de TRAF6 ocorre ativação de ERKs e finalmente do fator de transcrição STAT6. Essa complexidade das múltiplas vias de sinalização intracelulares desencadeadas pela ativação do CD40 é sintetizada na Figura 2, mostrando que a partir do mesmo receptor (CD40), sinais divergentes podem levar à apoptose ou sobrevivência celular (Harnett, 2004).

Essa complexidade na transdução do sinal via CD40 ainda é objeto de debate e sua significância biológica ainda não está completamente esclarecida. O que está bem estabelecido é que a ligação ao CD40 pode levar à expressão de uma variedade de proteínas, incluindo citocinas, imunoglobulinas, receptores de membrana, enzimas. Em todos os casos examinados até o momento, aumento nas proteínas foi precedido por aumento nos RNAm codificadores dessas proteínas, sugerindo que CD40 exerce seus efeitos sempre através da regulação da transcrição gênica (Bishop e Hostager, 2001).

Figura 2 - Sinalização pelo CD40 pode induzir à proliferação celular ou apoptose - Oligomerização do CD40 recruta TRAFs, que se ligam a quinases (PI3K, PLC-γ, ERK, p38, and JNK), que vão ativar o fator de transcrição NF-κB. A ativação do NF-κB e a diminuição da expressão do repressor transcricional CTCF resulta em indução sustentada do c-Myc e diminuição dos inibidores do ciclo celular. Além disso, a ligação do CD40 está associada à redução nos níveis de p27^{kip}, dependente de caspase 6, indução dos genes codificando ciclinas D e Cdk4/6, resultando em hiperfosforilação do Rb, liberação de E2F e síntese de DNA. A consequência é progressão através do ciclo celular e proliferação. A mesma sinalização pelo CD40 e TRAFs pode bloquear CTCF, o qual ativa p53 entre outros, levando à parada do ciclo celular, fazendo com que a célula entre em apoptose. Adaptado de (Harnett, 2004)

1.4 Função biológica da via de sinalização CD40/CD40L

A via de sinalização CD40/CD40L foi primeiramente descrita como responsável pelo mecanismo de diferenciação e maturação de células B (Clark e Ledbetter, 1986). Posteriormente se demonstrou que sua função no sistema imune ultrapassava esses limites, sendo muito mais ampla. Podemos dizer que ativação adequada da via de sinalização CD40/CD40L é fundamental na resposta imune adquirida, tanto humoral quanto celular.

A ativação da via de sinalização leva a respostas distintas nos diversos tipos celulares. Nos linfócitos B, essa resposta é dirigida basicamente para a diferenciação e maturação celular, com a troca da classe de imunoglobulinas produzidas.

Já nas células apresentadoras de antígenos, como macrófagos e células dendríticas, o objetivo final da ligação do CD40 parece ser a ativação da resposta imune celular, com secreção de substâncias que aumentam a resposta inflamatória e ativam linfócitos T.

Outra função importante é a produção de enzimas e substâncias indispensáveis à resposta imune, como por exemplo, o óxido nítrico e as metaloproteinases de matriz.

No Quadro 1 descrevemos algumas dessas funções da ligação do CD40, com seus respectivos mediadores produzidos.

Quadro 1 - Função exercida pela ativação da via de sinalização Cd40/CD40L nos diversos tipos celulares

	Função	Tipo celular	Mediador
Imunidade Humoral	Ativação	Linfócitos B	CD23, CD30, CD80, CD86, Fas, MHCII, citocinas: IL-2, IL-10, TNF- α , TGF- β
	Troca ("switching") de classe de Ig	Linfócitos B	IgA, IgD(?), IgE, IgM, IgG
	Formação de centros germinativos e células de memória	Linfócitos B	Citocinas: IL-2, IL-10 Receptores de citocinas
Imunidade celular	Citocinas pró-inflamatórias	Linfócitos B Eosinófilos Monócitos Células dendríticas Células epiteliais Células endoteliais Células musculares lisas vasculares Queratinócitos Fibroblastos	IL-1, IL-2, IL-4, IL-8, IL-10, IL-12, TNF- α , TGF- β
	Quemocinas	Monócitos Células epiteliais Células endoteliais Queratinócitos Fibroblastos	IL-8, MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES, MCP-1, CCL-17, CCR-7
	Moléculas de adesão	Linfócitos B Fibroblastos Células endoteliais	LFA-1, ICAM-1, VCAM-1, E-selectina, VLA-4
	Metaloproteinases de matriz	Monócitos Células endoteliais Células musculares lisas vasculares Fibroblastos	Colagenases 1 e 13 (MMP-1 e 13), gelatinases A e B (MMP-2 e 9), estromelisinina 1 e 3 (MMP-3 e 11)
	Atividade pró-coagulante	Monócitos Células endoteliais Células musculares lisas vasculares	Fator tecidual (TF)
	Outros	Monócitos Células dendríticas Células endoteliais Fibroblastos	Ciclooxigenase 2, Óxido Nítrico

Adaptado de (van Kooten e Banchereau, 2000)

Mais recentemente, entretanto, uma outra função dessa sinalização emergiu, tão importante quanto as anteriormente descritas: sua participação na interface entre a imunidade inata e adquirida, interferindo diretamente nos fenômenos de autoimunidade e tolerância (Quezada *et al.*, 2004).

Células apresentadoras de antígenos (APCs) fornecem dois sinais para células T, com o objetivo de regular a ativação ou supressão de células T específicas para determinados antígenos:

- a) complexos ternários formados pelo complexo de histocompatibilidade maior (MHC), o antígeno e o receptor de células T (TCR).
- b) moléculas co-estimulatórias

As moléculas co-estimulatórias da família das proteínas B7, com a B7.1 e B7.2, e as da família dos receptores de TNF, como o CD40, têm papéis fundamentais na co-estimulação e ativação das células T. O CD40 reage com CD40L na superfície das células T ativadas e ajuda na ativação imune durante a infecção por fungos, bactérias ou vírus (Grewal *et al.*, 1996 e 1998; Mathur *et al.*, 2006).

Essa visão, centrada somente na ativação das células T mostrou não abranger toda a variedade de ações do CD40. Ao mesmo tempo que o CD40 é ligado nas APCs, estas passam a apresentar antígenos de superfície na tentativa de ativar as células T, mas, ao mesmo tempo, as próprias APCs se tornam ativadas, através de sinalização dependente de CD40, produzindo uma série de citocinas e enzimas que irão participar ativamente da resposta imune (van Kooten e Banchereau, 2000) (Figura 3).

Figura 3 - Esquema da ativação de linfócito T por célula dendrítica. Inicialmente o antígeno é fagocitado pela célula dendrítica imatura e metabolizado (①). Peptídeo antigênico é, então, apresentado aos linfócitos através do complexo de histocompatibilidade maior (MHC) (②). O peptídeo antigênico se liga ao receptor de célula T (TCR), desencadeando o primeiro sinal para a ativação do linfócito (③), ao mesmo tempo em que aumenta a expressão, na parede do linfócito do ligante CD40L (④). CD40L vai, então, ativar o receptor CD40 na parede da células apresentadora de antígeno (⑤). A ativação do CD40 desencadeia a produção de citocinas e outras moléculas envolvidas na resposta inflamatória pela APC e, também, expressão de proteínas co-estimuladoras (CD80, CD86) (⑥). Esses co-estimuladores, então, ligam-se ao CD28 do linfócito (⑦), tornando-a uma célula ativa, envolvida na resposta imune (⑧)

Esse fenômeno é extremamente importante, por exemplo, na ativação e maturação de células dendríticas (O'Sullivan e Thomas, 2003). Ligação do CD40L presente em linfócitos T CD4+ leva à diferenciação das células dendríticas, definida por uma expressão aumentada de MHC e moléculas co-estimulatórias e de adesão. Além disso, as células dendríticas passam a produzir grandes quantidades de citocinas, principalmente IL-12, o que polariza as células T CD4+ para uma resposta T helper 1 (Th1), aumenta a proliferação de células T CD8+ e ativa células NK (O'Sullivan e Thomas 2003).

Dessa forma, CD40 participa de maneira fundamental na decisão entre tolerância e imunidade e a geração de células T CD4+, responsáveis pela manutenção da auto-tolerância *in vivo* (Kweon e Kiyono, 2002).

Na Figura 4 podemos observar as interações entre os vários tipos celulares que utilizam a via de sinalização CD40/CD40L para comunicação, e suas diferentes respostas.

Figura 4 - A interação entre CD40 e CD40L na regulação imune. CD40L expresso pelas células T interage com CD40 em APCs e induz diferentes funções efetoras. A interação CD40/CD40L não somente ajuda a co-estimulação de células T e diferenciação de células T efectoras (Th1, Th2), mas também ativa macrófagos, células dendríticas e células B. Em linfócitos B, CD40/CD40L resgata as células da apoptose induzida por IgG e ajuda na produção e troca de classe de anticorpos, bem como na maturação das células. Em macrófagos, CD40/CD40L ativa a secreção de mediadores pró-inflamatórios como TNF- α e IL-12, induz a produção de ERO e NO e aumenta a capacidade de apresentação de antígenos. O mesmo acontece com células dendríticas estimuladas por CD40/CD40L, que são induzidas à maturação e conseqüentemente ajudam na regulação das funções de apresentação do antígeno

1.5 Expressão Constitutiva de CD40 e CD40L

O CD40 foi descrito inicialmente em linfócitos B, participando da diferenciação e ativação destas células (Paulie *et al.*, 1984; Clark e Ledbetter, 1986). Posteriormente, foi demonstrado que CD40 é constitutivamente expresso na maioria dos tipos celulares do sistema imune, incluindo macrófagos (Mach *et al.*, 1997), monócitos circulantes (Alderson *et al.*, 1993), células dendríticas (Freudenthal e Steinman, 1990) e linfócitos T ativados (Fanslow *et al.*, 1994a). No final da década de 90 foi demonstrado que também células da parede vascular, células endoteliais e musculares lisas expressam CD40 (Mach *et al.*, 1997), um achado que desencadeou grande interesse e abriu um campo de investigação sobre o papel dessa via de sinalização em doenças cardiovasculares.

Já a expressão de CD40L parece ser mais restrita. Estudos pioneiros mostraram sua presença na superfície de linfócitos T maduros ativados, mas não naqueles em repouso (Armitage *et al.*, 1992) e que essa expressão se inicia cinco minutos após o estímulo, com um pico ocorrendo após 6 a 12 horas (Roy e Waldschmidt, 1993). Também foi descrito que a expressão de CD154 em linfócitos envolve mecanismos dependentes e independentes de co-estimulação através de outros receptores (Ding *et al.*, 1995). Mais recentemente foi demonstrada a presença de CD40L nas células que constituem a parede vascular (Mach *et al.*, 1997), bem como em plaquetas circulantes (Aukrust *et al.*, 1999).

No Quadro 2 mostramos os tipos celulares que expressam CD40 e/ou CD40L de maneira constitutiva.

Quadro 2 - Tipos celulares que expressam CD40 e CD40L

	Tipo celular
CD40	Linfócitos B
	Células progenitoras CD34 ⁺
	Linfócitos T (CD4 ⁺ , CD8 ⁺ , CD4 ⁺ /8 ⁺ , TCR ⁺)
	Granulócitos polimorfonucleares (basófilos, eosinófilos)
	Fagócitos mononucleares (monócitos/macrófagos)
	Células dendríticas
	Células epiteliais
	Células endoteliais
	Células musculares lisas vasculares e brônquicas
	Queratinócitos
	Fibroblastos
CD40L	Linfócitos T (CD4 ⁺ , CD8 ⁺ , CD4 ⁺ /8 ⁺ , TCR ⁺ , CD45RO ⁺ , CD45RA ⁺ , Th0 ⁺ , Th1 ⁺ , Th2 ⁺ , Tc1 ⁺ , Tc2 ⁺)
	Linfócitos B (provavelmente não fisiológico)
	Granulócitos polimorfonucleares (basófilos, eosinófilos)
	Mastócitos
	Fagócitos mononucleares (monócitos/macrófagos)
	Células NK (natural killers)
	Células dendríticas
	Células epiteliais
	Células endoteliais
	Células musculares lisas vasculares e brônquicas
	Plaquetas

1.6 Regulação da Expressão de CD40 e CD40L

Muito do interesse sobre CD40/CD40L advém do fato da expressão de ambas as moléculas variarem em diferentes situações, tanto fisiológicas quanto patológicas. Desde a sua descrição, em linfócitos B, sabe-se que a expressão de CD40 varia conforme o estado de diferenciação dessas células (Clark e Ledbetter, 1986). Em outras células, esse fenômeno também ocorre e pode estar relacionado a diferentes funções exercidas por essas moléculas.

É enorme a gama de estímulos capazes de estimular a expressão de CD40 e/ou CD40L. Embora esse seja um assunto envolvente, vamos restringir nossa discussão àqueles estímulos que fazem parte diretamente da reação inflamatória e que têm relação com o assunto que foram, ou são, endereçados em trabalhos de nosso laboratório.

Na tabela abaixo, listamos alguns fatores que alteram a expressão de CD40 e/ou CD40L (Quadro 3). Algumas substâncias estimulam a expressão de ambas as proteínas nos mesmos tipos celulares, porém é interessante notar que esse aumento pode ocorrer em tempos diferentes. É o caso, por exemplo, das células endoteliais, onde a expressão da proteína CD40L se inicia rapidamente e chega ao pico 6 horas após a estimulação com IL-1 β ou TNF- α , enquanto a de CD40 inicia-se 6 a 12 h após a estimulação, chega a um pico após 24 horas e persiste alta por 24 a 72 h após o mesmo estímulo (Schonbeck *et al.*, 2000a).

É curioso também notar que estímulos que se pensava serem restritos à comunicação entre células do sistema imune podem modular

respostas similares em células da parede vascular. É o caso das citocinas pró-inflamatórias, IL-1 β , IL-4 e TNF- α que foram descritas como potentes indutores da expressão de CD40L em linfócitos e células apresentadoras de antígenos (Armitage *et al.*, 1992; McLellan *et al.*, 1996; Mach *et al.* 1997). O mesmo efeito foi observado em células endoteliais e musculares lisas vasculares (Mach *et al.*, 1997), com a expressão de CD40L funcionalmente ativo sendo aumentada 12 a 24 horas após a exposição a IL-1 β e TNF- α (Mach *et al.*, 1997). Esse fato mostra a inseparável relação entre as células do sistema imune e a parede vascular.

Quadro 3 - Estímulo responsável pela indução da expressão de CD40 ou CD40L

	Tipo celular	Estímulo	Autores
CD40	Monócitos/macrófagos	IL-3, TNF- α , IFN- γ , GM-CSF, IL-1 β	Alderson <i>et al.</i> , 1993; Reischl <i>et al.</i> , 1996; Mach <i>et al.</i> , 1997
	Células dendríticas	IL-1 β , TNF- α , IL-4, radiação ultravioleta	Gilliam <i>et al.</i> , 1998; O'Sullivan e Thomas, 2003
	Linfócitos B	IL-1 β , TNF- α , IL-4, IFN- γ ,	Clark e Ledbetter, 1986; Law <i>et al.</i> , 1990; van Kooten e Banchereau, 2000
	Células epiteliais	GM-CSF, IFN- γ , IL-1 β , TNF- α	McLellan <i>et al.</i> , 1996; Schonbeck <i>et al.</i> , 2000a
	Células endoteliais	IL-1 β , TNF- α , IFN- γ , HIV-1	Hollenbaugh <i>et al.</i> , 1995; Karmann <i>et al.</i> , 1995; Yellin <i>et al.</i> , 1995; Mach <i>et al.</i> , 1997; Moses <i>et al.</i> , 1997
	Células musculares lisas vasculares	IL-1 β , TNF- α , IFN- γ ,	Hollenbaugh <i>et al.</i> , 1995; Karmann <i>et al.</i> , 1995; Yellin <i>et al.</i> , 1995; Mach <i>et al.</i> , 1997
	Fibroblastos	IFN- γ	Fries <i>et al.</i> , 1995
CD40L	Linfócitos T	IL-4,	Fuleihan <i>et al.</i> , 1995; Murakami <i>et al.</i> , 1999
	Monócitos/Macrófagos	IL-1 β , TNF- α , IFN- γ ,	Alderson <i>et al.</i> , 1993; Reischl <i>et al.</i> , 1996; Mach <i>et al.</i> , 1997
	Células NK	IL-2	Cocks <i>et al.</i> , 1993
	Linfócitos B	LPS	Blossom e Chu, 1997
	Células endoteliais	IL-1 β , TNF- α , IFN- γ ,	Hollenbaugh <i>et al.</i> , 1995; Karmann <i>et al.</i> , 1995; Yellin <i>et al.</i> , 1995; Mach <i>et al.</i> , 1997; Moses <i>et al.</i> , 1997
	Células musculares lisas	IL-1 β , TNF- α , IFN- γ ,	Mach <i>et al.</i> , 1997
	Plaquetas	Trombina	Henn <i>et al.</i> , 1998; Varo <i>et al.</i> , 2005

O que nos chamou a atenção, inicialmente, para o estudo da via de sinalização CD40/CD40L foi o fato de muitos dos estímulos listados na tabela acima e que desencadeavam sua expressão aumentada serem capazes também de gerar espécies reativas de oxigênio intracelularmente. É o caso, por exemplo, da radiação ultravioleta, lipopolissacáride, e citocinas. Na época, estávamos estudando algumas das vias de sinalização influenciadas pelo equilíbrio redox intracelular e formulamos a hipótese de que as ERO poderiam agir como segundos mensageiros na cascata de transdução de sinal que estimulava a expressão aumentada de CD40/CD40L na parede vascular.

Antes de mostrar os resultados desse nosso estudo, gostaria de fazer alguns comentários sobre as ERO como transdutores de sinal intracelular. Embora não seja, no momento, meu alvo principal de interesse, continuamos em nosso laboratório trabalhando nessa linha de pesquisa e conseguindo resultados interessantes.

1.7 ERO como Mecanismo de Transdução de Sinal

Durante muito tempo se estudou as ERO apenas como efetoras de lesão tecidual. Situações onde há grande aumento na geração de ERO ou diminuição na disponibilidade ou acessibilidade das defesas antioxidantes, ocasionam estresse oxidativo, que pode causar lesão celular, muitas vezes irreversível. Esse mecanismo participa da gênese de diversas doenças.

Realmente, são múltiplos os alvos celulares das ERO no ambiente celular e a importância de cada uma dessas alterações oxidativas depende diretamente do grau de lesão e da capacidade de reparo das estruturas. Entretanto, a partir da década de 80, com a descoberta do óxido nítrico (também um radical livre), e suas funções sinalizadoras na parede vascular, houve uma mudança importante do paradigma das ERO em sistemas biológicos. Diversos estudos passaram a descrever reações de oxidação e redução como um sistema integral de sinalização celular seja agindo diretamente nas proteínas efetoras, seja atuando na transdução de sinal (Azevedo *et al.*, 2000; McCord, 2000). Hoje são múltiplos os processos celulares que sabemos serem modulados por reações de oxidação e redução.

Demonstramos, em trabalho anterior, sob orientação do Prof. Dr. Francisco Laurindo, que a distensão mecânica de artérias induz a geração de ERO, basicamente através de uma oxidase, capaz de reduzir oxigênio molecular, utilizando tanto NADH ou NADPH como doadores de elétrons. ERO geradas por essa NAD(P)H oxidase vascular podem ativar o fator de transcrição NF- κ B, influenciando assim no programa gênico após lesão (Souza *et al.*, 2000)

(Figura 5). O resultado final da geração de ERO para sinalização da lesão celular pode ser aumento da proliferação e migração de células musculares lisas vaculares, formando uma camada neoíntima espessa e remodelamento negativo do vaso lesado. Num contexto clínico, esse processo leva à reestenose de uma artéria coronária que sofreu angioplastia (Azevedo *et al.*, 2000).

Figura 5 - Geração de ERO após lesão vascular ativa o fator de transcrição NF- κ B. A figura mostra um ensaio de retardo de eletromobilidade em gel. Após lesão arterial ex vivo (Banda A) ocorre ativação de NF- κ B, que não é observada no vaso intacto (Banda B). O tratamento do vaso, previamente, com um inibidor de oxidase (difenileneiodônio - DPI) inibe completamente a ativação de NF- κ B (Banda C), sugerindo que, após lesão arterial por distensão, como observado após uma angioplastia, ocorre um maciço aumento da geração de ERO, através de uma oxidase vascular. Essas ERO agem como segundos mensageiros na ativação do fator de transcrição NF- κ B, podendo desencadear o processo inflamatório que culminará com reestenose do vaso angioplastado

Posteriormente, extendemos o conhecimento sobre a caracterização da oxidase, principal fonte de ERO utilizada na transdução de sinal na parede vascular, demonstrando que era uma enzima distinta da NADPH oxidase dos fagócitos (Souza *et al.*, 2001) e, finalmente, criando metodologia para medição mais específica da quantidade de superóxido produzida por essa enzima (Souza *et al.*, 2002).

O limite entre as ações sinalizadora e lesiva das ERO é ainda difícil de ser definido. A espécie reativa gerada, sua quantidade, localização de sua produção, bem como a presença e acessibilidade dos sistemas antioxidantes e das proteínas alvo, influem decisivamente no destino das ERO, e na função que cumprem. Um exemplo clássico é o da morte celular. Quantidades pequenas de ERO são geradas para estimular a sobrevivência e proliferação de células musculares lisas vasculares. ERO geradas em maior quantidade podem desencadear apoptose. Se o estresse oxidativo é ainda maior e mantido por mais tempo, a produção de ERO pode levar à necrose celular. Devido a dificuldades metodológicas de medição e manipulação das ERO em tecidos e localizações específicas, ainda não somos capazes de determinar com exatidão quais os mecanismos exatos envolvidos nessas diferentes respostas.

1.8 ERO como Segundos Mensageiros na Expressão de CD40 e CD40L

Após essa interrupção para que pudéssemos discutir o papel das ERO na transdução de sinal, voltemos aos nossos velhos conhecidos, CD40 e CD40L.

Como dito acima, formulamos a hipótese de que as ERO poderiam agir como segundos mensageiros na cascata de transdução de sinal que estimula a expressão de CD40/CD40L na parede vascular.

Inicialmente, para determinar se nossa hipótese estava correta, tratamos células musculares lisas vasculares com citocinas que sabidamente aumentam a expressão de CD40 e CD40L. Na Figura 6, observamos que houve produção aumentada de superóxido nessas células tratadas com citocinas. Utilizamos nesses ensaios a ressonância eletrônica paramagnética (EPR), método bastante específico para detecção de superóxido (Souza *et al.*, 2002). A espécie reativa gerada era superóxido, pois quando as células foram incubadas com um mimético de superóxido dismutase permeável a membranas, o sinal detectado ao EPR desapareceu. O superóxido detectado nesses experimentos era proveniente de uma oxidase que contém uma fração $p22^{\text{phox}}$, já que transfecção dessas células com antissenso contra essa proteína bloqueou a produção de superóxido. Sabemos que uma família de oxidases que contém a fração $p22^{\text{phox}}$ (membros da família das Nox) são as principais fontes de superóxido na parede vascular, entretanto, não nos propusemos, nesses experimentos, a determinar qual das isoformas da Nox estava ativada.

O tratamento dessas células com citocinas também aumentou a expressão de CD40, como descrito também por outros autores Mach *et al.*, 1997.

Quando essas células foram tratadas previamente com antioxidantes (N-acetilcisteína) ou inibidores da oxidase vascular (difenileneiodônio - DPI) houve um marcante decréscimo da expressão de CD40, sugerindo que ERO geradas por uma oxidase eram fatores necessários para aumento da expressão de CD40 induzido por citocinas (Figura 7).

As ERO geradas para transdução de sinal eram provenientes de uma oxidase contendo $p22^{phox}$, já que o bloqueio da síntese dessa proteína através da transfecção de um antissenso diminuiu sensivelmente a expressão de CD40 (Figura 8).

Confirmando um papel das ERO como mensageiras na expressão de CD40, células musculares lisas vasculares foram tratadas com peróxido de hidrogênio. Podemos observar um marcante aumento na expressão da proteína CD40, 12 horas após o tratamento (Figura 9).

Mais interessante é o fato de que a expressão de CD40L não é afetada nem pelo tratamento com antioxidantes antes da exposição a citocinas, nem pelo desafio com peróxido de hidrogênio (Figura 9).

Os métodos referentes a esses experimentos encontram-se no Apêndice.

Em conjunto esses dados sugerem que ERO geradas por uma oxidase contendo $p22^{phox}$ é essencial para a transdução do sinal das citocinas IL-1 β e TNF- α e inativação dessa enzima diminui a expressão de CD40 induzida por estímulos antiinflamatórios em células musculares lisas vasculares. A expressão de CD40L não é afetada, sugerindo mecanismos muito diferentes de controle da expressão e transdução de sinal para as duas proteínas, provavelmente como um meio de evitar ativação indesejada dessa via de sinalização.

Figura 6 - Produção de superóxido por células musculares lisas de coronária humana. A figura mostra experimentos realizados com células musculares lisas vasculares obtidas de coronárias humanas (CASMCS) expostas a citocinas e a detecção de superóxido sendo realizada por ressonância eletrônica paramagnética (EPR), com uso do sequestrador (“spin trap”) DMPO. Um sinal quádruplo (quarteto), característico da formação de um aduto DMPO-hidroxil (DMPO-OH) foi detectado quando CASMCS foram expostas a IL-1 β ou TNF- α (espectros B e C, painel à esquerda). Esses sinais foram quantificados por um método específico, desenvolvido por nós e publicado em 2002 (Souza et al., 2002). Esse método permitiu definir que a formação de ERO em células expostas a citocinas era $167 \pm 25\%$ e $151 \pm 14\%$ (para IL-1 β e TNF- α , respectivamente) quando comparada às ERO produzidos pelas células sob condições basais. Embora pequenas, essas diferenças eram significantes, devido à especificidade da metodologia utilizada. Os sinais DMPO-OH eram derivados de superóxido sequestrado pelo “spin trap” DMPO, já que células tratadas com um mimético da superóxido dismutase permeável a membranas inibiu completamente o sinal. O superóxido detectado nesses experimentos foi originado de uma oxidase contendo p22^{phox} já que a transfecção dessas células com oligonucleotídeos antissenso contra a fração p22^{phox} da oxidase vascular inibiu completamente a produção de superóxido induzida por IL-1 β ou TNF- α (espectros B e C, painel à direita). A transfecção isoladamente não alterou a produção de superóxido por essas células (espectro A, painel à direita). A viabilidade das células expostas a esses tratamentos não sofreu modificação

Figura 7 - Expressão de CD40 induzida por IL-1 β ou TNF- α depende de ERO. Células musculares lisas vasculares obtidas de coronárias humanas e mantidas em cultura foram estimuladas por 12 horas com IL-1 β ou TNF- α e a expressão de CD40 foi detectada por imunoblot (painel B) e quantificada por densitometria (painel A). Observamos um aumento da expressão de CD40 na parede celular em $262 \pm 18\%$ ou $345 \pm 11\%$, após tratamento com IL-1 β ou TNF- α , respectivamente. Uma vez que mostramos acima que essas citocinas aumentam a geração de superóxido, através da estimulação de uma oxidase contendo p22phox, tratamos essas células com antioxidantes intracelulares (N-acetilcisteína, 10 mM) ou inibidores inespecíficos da oxidase (difenileneiodônio, 10 mM) antes da exposição a citocinas. Pudemos observar uma redução significativa da expressão de CD40 onde a produção de ERO foi bloqueada, sugerindo a participação de ERO na cascata de transdução de sinal que culmina com a expressão de CD40. Um dado curioso é o fato de que os antioxidantes não afetam a expressão de CD40L.

Figura 8 - Bloqueio da oxidase vascular diminui a expressão de CD40 em células musculares lisas vasculares de coronárias humanas tratadas com IL-1 β ou TNF- α . Nos experimentos acima (Figura 7) foi utilizado um inibidor inespecífico da oxidase vascular. Para obter resultados mais específicos, as células foram transfectadas com um oligonucleotídeo antissenso contra a fração p22^{phox} dessa oxidase, tornando-a inativa, pois não existem inibidores farmacológicos dessa enzima. No experimento representado acima, CSMCs transfectadas com antissenso anti-p22^{phox} ou antissenso controle (scrambled) foram tratadas com IL-1 β ou TNF- α por 12 horas. A detecção de CD40 foi feita por imunoprecipitação. Na figura, observamos que, em condições basais, a expressão de CD40 nessas células é baixa. Quando, porém, ocorre estimulação por citocinas pró-inflamatórias, um aumento significativo da expressão de CD40 é observado. Nas células que foram transfectadas com anti-p22^{phox} o aumento da expressão de CD40 induzido por citocinas não ocorre, sugerindo uma participação importante de ERO produzidas por essa enzima na transdução de sinal que culmina com o aumento da expressão de CD40

Figura 9 - Células musculares lisas vasculares de coronárias humanas em cultura, tratadas com peróxido de hidrogênio apresentam expressão aumentada de CD40, mas não de CD40L. Confirmando o papel das ERO na transdução de sinal envolvida na expressão de CD40, células musculares lisas vasculares obtidas de coronárias humanas foram expostas a peróxido de hidrogênio (100 μ M) por 1 hora e a expressão de CD40 e CD40L foi determinada 12 horas após, por imunoblot. Observamos um marcante aumento da expressão de CD40 (aproximadamente 500%), como mostrado no Painel A. A expressão de CD40L, por outro lado, não é afetada

1.9 Sinalização Através de CD40/CD40L: Importância e Complexidade

Nos itens acima, relatamos, embora superficialmente, alguns aspectos relevantes da função fisiológica da via de sinalização CD40/CD40L. Fica evidente a complexidade dos fenômenos envolvidos na expressão e funcionamento dos seus componentes. CD40 e CD40L podem ser expressos em diversos tipos celulares envolvidos na resposta imune, e essa expressão varia conforme a ativação, diferenciação e maturação dessas células. Como vimos, os efeitos da ligação do CD40 podem ser até opostos, como no caso da sobrevivência celular.

Nossa contribuição na área acrescenta um grau a mais a toda essa complexidade. Demonstramos que a geração de espécies reativas de oxigênio intra ou extracelularmente pode levar a um aumento da expressão funcional de CD40, mas não de CD40L. Esse fenômeno pode ser importante, pois ocorre geração aumentada de ERO em sítios de inflamação, característica de diversas doenças inflamatórias crônicas. Além disso, doenças vasculares têm um componente importante de estresse oxidativo em sua patogênese. Assim, a expressão de CD40 induzida por ERO pode oferecer uma explicação para complicações vasculares inflamatórias de doenças como doenças autoimunes ou hipertensão induzida por angiotensina II, como veremos no capítulo a seguir.

PARTE 2

A VIA DE SINALIZAÇÃO CD40/CD40L EM SITUAÇÕES PATOLÓGICAS

2.1 Introdução

Quando passei a me interessar mais profundamente por essa linha de pesquisa, uma das coisas que me atraiu foi a possibilidade de utilizar vários modelos experimentais, devido às diversas doenças onde a via de sinalização CD40/CD40L está envolvida. Assim, com o objetivo de estudar a via de sinalização CD40/CD40L, podemos utilizar modelos experimentais de aterosclerose, ou de sepse, pois em ambas essas doenças ocorre participação do CD40/CD40L. Mais interessante é o fato de podermos também transportar esses conhecimentos para pacientes portadores dessas doenças, ou de outras, como as doenças autoimunes, onde essa via também é ativa.

Assim, nessa segunda parte, iremos discutir algumas doenças onde a participação do CD40/CD40L é importante. Vamos nos ater à aterosclerose, mais especificamente aos modelos experimentais em animais, às doenças autoimunes, em especial o lúpus eritematoso sistêmico e à sepse.

Iremos dar atenção, principalmente, às nossas contribuições nessas áreas, algumas delas ainda não publicadas e que acreditamos serem bastante interessantes.

2.2 A Via de Sinalização CD40/CD40L na Aterosclerose

2.2.1 Aterosclerose, doença inflamatória

Durante anos a aterosclerose foi considerada uma doença de acúmulo passivo de lípides na parede de grandes e médias artérias. Esse paradigma foi abandonado no final dos anos 80, em benefício de uma visão mais dinâmica da fisiopatologia dessa doença (Ross, 1993 e 1999).

A hipótese corrente para a patogênese dessa doença enfatiza a disfunção endotelial como o primeiro passo na formação da placa de ateroma. Na disfunção endotelial há diminuição do relaxamento vascular endotélio-dependente, expressão de moléculas de adesão pelas células endoteliais e acúmulo de macrófagos e linfócitos no espaço subendotelial (Lusis, 2000). Possíveis causadores de disfunção endotelial são o tabagismo, hipertensão, níveis elevados e modificação do LDL, concentrações plasmáticas elevadas de homocisteína ou a combinação desses e outros fatores (Ross, 1999).

A lesão mais precocemente detectável é a “estria gordurosa”, histologicamente caracterizada como um agregado de macrófagos e células T repletos de gordura dentro da camada intimal. Essas estrias gordurosas precedem o desenvolvimento de lesões mais complexas, as placas ateromatosas, compostas por uma capa fibrosa, contendo células musculares lisas vasculares, envolvendo um centro de material necrótico e lípidos (Cusack *et al.*, 2000).

Com o crescimento da placa, há um processo ativo de remodelamento da parede arterial, que, através do aumento do perímetro externo da parede vascular, tenta minimizar o efeito hemodinâmico do

estreitamento luminal (Saito *et al.*, 2002). Até esse estágio, a lesão vascular é clinicamente assintomática. A partir daí, pode se tornar sintomática caso o processo de remodelamento seja suplantado pelo crescimento da lesão ou haja ruptura da capa fibrosa da placa, com subsequente trombose local, suficiente para ocluir o fluxo sanguíneo arterial (Cusack *et al.*, 2000; von Birgelen *et al.*, 2000).

Todo esse processo evolutivo apresentado pela lesão aterosclerótica na parede arterial pode ser entendido como uma série de respostas celulares e moleculares altamente específicas que, em conjunto, podem ser melhor descritas como um processo inflamatório crônico (Lusis, 2000). Como veremos adiante, esse processo inflamatório é ainda mais evidente no desencadeamento dos eventos coronarianos agudos.

2.2.2 Eventos coronarianos agudos

As síndromes coronarianas agudas representam o espectro mais visível, e grave da lesão vascular pela aterosclerose. Nos últimos anos, os conceitos convencionais de sua patogênese vêm mudando. Lesões de alto risco não são necessariamente aquelas nas quais existe um maior estreitamento. Mais de dois terços dos casos de infarto agudo do miocárdio ocorrem em artérias que mostravam apenas moderada estenose em angiogramas realizados nas semanas ou meses anteriores ao evento agudo (Libby, 2001).

A ocorrência de um evento coronariano agudo está relacionada à ruptura da placa aterosclerótica, levando à trombose no local e isquemia do tecido irrigado (Libby, 2000). Dessa maneira, o foco do tratamento

preventivo de eventos coronarianos agudos foi mudado da redução do tamanho da placa aterosclerótica para o aumento na estabilidade da mesma (Naghavi *et al.*, 2003a e 2003b).

Inúmeras evidências sugerem que a ruptura da placa aterosclerótica está relacionada a recrudescimento do processo inflamatório presente em sua vizinhança. Na circulação coronária, o local de ruptura da placa tem sido descrito consistentemente como sítio de um processo inflamatório ativo, em exames postmortem (Kovanen *et al.*, 1995; van der Wal *et al.*, 1998). Espécies recolhidos por aterectomia mostram ativação recente da resposta inflamatória, com aumento na proporção de células T ativas presentes (de Boer *et al.*, 2000).

Mais interessante é o fato de que células T que se acumulam nas regiões vulneráveis da placa aumentam sua produção de enzimas capazes de degradar colágeno, inclusive as metaloproteinases de matriz (MMPs). A produção de citocinas no local, especialmente interleucina 1 β (IL-1 β) e fator de necrose tumoral α (TNF- α), pode também levar a um aumento na produção de MMPs pelas células musculares lisas (Jones *et al.*, 2003). O processo inflamatório local, mais especificamente as células T, também levam as células musculares lisas vasculares a uma diminuição da produção de colágeno (Libby, 2001). Somados esses fatores, a capa fibrosa da placa aterosclerótica apresenta-se propícia à ruptura.

Recentemente foi demonstrado que a ligação do receptor CD40 com o antígeno de membrana CD40L, participa ativamente dos processos que levam à ruptura da placa aterosclerótica (Libby, 2000).

2.2.3 A via de sinalização CD40/CD40L na fisiopatologia da aterosclerose

O achado que ambos os mediadores, CD40 e CD40L, têm sua expressão aumentada e são funcionais em células endoteliais, musculares lisas e macrófagos presentes na lesão aterosclerótica *in situ* e *in vitro* (Mach *et al.*, 1997) desencadeou um interesse crescente sobre o papel da díade nessa patologia (Schonbeck e Libby, 2001b).

A relevância biológica desses mediadores na patogênese da aterosclerose foi confirmada com o uso de modelos animais. Camundongos hiperlipidêmicos deficientes em receptores para LDL (LDLr *-/-*) tratados com um anticorpo anti-CD40L apresentaram uma significativa redução no desenvolvimento de lesões ateroscleróticas (Mach *et al.*, 1998b). Mais interessante é o achado que a ruptura da expressão de CD40L em camundongos deficientes em apolipoproteína E (CD40L *-/-* e ApoE *-/-*) não afetou a formação inicial das lesões ateroscleróticas, mas resultou em placas contendo menos lípidos, mais ricas em colágeno e mais estáveis (Lutgens *et al.*, 2000).

2.2.4 A via de sinalização CD40/CD40L na ruptura da placa aterosclerótica

Os mecanismos pelos quais a ligação CD40-CD40L afeta a estabilidade da placa aterosclerótica ainda não estão completamente esclarecidos. Entre os processos que são mediados por esse mecanismo estão a expressão de MMP-1 (colagenase intersticial tipo 1), MMP-2 (gelatinase), MMP-3 (estromelisinase 1) e MMP-9 (gelatinase B), moléculas consideradas cruciais no processo de progressão e ruptura da placa (Mach *et al.*, 1997; Mach *et al.*, 1998a; Schonbeck *et al.*, 2000b). É importante destacar que a produção de MMPs é modulada pela ligação CD40-CD40L tanto em células musculares lisas vasculares como em macrófagos (Schonbeck *et al.*, 1997a e 1997b), tipos celulares mais abundantes na constituição da placa aterosclerótica.

A mesma díade está envolvida no aumento da expressão de fator tecidual em células endoteliais (Slupsky *et al.*, 1998) e musculares (Schonbeck *et al.*, 2000a), o que pode desencadear os fenômenos trombóticos agudos responsáveis pela isquemia tecidual.

É interessante notar que a ligação de CD40L, expresso por plaquetas, com o receptor CD40 presente em células endoteliais leva a um aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias (IL β -1, IL 6), bem como na expressão de moléculas de adesão pelo endotélio (VCAM) (Henn *et al.*, 1998).

Somados todos esses fatores, podemos concluir que a ligação CD40-CD40L desempenha um papel importante na regulação do processo inflamatório presente na lesão aterosclerótica, participando ativamente do processo de ruptura da placa.

2.2.5 Evidências clínicas

Nos últimos anos, diversos estudos comprovaram a importância da ativação do CD40 no desenvolvimento da aterosclerose e no desencadeamento de síndromes isquêmicas agudas.

Níveis séricos elevados de CD40L solúvel podem ser encontrados em pacientes com fatores de risco para doença coronariana. É o caso, por exemplo, de pacientes com hipercolesterolemia familiar (Semb *et al.*, 2003) ou diabetes (Varo *et al.*, 2003b).

Mais importante, porém, parece ser o papel do CD40/CD40L no desencadeamento das síndromes coronárias agudas. Estudos pioneiros mostraram que pacientes com angina instável ou infarto agudo do miocárdio, apresentam níveis circulantes de CD40L solúvel mais altos do que pacientes não coronariopatas ou com angina estável (Aukrust *et al.*, 1999).

Posteriormente, demonstrou-se que níveis séricos elevados de CD40L solúvel eram fatores preditores independentes de prognóstico, separando aqueles pacientes com maior risco de sofrerem novos eventos (Heeschen *et al.*, 2003; Varo *et al.*, 2003a).

Apesar do entusiasmo provocado pela publicação desses dados, o uso rotineiro de medição do CD40L solúvel ainda não chegou à prática clínica. Além disso, estudos mais recentes têm questionado a habilidade do CD40L solúvel de identificar pacientes de risco (de Lemos *et al.*, 2005) ou demonstrado que níveis séricos de CD40L não são melhores que dosagens de proteína C reativa como preditores de eventos coronarianos (Liang *et al.*, 2006).

A verdade é que, como todo novo método, principalmente aqueles dirigidos ao uso clínico, dosagens séricas de CD40L solúvel estão, e devem, realmente, estar sob um forte escrutínio. Novos estudos estão sendo conduzidos, com maior número de pacientes e diferentes sub-populações, na tentativa de se estabelecer sua utilidade clínica.

2.2.6 Angiotensina e a via de sinalização CD40/CD40L

O papel da angiotensina II no desenvolvimento da doença coronária aterosclerótica e suas complicações estão bem documentadas (Dzau, 2001; Kintscher *et al.*, 2004; Li e Chen., 2005), tanto por estudos comprovando seu papel na fisiopatologia da doença, como por grandes ensaios clínicos com drogas inibidoras da enzima conversora, mostrando o benefício do uso dessa drogas na evolução da doença aterosclerótica e na prevenção de eventos coronários primários ou secundários (Psaty *et al.*, 2003; Dagenais *et al.*, 2006).

Um dos efeitos conhecidos da angiotensina II é sua capacidade de aumentar a geração de espécies reativas de oxigênio nas células da parede vascular (Griendling *et al.*, 1994). As ERO são produzidas basicamente por uma oxidase vascular (Nox1) (Griendling *et al.*, 1994) e são utilizadas para transdução do sinal da AngII para o ambiente intracelular (Touyz, 2004).

Baseado nesses fatos e em nossos resultados anteriores, mostrados acima, formulamos a hipótese de que espécies reativas de oxigênio, geradas na parede vascular pela ligação da AngII poderiam aumentar a expressão dos componentes da via de sinalização CD40/CD40L em células da parede vascular.

Inicialmente, tratamos células musculares lisas, obtidas de coronárias humanas (CASMCs) com AngII. Uma hora após, já pudemos observar um marcante aumento no RNAm para CD40, que se manteve elevado por até oito horas (Figura 10). Esse efeito foi dependente da dose, na faixa de 50 a 200 nM. Pudemos detectar também aumento da expressão da proteína CD40, 12 horas após estimulação com AngII (Figura 11). Esse aumento na expressão de CD40 foi bloqueado pelo tratamento com antioxidantes (N-Acetilcisteína).

O aumento da expressão de CD40 induzido por Ang II mostrou ser relevante biologicamente, já que exposição de células previamente tratadas com AngII ao CD40L provocou uma resposta exacerbada dessas células ao CD40L, com aumento da secreção de citocinas e da expressão de ciclooxigenase 2 (Figura 12).

Para determinar se o mesmo fenômeno ocorria in vivo, utilizamos modelo de hipertensão dependente de AngII, em trabalho realizado em colaboração com Profa. Dra. Rita Tostes Passaglia, do Departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

Ratos Wistar machos, tornados hipertensos dependentes de AngII pelo clampeamento de uma artéria renal (dois rins, um clipe) apresentavam maior expressão de CD40 na parede vascular (Figuras 13 e 14).

Interessante notar que a expressão de CD40L não foi afetada por AngII, da mesma maneira que não foi afetada por ERO.

Figura 10 - Tratamento de CSMCs com AngII provoca aumento na expressão de RNAm para CD40. CSMCs em cultura, tratadas com Ang II por doses e tempos diferentes, como mostrado na figura, aumentam a transcrição de RNAm para CD40. A detecção de RNAm foi feita por RT-PCR. Os dados mostrados representam média $\pm$ EPM, de pelo menos quatro experimentos em cada grupo

Figura 11 - Antioxidantes diminuem a expressão de CD40 induzida por AngII. CSMCs tratadas com AngII também aumentam a expressão de proteína CD40, 12 horas após a exposição. Esse fenômeno é diminuído pelo tratamento prévio com antioxidantes (N-acetilcisteína), sugerindo que ERO exercem papel de segundos mensageiros nesse fenômeno. O gráfico mostra a quantidade de proteína CD40 em CSMCs, detectada por wsetern blotting e quantificada por densitometria. Dados são média $\pm$ EPM, de pelo menos quatro experimentos em cada grupo

Figura 12 - Aumento da expressão de CD40 induzida por AngII leva a aumento da produção de IL-1 β e expressão de ciclooxygenase II. CSMCs tratadas com AngII apresentam maior atividade do receptor CD40, pois quando expostas ao CD40L, secretam maior quantidade de citocina IL-1 β , detectada por ELISA, e expressam maior quantidade de ciclooxygenase 2, detectada por western blotting. Dados são média $\pm$ EPM, de pelo menos quatro experimentos em cada grupo

Figura 13 - Ratos hipertensos dependentes de AngII apresentam maior expressão de CD40 na parede vascular. Ratos Wistar foram tornados hipertensos por clipagem da artéria renal (2R, 1C) e expressão de CD40 foi detectada em homogenatos de aortas por western blotting. Houve aumento na expressão de CD40 nos ratos hipertensos, comparados aos controles. Tratamento prévio dos ratos com antioxidantes (Vitamina E) diminuiu parcialmente a expressão aumentada de CD40 induzida pela AngII. Dados são média $\pm$ EPM, de pelo menos quatro experimentos em cada grupo

Figura 14 - Ratos hipertensos dependentes de AngII apresentam amior expressão de CD40 na parede vascular. O mesmo fenômeno mostrado na figura anterior. A detecção de CD40 na parede arterial foi detectada por imunohistoquímica, utilizando anticorpo anti-CD40. Figuras representativas de, pelo menos, cinco animais em cada grupo

2.2.7 A via de sinalização CD40/CD40L em modelos de aterosclerose experimental

2.2.7.1 Os camundongos deficientes em receptor de LDL e CD40L

Estudos prévios haviam mostrado que o bloqueio da via de sinalização CD40/CD40L, seja por meio de anticorpos, seja por manipulação genética, diminuía o tamanho da placa aterosclerótica e/ou a transformava em uma placa com fenótipo mais estável, em camundongos deficientes em receptor de LDL (Lutgens *et al.*, 1999; Lutgens *et al.*, 2000; Schonbeck *et al.*, 2000b). Esses camundongos, quando alimentados com dieta rica em gordura e colesterol desenvolvem hipercolesterolemia grave e placas de ateroma.

Os mecanismos pelos quais isso ocorria não ficaram claros. Assim, nos propusemos a gerar camundongos deficientes tanto em receptor LDL quanto em CD40L para responder a essa pergunta. Assim, cruzamos camundongos knockout para cada um desses genes e após mais de dois anos de trabalho intenso dos técnico de nosso Centro de Bioterismo e da bióloga Denise Frediani Barbeiro, de nosso laboratório, finalmente conseguimos os animais duplo knockout. Para nossa frustração, esses animais se reproduzem com muita dificuldade, inviabilizando seu uso intensivo em experimentos. Assim, fomos obrigados a abandonar o projeto inicial, mas ainda mantemos uma colônia desses animais, com dificuldade, no Centro de Bioterismo.

O aprendizado, porém, não foi em vão. A experiência adquirida com esses animais nos possibilitou a geração de outro animal duplo KO: deficiente em receptor de LDL e receptor toll-like 4, que discutiremos mais adiante.

2.2.8 A via de sinalização CD40/CD40L na aterosclerose experimental

A expressão de CD40L se encontra aumentada na parede vascular de vasos obtidos de pacientes ateroscleróticos (Mach *et al.*, 1997). O mesmo demonstramos ocorrer em camundongos deficientes para o receptor de LDL (LDLr $-/-$), tanto na fase inicial do processo aterosclerótico, como em lesões mais avançadas. A Profa. Dra. Marta Krieger, do Departamento de Fisiologia Cardiovascular da UNICAMP, descreveu que esses animais, após duas semanas de dieta rica em gordura e colesterol já apresentam acúmulo de lípidos na parede arterial. Em nosso laboratório, numa colaboração com a Profa. Marta, mostramos que esses animais já apresentam expressão de CD40L aumentada na parede vascular, quando comparados com animais selvagens, ou mesmo animais LDLr $-/-$ que receberam dieta normal, e portanto não apresentavam hipercolesterolemia (Figura 15).

Outro dado interessante de nosso laboratório foi obtido em colaboração com Dr^a. Elke Schultz e Prof^a. Dr^a. Rosa Maria Ribeiro do Vale, do Departamento de Farmacologia da UFSC. Nesse projeto, camundongos LDLr $-/-$ receberam dieta rica em colesterol e gordura e, ao mesmo tempo, foram tratados com fração acetato de etila obtida de vinhos tintos. Os animais que receberam doses baixas da fração enólica apresentaram formação de placas menores que os animais que receberam somente dieta. O mais interessante é que animais que receberam a fração do vinho em doses altas formaram placas ainda maiores que os animais controle. Concomitante à formação da placa, esses animais apresentavam uma maior expressão de CD40L na parede arterial, que era diminuída pelo tratamento

com fração do vinho em doses baixas, e mais aumentada em nos que receberam a fração enólica em dose alta. Esses dados sugerem que expressão de CD40L na parede vascular se correlaciona positivamente com a evolução da placa de ateroma.

Figura 15 - Expressão de CD40L na parede vascular de camundongos deficientes em receptor de LDL alimentados com dieta rica em gordura e colesterol. Micrografias em arco aórtico de camundongos LDLr^{-/-} e WT, mostrando a expressão de CD40L. Os cortes foram submetidos à imunohistoquímica para CD40L e contracoloração com Hematoxilina de Harris (HE). O painel A refere-se ao camundongo selvagem, o painel B ao camundongo deficiente em receptor de LDL alimentado com dieta padrão e o painel C ao camundongo deficiente em receptor de LDL que recebeu dieta rica em gordura e colesterol por 15 dias, e, portanto, apresentava hipercolesterolemia importante e formação de placas de ateroma na raiz da aorta

2.2.9 Os camundongos deficientes em receptores de LDL e toll-like 4

Um dado mais recente, e surpreendente, de nosso laboratório, veio dos camundongos deficientes para receptor de LDL e receptor toll-like 4 (LDLr $-/-$ e TLR4 $-/-$).

Os receptores toll-like são encontrados nas células do sistema imunológico e são receptores de reconhecimento de padrão envolvidos na imunidade inata. Eles reconhecem alguns poucos padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), altamente conservados, expostos na superfície de microorganismos como vírus, bactérias, fungos e parasitas. São exemplos de PAMPs: lipopolissacarídeo bacteriano (LPS), peptidoglicano, flagelina, ilhas CpG repetitivas no DNA e RNA de dupla fita (Kiechl *et al.*, 2003; Liew *et al.*, 2005).

Os receptores toll-like compreendem um total de dez proteínas em humanos. Todos eles possuem um domínio conservado na região citosólica (TIR), homólogo ao dos receptores de interleucina, que é responsável pelo desencadeamento de vias de sinalização comuns, como, por exemplo, aquelas que levam à ativação do fator de transcrição NF- κ B e quinases proteicas ativadas por estresse (Lien e Ingalls, 2002; Liew *et al.*, 2005).

Estudos populacionais demonstraram que a presença do polimorfismo Asp299Gly para o receptor toll-like 4 (TLR4) prediz um menor nível de citocinas inflamatórias circulantes e uma maior suscetibilidade a infecções, mas um risco reduzido de aterosclerose (Kiechl *et al.*, 2003). Tais dados sugerem que um mecanismo imune inato eficaz é necessário para o desenvolvimento de aterosclerose.

Em seguida, outros autores, através de imunohistoquímica e biologia molecular demonstraram que em lesões ateroscleróticas humanas há expressão aumentada de um repertório grande de TLRs e aumento na tradução de seus genes. Em particular, TLR1, TLR2 e TLR4 apresentavam níveis de RNAm maiores que três vezes os valores obtidos em locais das artérias não acometidos pelas placas de ateroma (Edfeldt *et al.*, 2002). Ensaios de imunohistoquímica demonstraram elevados graus de expressão das proteínas TLR1, TLR2 e TLR4 em placas ateroscleróticas, especialmente no endotélio e em áreas onde havia grande infiltração de células inflamatórias ou em placas com núcleo lipídico rico, mas não em placas fibrosas (Xu *et al.*, 2001).

Estudos mais recentes, utilizando camundongos geneticamente modificados, deficientes tanto em TLR4 quanto em ApoE, apresentaram uma redução significativa da placa aórtica em regiões propensas a aterosclerose mesmo quando submetidos a uma dieta hipercolesterolêmica. Também demonstram que camundongos deficientes em ApoE que não expressavam o TLR4 ou o adaptador molecular MyD88 (fator de diferenciação mielóide 88, necessário para a sinalização intracelular dos TLRs) desenvolveram menores placas de ateroma no arco aórtico, associada à diminuição de citocinas pró-inflamatórias como a IL-12 e a proteína quimioatrativa de monócito 1 (MCP-1). Esses camundongos também apresentaram diminuição do número de macrófagos da placa e do conteúdo lipídico (Michelsen *et al.*, 2004), porém não foi descrita qualquer alteração no perfil lipídico desses animais, isto é, eles a deficiência do receptor TLR4 não alterou a concentração plasmática de colesterol ou triglicérides.

Assim, quando geramos nossos camundongos duplamente deficientes, em receptor de LDL e TLR4, esperávamos encontrar uma redução no tamanho das placas de ateroma, quando esses animais fossem alimentados com uma dieta rica em colesterol e gordura. O que observamos foi que esses animais não apresentam diminuição importante do tamanho da placa aterosclerótica, embora tenha uma tendência a acumular menos gordura em seu interior. Outro dado interessante foi que a ausência do receptor TLR4 propicia a formação de uma placa com menos tecido fibroso em volta do centro gorduroso (Figura 16), sugerindo que a inflamação é importante para a formação de uma placa estável. Esses dados qualitativos foram obtidos nas placas do arco aórtico e ainda são preliminares. Os experimentos continuam, porém esses dados iniciais são bastante encorajadores.

Mais surpreendente foi o fato desses animais apresentarem alterações importantes nos níveis plasmáticos de colesterol e triglicérides, sugerindo participação dos TLR4 nos mecanismos de transporte de colesterol (Figura 17). O aluno Luiz Fonseca, em colaboração com Dra. Patricia Cazita do laboratório de Lípidos da Disciplina de Endocrinologia da FMUSP, está realizando experimentos para elucidar a participação dos TLR4 no transporte de colesterol.

Figura 16 - Estrutura da placa de ateroma em camundongos LDLr^{-/-} e LDLr^{-/-} TLR4^{-/-}. Animais LDLr^{-/-} alimentados com dieta rica em gordura e colesterol desenvolvem a formação de placas de ateroma na aorta, compostas por um centro lipídico, envolta por células musculares lisas e colágeno. No painel superior à esquerda, observamos essa estrutura típica, em coloração por hematoxilina-eosina. No painel inferior, por coloração de picrossirius, observamos a camada de colágeno envolvendo o centro gorduroso. Nos painéis à direita, observamos que a deleção concomitante do gene do TLR4 induz à formação de uma capa fibrosa menos espessa, com menor número de células musculares lisas e de colágeno

Figura 17 - Concentrações séricas de Colesterol e Triglicérides em camundongos deficientes em receptores para LDL e tol-like 4. Os camundongos deficientes em receptor para LDL (LDL $-/-$) apresentam níveis elevados de colesterol e triglicérides quando alimentados com dieta rica em gordura (15%) e colesterol (1,25%). Quando o gene para o receptor toll-like 4 também é deletado nesses animais (LDLr $-/-$ TLR4 $-/-$), surpreendentemente, ocorre uma diminuição do colesterol e triglicérides circulantes, sugerindo participação do TLR4 nos mecanismos de transporte e homeostase dos lípidos séricos

2.2.10 CD40/CD40L: Essencial para a evolução da aterosclerose

A doença aterosclerótica é compreendida hoje como um continuum, que se inicia como disfunção endotelial e progride através da formação da placa de ateroma, podendo ocasionar síndromes isquêmicas agudas, caso haja trombose sobre a superfície dessa placa.

A descrição da participação da via de sinalização CD40/CD40L nesse processo foi saudada com entusiasmo na década de 90 e início dos anos 2000 (Libby, 2001; Schonbeck e Libby, 2001b; Lutgens e Daemen, 2002), pois oferecia a possibilidade de uma alvo terapêutico para a prevenção da ruptura da placa aterosclerótica.

A realidade, entretanto, não comprou ingresso para esse espetáculo. O primeiro golpe sofrido por essa teoria foi o fato dos ensaios clínicos com bloqueadores de CD40L terem falhado espetacularmente. Em seguida, novos dados experimentais e clínicos, sugerindo que a relação entre essa via de sinalização e aterosclerose não é tão simples e direta como parecia a princípio trouxeram mais dúvidas sobre a viabilidade do seu uso clínico.

Nossos trabalhos na área mostram que devem existir sub-grupos de pacientes, como, por exemplo, aqueles com AngII alta, onde a participação desses mediadores deve ser realmente importante. Nossos dados também sugerem que abordagens farmacológicas múltiplas, como por exemplo, aquela onde foi utilizado um extrato enólico, com propriedades antioxidantes, antiinflamatórias, além de outros efeitos, podem trazer uma resposta mais eficaz que o bloqueio direto de uma via de sinalização específica.

Outro dado, que eu reputo como bastante importante, é que a inflamação pode ser necessária para que a placa de ateroma exiba um fenótipo mais estável. Os camundongos, gerados em nosso laboratório, deficientes em receptor LDL e TLR4, apresentam placas de ateroma com menos células musculares lisas e colágeno envolvendo o centro gorduroso da placa. Esse dado sugere que a resposta imune, deficiente nos animais que não expressam TLR4, exerce um papel importante na evolução da placa, sendo necessária para que a placa seja envolta por uma capa mais fibrosa. Esses dados ainda são bastante preliminares e ainda temos um longo caminho a percorrer para confirmá-los. Mesmo assim, optei por mostrá-los, devido à sua importância. Se forem confirmados, alguns conceitos sobre inflamação e estabilidade da placa de ateroma terão que ser revistos.

2.3 A Via de Sinalização CD40/CD40L nas Doenças Automunes

A hipótese dos dois sinais para a ativação das células T é um paradigma ainda aceito, que descreve os requerimentos precoces para ativação *versus* anergia de células T. Esse paradigma afirma que para eficiente indução de uma resposta imune é necessário:

- a) interação TCR / peptídeo / MHC → Sinal 1
- b) interação de moléculas co-estimuladoras (CD80/86 e CD28) → Sinal 2

Se somente um sinal é gerado, na ausência do segundo, então a consequência é tolerância, não imunidade. Prover sinal 1 e 2 é responsabilidade das APCs, mais especificamente, das células dendríticas, células que mais eficientemente estimulam células T por contato e ativam múltiplos receptores de membrana nessa células. Para alcançar essa proficiência, essas APCs precisam amadurecer, processo que pode ser induzido por diversos mediadores, como TNF- α , citocinas agonistas dos toll-like receptors (TLRs) e CD40L (Quezada *et al.*, 2004).

Assim, portanto, a decisão entre tolerância *versus* imunidade é centrada, ao menos em parte, no estado de maturação das APCs. Maturação apropriada permitirá que essas células desencadeiem imunidade celular produtiva. O modelo mais provável é que antígenos, capazes de se ligar às APCs através de receptores como ligantes dos TLRs (por exemplo, LPS) induzem a migração rápida de APCs (por exemplo, células dendríticas), para os gânglios linfáticos periféricos periarteriais. Uma vez aí localizada, a célula dendrítica terá uma vida muito curta, a menos que receba sinal via

ligação de CD40L, provido por uma célula T (De Smedt *et al.*, 1996). Assim, a ligação do CD40L estende a vida das DCs e permite que ocorra uma resposta imune eficaz.

Existem, entretanto, fortes evidências de que células dendríticas imaturas sustentem a tolerância na periferia. DCs são capazes de consumir auto-antígenos através de fagocitose de células apoptóticas e induzir anergia ou deleção de células T, contanto que não sejam induzidas à maturação pela ligação do CD40L (Steinman *et al.*, 2000; Bonifaz *et al.*, 2002; Fujii *et al.*, 2004).

Em resumo, podemos dizer que, pelo menos em parte, a decisão entre uma resposta imune eficaz ou tolerância a um determinado antígeno é dada pelo estado de maturação das células dendríticas, e que, a maturação, por sua vez, depende da ligação do CD40L.

Uma vez discutido resumidamente o papel do CD40/CD40L na tolerância fisiológica, podemos entender que é esperado que essa via de sinalização esteja alterada nas doenças auto-imunes, como por exemplo, a artrite reumatóide e o lúpus eritematoso sistêmico.

2.3.1 A via de sinalização CD40/CD40L na lupus eritematoso sistêmico

Lupus eritematoso sistêmico é uma doença auto-imune crônica que possui manifestações clínicas extremamente variáveis. Sorologicamente é caracterizado por uma variedade de auto-anticorpos contra os ácidos desoxiribonucleicos (DNAs), ácidos ribonucleicos (RNAs), antígenos nucleares e citoplasmáticos. A origem da doença é desconhecida, mas sabe-se que existem combinações de fatores ambientais, hormonais e genéticos (Anolik e Aringer, 2005; Goldblatt e Isenberg, 2005).

Existem casos simples que exigem intervenções médicas mínimas, e casos significativos com danos a órgãos vitais como pulmão, coração, rim e cérebro. A doença possui períodos de atividade intercalados por períodos de remissão que podem durar semanas, meses ou anos (Mosca *et al.*, 2001). Alguns pacientes nunca desenvolvem complicações severas. O tratamento é extremamente difícil devido a grande variabilidade de sintomas.

Nos últimos 20 anos a sobrevida da maioria dos pacientes diagnosticados com Lupus aumentou significativamente, provavelmente devido à melhora na eficácia de exames laboratoriais e à introdução de novas drogas, como as imunossupressoras e terapias a base de corticóides. Entretanto esses tratamentos possuem muitos efeitos colaterais indesejáveis, que afetam negativamente a qualidade de vida do paciente. Entre esses efeitos estão o desenvolvimento de diabetes mellitus, hipercolesterolemia, hipertensão, doenças renais e infecções repetidas por germes oportunistas (Mosca *et al.*, 2001; Anolik e Aringer, 2005; Goldblatt e Isenberg, 2005).

Linfócitos B são peças-chave no desenvolvimento dos autoanticorpos encontrados no lupus eritematoso sistêmico, e sua ativação no LES é dependente da ligação entre o receptor CD40 e seu ligante CD40L (CD40L). Esta ligação mostrou ser essencial na diferenciação entre as populações de células de memória e células efectoras. A partir dessas informações surgiu a idéia de bloquear a ligação CD40-CD40L o que diminuiria a diferenciação descontrolada de células B, levando à diminuição na produção de autoanticorpos (Grammer e Lipsky, 2003).

Baseado nas informações acima, fica claro porque os pacientes com LES foram os primeiros a receber um novo tratamento, bloqueando a via de sinalização CD40/CD40L através de anticorpos anti-CD40L. A princípio, parecia que a droga era segura e a melhora clínica dos pacientes com LES foi evidente (Davis *et al.*, 2001). Seguindo essa euforia inicial, sobreveio uma grande frustração. O ensaio clínico, e, portanto, o uso da nova droga, teve que ser suspenso devido a uma incidência inesperadamente alta da incidência de fenômenos aterotrombóticos, inclusive síndromes coronarianas agudas (Sidiropoulos e Boumpas 2004).

A busca de tratamentos alternativos para aliviar os pacientes diagnosticados com LES continua, ajam eles diretamente na fisiopatologia da doença ou minimizando os efeitos colaterais das drogas. A via de sinalização CD40/CD40L parece ser um candidato natural para essa busca. A abordagem direta, bloqueando essa via, parece insegura, portanto há necessidade de abordagens indiretas, tentando controlar sua atividade, sem um bloqueio agressivo.

2.3.2 Os receptores ativados por proliferadores de peroxissomos - PPARs

2.3.2.1 Estrutura e distribuição

PPARs, receptores ativados por proliferadores de peroxissoma, são fatores de transcrição pertencentes à uma superfamília de receptores nucleares. Estruturalmente, os PPARs são considerados membros da subfamília de receptores que incluem o receptor do hormônio da tireóide (TR), do ácido retinóico (RAR) e da vitamina D3 (VDR) (Daynese Jones, 2002).

Os PPARs foram originalmente identificados em 1990 por Issemann e Green e assim designados em virtude de serem receptores ativados por drogas que induzem a proliferação dos peroxissomas. Esta proliferação é uma resposta celular a uma variedade de compostos químicos e a certas condições fisiopatológicas que envolvem mudanças na morfologia celular e atividades enzimáticas peroxissomais (Duez *et al.*, 2001; Daynes e Jones, 2002).

Existem três isoformas de PPAR: α , β/δ e γ . O PPAR α é predominantemente expresso em hepatócitos, fibras musculares cardíacas, células renais do túbulo proximal, células endoteliais e eritrócitos (Duez *et al.*, 2001; Daynes e Jones, 2002). O PPAR β (também chamado de PPAR δ ou, em humanos, receptor de hormônio nuclear 1 - NUC1), apesar de menos estudado do que os PPAR α e γ , apresenta distribuição ampla nos tecidos (Duez *et al.*, 2001; Daynes e Jones, 2002). PPAR γ , por sua vez, está presente no tecido adiposo, sendo importante na adipogênese. Além disso, os PPARs são expressos em diversas células do sistema imune, como monócitos, macrófagos, células dendríticas e linfócitos (Duez *et al.*, 2001; Daynes e Jones, 2002).

Uma vez ativados, os PPARs modulam a expressão de diversos genes pela ligação com o elemento responsivo ao PPAR (PPRE) – (peroxissome proliferator response element). Para ligar-se ao PPRE com alta afinidade e para uma ativação efetiva da transcrição, o PPAR requer um outro fator proteico adicional, o receptor do ácido 9-*cis* retinóico (RXR). A exposição simultânea de ambos os ativadores revela que existe um efeito sinérgico na indução da expressão de genes alvo por esses fatores de transcrição (Duez *et al.*, 2001; Daynes e Jones, 2002). Além disso, a dimerização é essencial para a atividade dos PPARs, como também para a maior parte dos outros membros da superfamília dos receptores nucleares. Os PPARs heterodimerizam-se com os RXR, formando um complexo capaz de se ligar ao PPRE (Duez *et al.*, 2001; Daynes e Jones, 2002).

2.3.2.2 Funções dos PPARs

Nos tecidos onde é expresso (fígado, coração, rins) o PPAR α é responsável pelo controle de inúmeros genes importantes no metabolismo lipídico, como por exemplo: acil-CoA-sintetase, HMG-CoA-sintetase, apo-AI e apo-CIII1 (Marx *et al.*, 2001). Devido a esses achados, PPAR α foi primeiramente relacionado ao metabolismo de ácidos graxos. São ativadores endógenos de PPAR α alguns eicosanóides, ácidos graxos poliinsaturados como o ácido docosahexanóico (DHA) ou o ácido eicosapentaenóico (EPA). Além disso, o PPAR α também é ativado por alguns fibratos, como gemfibrozil ou fenofibrato, usados clinicamente como drogas redutoras de lipídios.

O PPAR γ é responsável pela modulação do metabolismo lipídico e adipogênese, regulando a expressão de genes essenciais como: lipase lipoproteica, proteína ligante de ácidos graxos e acil-CoA-sintetase. Ativadores de PPAR γ são derivados de prostaglandina D₂, 15-desoxi- Δ ^{12,14} prostaglandina J₂ (15dPGJ₂) assim como o ácido linoléico oxidado (9(s)- e 13(s)-Hode), um componente da LDL oxidada. Existe também um ligante sintético, as thiazolidinedionas (TZD), uma classe de drogas que inclui a pioglitazona e rosiglitazona, de largo uso no tratamento do diabetes. Estas drogas aumentam a sensibilidade de órgãos peritoniais à insulina diminuindo a glicemia e muitas vezes aumentando o HDL (Marx *et al.*, 2001).

As funções desempenhadas pelo PPAR β/δ são menos estudadas, porém esta isoforma parece ser importante no controle do metabolismo e transporte de lipoproteínas, em especial em macrófagos (Oliver *et al.*, 2001).

2.3.2.3 Papel antiinflamatório dos PPARs

Recentemente foi observada a importância dos PPARs no controle de diferentes tipos de resposta inflamatória, seja induzindo a expressão de diversas proteínas com ação anti-inflamatória ou inibindo a atividade de fatores de transcrição como NF κ B, STATs, AP-1 e NF-AT (Daynes e Jones, 2002). Ao inibir estes fatores, há a repressão da expressão de várias moléculas estimulantes da resposta inflamatória: citocinas, moléculas de adesão, assim como enzimas efetoras da resposta inflamatória, como iNOS. Existem dados sugerindo que o PPAR α pode controlar a duração e intensidade da resposta

inflamatória induzindo a expressão de proteínas envolvidas no catabolismo de mediadores lipídicos pró-inflamatórios, como: $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$, ILs, LTB₄, LPS, TNF, TNFR, VCAM1 (Daynes e Jones, 2002).

Além disso, o PPAR β/δ pode ter um efeito pró ou antiinflamatório. Na ausência do ligante, o PPAR β/δ seqüestra um repressor (BCL-6), que impede que este fator de transcrição exerça sua função antiinflamatória, levando à inflamação. Na presença do ligante, o PPAR β/δ libera o repressor, gerando efeitos antiinflamatórios (Lee *et al.*, 2003).

Recentemente foi descrito um mecanismo bastante engenhoso pelo qual os PPARs poderiam bloquear a ligação de fatores de transcrição pró-inflamatórios e, portanto, exercer uma atividade anti-inflamatória (Figura 18) (Pascual *et al.*, 2005).

Embora os dados citados acima sugiram um papel importante dos PPARs no controle da inflamação, seu papel nas doenças inflamatórias crônicas ou agudas ainda não foi completamente esclarecido, porém é motivo de crescente interesse por parte dos pesquisadores da área.

Figura 18 - Modelo de transrepressão da expressão de iNOS induzida por PPAR γ . (A) A estimulação com LPS promove a degradação, dependente de ubiquitina, de complexos correpresores e sua troca por complexos coativadores, resultando na expressão de iNOS. (B) A estimulação com LPS na presença do ligante de PPAR γ , resulta em sumoilação do PPAR γ na posição K365. O PPAR γ sumoilaado, então, reage com domínios presentes nos complexos correpresores, prevenindo que sejam liberados e degradados, mantendo, portanto o promotor em estado reprimido. Adaptado de Pascual *et al.*, 2005; Zelcer e Tontonoz *et al.*, 2005.

2.3.3 Interações entre as vias de sinalização PPAR e CD40/CD40L

Inflamação é um conjunto complexo de interações entre fatores solúveis e células, que pode aparecer em qualquer tecido, em resposta a lesões traumáticas, infecciosas, pós-isquêmicas tóxicas ou auto-imunes. O processo normalmente leva à recuperação e cicatrização. Entretanto, se a destruição e o reparo não forem adequados, a inflamação pode levar à lesão tecidual persistente pelos leucócitos, linfócitos ou colágeno (Nathan, 2002). Assim, é necessário que haja um equilíbrio entre as forças de amplificação e de contenção da resposta inflamatória, de maneira que o processo não saia de controle.

Como descrito acima, a via de sinalização CD40/CD40L é um importante efetor da resposta inflamatória, graças à sua capacidade de ativação da resposta imune adaptativa, seja estimulando a proliferação de linfócitos e produção de anticorpos, seja através da geração aumentada de citocinas pelas células apresentadoras de antígenos. Também mostramos acima que os receptores da família dos PPARs exercem uma atividade anti-inflamatória.

As interações entre essas duas vias de sinalização, entretanto, ainda não foram adequadamente estudadas. A maioria das publicações a respeito se baseia no efeito obtido pelos compostos capazes de ativar os PPARs.

Assim, foi descrito que plaquetas derivadas de megacariócitos estimulados com um ligante de PPAR γ bloqueiam a expressão de CD40L diminuindo assim sua capacidade de ativação do endotélio (Akbiyik *et al.*, 2004). Além disso, foi demonstrado recentemente que pacientes diabéticos tratados com thiazolidinedione (ligante de PPAR γ) possuem uma diminuição no CD40L circulante (Varo *et al.* 2003b).

Descobriu-se também que a estatina (bloqueador de HMGCoA redutase, que também apresenta algumas propriedades antiinflamatórias), reduz a expressão de CD40 ativando a via do PPAR α . A estatina não é um ligante específico do PPAR α , mas tudo indica que ela utiliza a mesma via de sinalização deste (Martin *et al.*, 2001; Mulhaupt *et al.*, 2003).

Em células dendríticas murinas, ocorre expressão constitucional de PPAR γ (mas não do PPAR α) e sua ativação com rosiglitazona, embora não impeça sua maturação ou sua capacidade de ativar linfócitos T, é capaz de inibir a expressão de IL-12 induzida pela ligação do CD40, o que poderia induzir a uma maior resposta Th-1 (Faveeuw *et al.*, 2000).

Em resumo, os dados experimentais existentes até o presente, sugerem que essas duas vias de sinalização possam exercer papéis antagônicos na resposta inflamatória. Entretanto, experimentos definitivos que comprovem essa hipótese ainda não estão disponíveis. Assim, nos propusemos a determinar interações entre essas vias, tanto em modelos in vitro, como em pacientes onde essa via de sinalização tem atividade aumentada, como o LES.

2.3.4 Estudos visando determinar interações entre CD40/CD40L e PPARs

Para podermos determinar as interações entre essas duas vias de sinalização, optamos, inicialmente, por experimentos *in vitro*, utilizando culturas de células.

Inicialmente utilizamos células da linhagem monocítica humana THP-1. Essas células têm uma característica importante para o nosso estudo: quando tratadas com acetato de forbol miristato (PMA) elas se diferenciam em macrófagos, expressando grande quantidade de CD40.

Assim, os macrófagos derivados das células THP-1 foram mantidos em cultura e estimulados com CD40L recombinante. Observamos que a ativação dessa via de sinalização ocasiona modificações na transcrição de RNAm para todas as isoformas dos PPARs. Ocorre aumento na transcrição do RNAm PPARs α e γ , enquanto ocorre diminuição do RNAm para PPAR β/δ . Essas alterações ocorrem em tempos diferentes após o estímulo com rhCD40L, sugerindo que esses fatores de transcrição podem ter papéis diferentes no controle da sinalização pelo CD40 (Figura 19).

O interessante é que essas alterações que ocorrem *in vitro* espelham o que acontece nos monócitos circulantes de pacientes lúpicos. Esses pacientes apresentam CD40L solúvel em concentrações elevadas e seus monócitos circulantes expressam transcritos dos PPARs de maneira semelhante aos macrófagos expostos ao CD40L, quando comparados a monócitos de pacientes saudáveis (Figura 20).

Figure 19 - Expressão de PPARs após estimulação de macrófagos com rhCD40L. Macrófagos derivados da linhagem de células monocíticas humanas THP-1 foram expostas a CD40L recombinante e a expressão de RNAm para os PPARs foi determinada por PCR quantitativo (Real Time PCR). Observamos que ocorre um aumento da expressão dos PPARs α e γ , enquanto PPAR β/δ diminui. Esses dados sugerem que estimulação da via CD40/CD40L aumentam a expressão de fatores que podem bloquear a ação de fatores de transcrição pró-inflamatórios. Dados são média $\pm$ EPM, de pelo menos cinco experimentos em cada grupo

Figura 20 - Expressão de RNAm para PPARs em monócitos de pacientes lúpicos. Monócitos circulantes foram obtidos de pacientes com LES ou controles saudáveis e a expressão de RNAm para os PPARs foi determinada por PCR quantitativo (Real Time PCR). Observamos um aumento da expressão do PPAR α , enquanto PPAR γ não se altera. Já O PPAR β/δ apresenta uma tendência a diminuir, que não é significativa pelo ainda pequeno número de pacientes estudados (n= 5 em cada grupo)

2.3.5 Ativadores de PPARs: coadjuvantes na terapia de doenças autoimunes?

Embora preliminares, nossos dados nessa área são bastante promissores. Essa linha de pesquisa se encontra sob responsabilidade da aluna Daniella Oxer Teixeira. No momento, a aluna realiza ensaios para determinar se PPARs interferem especificamente na transcrição gênica induzida pela ativação do CD40.

Macrófagos são transfectados com RNA de interferência (iRNA) para os diferentes PPARs e essas células são estimuladas com CD40L recombinante. Através da análise da expressão de determinados genes induzidos por CD40L, na presença ou ausência de PPARs, poderemos obter informações importantes sobre a interação entre essas duas vias de sinalização.

Nosso entusiasmo com essa linha de pesquisa se deve a dois fatores. Primeiro pela possibilidade de utilizar pacientes para testar nossas hipóteses, graças à colaboração da Prof^a. Dr^a. Eloísa Bonfá e Dr. Eduardo Borba, da Disciplina de Reumatologia da FMUSP. Sou um advogado de que devemos, sempre que possível, transportar nossos conhecimentos básicos para modelos humanos, e a Professora Eloísa Bonfá está nos dando essa oportunidade.

Outro fator importante é o fato de ativadores de PPARs estarem em uso clínico, com outras indicações há muitos anos. Sua segurança para uso crônico está comprovada pela utilização como agentes redutores do colesterol (fibratos) ou hipoglicemiantes (tiazolidinonas). Se demonstrarmos que os PPARs podem exercer algum grau de modulação negativa da via de

sinalização CD40/CD40L, abriremos caminho para o uso dessas drogas como coadjuvantes no tratamento de doenças autoimunes, como o LES.

Obviamente, estamos apenas começando nosso caminho e ainda há necessidade de muitos experimentos. Muito trabalho nos aguarda, mas a hipótese, apesar de ser especulativa, por enquanto, é bastante atraente.

2.4 Seps e a Via de Sinalização CD40-CD40L

2.4.1 Seps grave e choque séptico

As formas graves das doenças infecciosas, a seps grave e o choque séptico têm mostrado importância epidemiológica e econômica crescentes. Apresentam incidência progressivamente maior, e elevada mortalidade (entre 20 e 50%), sendo a segunda causa mais freqüente de morte em Unidades de Terapia Intensivas (UTI) não coronarianas e a décima causa mais comum de morte nos EUA (Annane *et al.*, 2003; Martin *et al.*, 2003), relevância que se repete também em nosso país (Silva *et al.*, 2004).

Apesar do grande avanço na compreensão dos mecanismos envolvidos na seps, o impacto na mortalidade é quando muito, discreto. Esses fatos têm estimulado o desenvolvimento de uma série de ações que vão da uniformização dos conceitos clínicos, estratificação de gravidade e risco, medidas de diagnóstico, suporte e tratamento, além dos estudos que visam o melhor entendimento das bases moleculares desse fenômeno.

As tentativas de uniformização dos conceitos ainda engatinham, devido à falta de conhecimentos sobre as bases fisiopatológicas da doença.

A classificação mostrada abaixo é mundialmente utilizada, baseada em variáveis clínicas e, por isso, muito amplas:

- SIRS (Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica): presença de pelo menos dois dos seguintes critérios: temperatura acima de 38°C ou abaixo de 36°C, taquicardia (frequência cardíaca > 90 batimentos por minuto), taquipnéia caracterizada por aumento da frequência respiratória (> 20 movimentos respiratórios por minuto) ou hiperventilação ($\text{PaCO}_2 < 32 \text{ mmHg}$) e alteração na contagem de leucócitos, > 12.000/mm³, ou < 4000/mm³, ou ainda, presença de > 10% de formas jovens.
- Sepses: presença de SIRS secundária a uma infecção.
- Sepses Graves: sepses associadas a disfunção orgânica (respiratória, que pode ser definida pela relação entre a PaO_2 e a fração de oxigênio no ar inspirado, hematológica, definida pela contagem de plaquetas, cardiovascular, definida pela pressão arterial, neurológica, definida pela escala de Glasgow, hepática, definida pelos níveis de bilirrubina e renal, definida pelos níveis de creatinina ou pelo débito urinário). Essa avaliação de disfunção é a mesma utilizada pelo índice de disfunção orgânica conhecido como SOFA (Sequential Organ Failure Assessment).
- Choque Séptico: presença de sepsis grave associada à necessidade de utilização de vasopressores para a manutenção da pressão arterial.

Fica claro, pela análise da classificação acima, que as subdivisões são muito amplas, permitindo que pacientes muito díspares sejam colocados sob um mesmo grupo, mesmo que os mecanismos que o levaram ao quadro séptico sejam completamente diferentes. Uma melhor classificação só será possível com o entendimento das bases moleculares da doença, principalmente através de técnicas no campo da Biologia Molecular e Proteômica, além da Microbiologia e Imunologia.

Acredito que a chave para se entender melhor a sepse esteja numa melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na resposta imunológica inicial e tardia que ocorre após a exposição a agentes infecciosos ou seus produtos. No entanto, como também em outras áreas, esse conhecimento até o momento tem sido acompanhado de quase tantas expectativas quanto de frustrações. A cada descrição de uma via de resposta surge a expectativa de uma possível janela terapêutica ou de utilização de um intermediário dessa via como marcador de diagnóstico, gravidade, de evolução clínica ou como alvo para tratamento. Em ambas as situações (marcador ou tratamento) os resultados até o momento têm sido decepcionantes.

Lipopolissacaride (LPS) (Bone *et al.*, 1995), fator de necrose tumoral (TNF) (Abraham *et al.*, 1998), receptores solúveis de TNF (Fisher *et al.*, 1996), receptores de interleucina 1 (IL-1) (Fisher *et al.*, 1994), o fator de ativação plaquetária (PAF) (Dhainaut *et al.*, 1994) todos, descritos como desencadeantes ou como intermediários de resposta inflamatória, foram alvo de tentativas terapêuticas com resultados pouco animadores.

Outra complicação no desenvolvimento de terapêuticas eficazes na sepse é a dificuldade de se transpor resultados obtidos em modelos animais para humanos. Os motivos dessa dificuldade são múltiplos. Um dos principais é o fator tempo. Nos modelos experimentais podemos determinar exatamente quando iremos iniciar nossa agressão, seja ela injeção de LPS, de bactérias ou ligadura e punção cecal. A partir daí, temos um padrão de evolução através do tempo, que segue alguns parâmetros conhecidos. Quando recebemos o paciente, na UTI ou pronto socorro, nunca podemos afirmar há quanto tempo o paciente está em sepse, quando foi iniciada a resposta inflamatória, ou quando suas células dendríticas apresentaram o antígeno para os linfócitos T pela primeira vez. A história clínica nos ajuda (ou atrapalha), quando nos diz há quanto tempo o paciente tem febre ou a pressão caiu, mas, como dito acima, são critérios amplos e inespecíficos que muitas vezes são inúteis na determinação do tempo de evolução da sepse.

Existem também diferenças básicas na resposta imune dos hospedeiros. Camundongos e ratos apresentam algumas respostas diferentes dos humanos, o que se torna um fator complicador a mais na tradução dos dados em modelos animais para estudos humanos.

Em resumo, podemos dizer que, atualmente, a resposta imune do hospedeiro na sepse é vista como um amplo painel de vias de sinalização ativadas, a maior parte delas ainda não completamente conhecidas.

Nosso objetivo ao trabalhar nessa área foi tentar traduzir alguns conhecimentos básicos, obtidos inclusive em nosso laboratório pelo Prof. Dr.

Francisco Soriano, para a prática clínica, aproveitando os pacientes internados nas Unidades de Terapia Intensiva do Hospital das Clínicas da FMUSP. As UTIs de nosso Hospital, em especial aquelas da Disciplina de Emergências Clínicas, são um campo extremamente fértil para pesquisa clínica ou traducional. O número de pacientes internados e a variedade das doenças são muito grandes, o que possibilita que estudos com número significativo de indivíduos sejam feitos com rapidez. Em colaboração com Dr. Luiz Monteiro da Cruz Neto, realizamos experimentos tentando determinar alguns fatores envolvidos na resposta imune e cuja expressão possa estar envolvida na resposta do hospedeiro a um quadro séptico.

2.4.2 A via de sinalização CD40/CD40L na sepse

O papel da via de sinalização CD40-CD40L na sepse é pouco conhecido. Algumas evidências, experimentais e clínicas, apontam para uma ação importante do CD40-CD40L nessa síndrome.

2.4.2.1 CD40-CD40L na sepse: estudos *in vitro*

Estudos realizados com células em cultura mostram que diversos mediadores reconhecidamente atuantes na sepse alteram a expressão da via de sinalização CD40-CD40L ou sofrem sua influência.

A expressão de CD40 em células do sistema imune ou da parede vascular pode ser aumentada pela exposição a citocinas, forbol-éster ou LPS (Mach *et al.*, 1997; Qin *et al.*, 2005). Enquanto isso, linfócitos expostos

a PMA ou células endoteliais expostas a citocinas também podem ter sua expressão de CD40L aumentada (Johnson-Leger *et al.*, 1998).

Por outro lado, a ativação do CD40 em macrófagos, células dendríticas ou células da parede vascular pode levar à produção de uma série de substâncias sabidamente envolvidas na resposta imune da sepse. A produção de citocinas (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12), a expressão de ciclooxigenase-2 e conseqüente liberação de prostaglandinas e a expressão de iNOS são mecanismos presentes na sepse que sofrem a influência direta da interação CD40-CD40L (van Kooten e Banchereau, 2000).

2.4.2.2 CD40-CD40L na sepse: modelos experimentais

A contribuição da via de sinalização CD40-CD40L para a resposta imune na sepse foi estudada em diversos modelos experimentais, principalmente com o uso de animais geneticamente modificados.

Foi observado que camundongos deficientes para CD40 (CD40 KO), comparados a animais selvagens, demoravam mais para morrer e tinham melhora na sobrevivência, quando submetidos a uma sepse polimicrobiana induzida por punção e ligadura cecal (CLP) (Gold *et al.*, 2003). Esses animais apresentavam menor inflamação pulmonar e reduzidos níveis séricos de IL-6 e IL-10. O interessante é que animais knockout para o CD40L, cuja via de sinalização também não é funcionante, apresentam curvas de mortalidade e perfil inflamatório semelhante aos animais selvagens, sugerindo haver uma ativação de CD40 independente de sua ligação ao CD40L, durante a sepse (Nolan *et al.*, 2004).

Esse achado conflitante foi estudado por diversos autores. Um achado interessante publicado recentemente sugere que células dendríticas de camundongos expressam fortemente CD40, 8 horas após serem submetidos à CLP. Paradoxalmente, DCs esplênicas dos camundongos sépticos são incapazes de secretar IL-12 em resposta a LPS e CD40L. Durante a sepse, as DCs esplênicas adquirem um comportamento aberrante de resposta a estímulos bacterianos, o que poderia contribuir para a resposta deficiente do hospedeiro durante a sepse (Flohe *et al.*, 2006).

2.4.2.3 CD40-CD40L na sepse: estudos clínicos

Os estudos sobre a expressão e atividade da via de sinalização CD40-CD40L em humanos em sepse são em pequeno número e bastante limitados. Um desses poucos estudos descreveu uma correlação direta entre o nível de expressão de CD40 na superfície de monócitos e a sobrevivência de pacientes em sepse severa, sugerindo que expressão de CD40 pode ser um fenômeno protetor (Sugimoto *et al.*, 2003). Esse dado, porém foi obtido em número pequeno de pacientes e carece comprovação.

2.4.3 Marcadores de prognóstico no paciente em sepse

Como discutido acima, é necessário agregar mais informações sobre a resposta imune na sepse, principalmente em humanos. Tendo essas dúvidas em mente, partimos para um pequeno estudo, utilizando pacientes em sepse grave atendidos em nosso Hospital.

Nossa idéia inicial era determinar se alguns dos mediadores envolvidos na resposta imune do hospedeiro, durante o quadro de sepse grave, poderiam servir como marcadores do prognóstico ou evolução do paciente em sepse.

Assim, pacientes admitidos na UTI devido aos diagnósticos de sepse grave ou choque séptico foram selecionados para o estudo. Foram avaliadas diariamente as variáveis clínicas e coletadas amostras de sangue desses pacientes no momento do diagnóstico de sepse grave e num segundo momento, quando esses pacientes haviam se recuperado. Foram dosadas citocinas plasmáticas e a expressão de moléculas envolvidas na resposta imune em leucócitos, como receptores de glucocorticóides, receptores toll-like, e dos componentes da via de sinalização CD40/CD40L.

Observamos que os pacientes estudados apresentavam uma maior expressão de RNAm para CD40 e CD40L, em leucócitos, durante o quadro séptico, quando comparados a indivíduos saudáveis. O interessante é que a expressão de CD40 e CD40L nesses pacientes foi maior ainda no momento em que eles se recuperaram (Figura 21 e 22).

Esses dados ainda são preliminares, obtidos em um pequeno número de pacientes, porém confirmam dados anteriores da literatura. Infelizmente não temos dosagens nos pacientes que morreram, portanto não podemos afirmar que níveis elevados de expressão de CD40 e CD40L sejam fatores de bom prognóstico em pacientes sépticos. Entretanto, esses dados referentes ao CD40/CD40L e outros, mostrando um perfil parecido dos receptores toll-like 2 e 4, sugere que os pacientes que sobrevivem ao quadro séptico são aqueles

capazes de manter uma resposta imune adequada, idéia lançada há poucos anos (Hotchkiss e Karl., 2003). Essa idéia é contrária ao paradigma de alguns anos atrás, que sugeria que a sepse era uma resposta imune descontrolada e, portanto, o tratamento deveria ser baseado em estratégias antiinflamatórias.

No momento está em andamento a seqüência desse trabalho, sob supervisão do Dr. Luiz Monteiro, onde pretendemos aumentar o número de pacientes estudados, além de acompanhar os pacientes durante toda sua estada na UTI, estejam infectados ou não. Somente a ampliação dos nossos conhecimentos sobre a resposta imune na sepse poderá trazer respostas clinicamente úteis.

Figura 21 - Expressão de RNAm para CD40 em pacientes sépticos. Pacientes com diagnóstico de sepse grave ou choque séptico (n=14) tiveram seu sangue colhido no momento do diagnóstico e após a recuperação do quadro. O RNAm total foi isolado e a expressão de CD40 foi detectado por RT-PCR. Observamos que pacientes em sepse grave apresentam aumento na transcriao de RNAm para CD40, quando comparados com indivíduos saudáveis (n=10). É interessante notar que esses mesmos pacientes, quando recuperados, apresentavam aumento ainda maior da expressão de RNAm para CD40, sugerindo que resposta imune adequada foi necessária para a recuperação desses pacientes

Figura 22 - Expressão de RNAm para CD40L em pacientes sépticos. Pacientes com diagnóstico de sepse grave ou choque séptico (n=14) tiveram seu sangue colhido no momento do diagnóstico e após a recuperação do quadro. O RNAm total foi isolado e a expressão de CD40L foi detectado por RT-PCR. Observamos que pacientes em sepse grave apresentam aumento na transcrição de RNAm para CD40, quando comparados com indivíduos saudáveis (n=10). É interessante notar que esses mesmos pacientes, quando recuperados, apresentavam aumento ainda maior da expressão de RNAm para CD40, sugerindo que resposta imune adequada foi necessária para a recuperação desses pacientes.

2.4.4 Sinalização por S-Nitrosilação na sepse

Na verdade, o panorama da resposta imune na sepse parece ser mais complicado do que se imagina e somente a expressão ou repressão de algumas proteínas talvez não possa explicar toda a gama de alterações observadas.

Isso fica claro com os dados que obtivemos mostrando que o receptor CD40 em macrófagos e monócitos sofre modificações pós-translacionais durante a ativação dessas células. Em estudo ainda não publicado, demonstramos que resíduos de cisteína no CD40 se encontram nitrosilados em repouso e que essa nitrosilação desaparece quando essas células são ativadas. Mostraremos esses dados a seguir.

Esse trabalho foi resultado do pós-doutoramento do Dr. Luiz Cláudio Godoy, Doutor em Imunologia pela UNIFESP, com quem tive a honra e o prazer de trabalhar. Hoje Dr. Godoy é Post-Doc Fellow na University of Massachussets, onde trabalha com Dra. Joan Mannick.

2.4.4.1 Óxido nítrico e tióis em sistemas biológicos

O óxido nítrico (NO) é um radical livre gasoso, mais conhecido pelas suas propriedades como molécula de sinalização. É gerado a partir da oxidação de L-arginina pelas NO sintases e regula uma série de respostas fisiológicas celulares, como consumo de oxigênio e apoptose, e em diversos sistemas, incluindo neurotransmissão, vasodilatação, imunidade (Stamler *et al.*, 2001; Stamler e Lamas, 2001).

Inicialmente, os efeitos do NO foram descritos como sendo dependentes de sua interação com o centro metálico da guanilato ciclase,

ativando-a e, assim, aumentando a concentração intracelular de GMPc (Murad, 1999). Posteriormente, entretanto, demonstrou-se que seus alvos celulares eram muito mais amplos. Atualmente, baseado em evidências experimentais consistentes, acredita-se que o NO regula diferentes processos biológicos causando modificações pós-translacionais em proteínas através da ligação com seus aminoácidos constituintes (Lane *et al.*, 2001).

A formação de nitrosotióis proteicos, produtos da interação entre óxido nítrico (NO), ou espécies dele derivadas, e grupos tiol (-SH) proteicos, representa um mecanismo importante de modificações pós-traducional de proteínas envolvidas na transdução de sinal (Mannick e Schonhoff *et al.*, 2002). O NO é produzido por quase todos os tipos celulares e interage com diversas vias de sinalização. Sua ação sobre tióis proteicos, ao lado de sua capacidade de reagir com centros metálicos, propicia uma moldura adequada para explicar seus múltiplos efeitos (Gow *et al.*, 2004).

O NO pode oxidar, nitrar ou nitrosilar proteínas. Nitração refere-se à ligação de nitrito (NO₂) a um resíduo de tirosina ou, menos frequentemente, triptofano. Nitrosilação, por outro lado, consiste na ligação de NO a um metal de transição ou grupo tiol, geralmente num resíduo de cisteína (S-nitrosilação) (Gow *et al.*, 2004). A nitração é um processo irreversível que pode ser responsável por efeitos nocivos do NO, diferentemente da nitrosilação, que é uma alteração reversível envolvida na sinalização celular. Reações de nitrosilação de grupos tiol ou metais de transição pode levar tanto à ativação quanto à desativação de proteínas (Stamler *et al.*, 2001, Stamler e Lamas, 2001).

Enquanto modificações pós-traducionais mais clássicas, como a fosforilação e a acetilação, dependem de enzimas, a nitrosilação é, ao menos em parte, um processo não-enzimático (Mannick e Schonhoff, 2002). O fator que parece mediar a nitrosilação é, na verdade, o ambiente redox intracelular. Além disso, da mesma maneira que a fosforilação é revertida por defosforilação, a nitrosilação o é por denitrosilação. Mais uma vez, porém, distintamente da defosforilação, a denitrosilação ocorre de modo não-enzimático, em função da sensibilidade das ligações S-NO e metal-NO ao equilíbrio redox. Uma variedade de fatores, incluindo metais de transição, agentes redutores, mudanças de pH e pO_2 e luz UV pode levar à perda das ligações S-NO e/ou metal-NO. Assim, a denitrosilação pode simplesmente ocorrer devido a alterações no ambiente redox (Mannick e Schonhoff, 2002).

A bioquímica envolvida na formação de nitrosotióis em ambiente fisiológico ainda não está completamente esclarecida. S-nitrosotióis (S-NO) podem ser formados pela interação com (Figura 23) (adaptado de Gow *et al.*, 2004):

- a) oxidantes (como oxigênio molecular e superóxido), via formação intermediária de óxidos de nitrogênio (como dióxido de nitrogênio, trióxido de dinitrogênio e peroxinitrito)
- b) tióis reduzidos, via formação de um radical intermediário RSNOH
- c) centros metálicos (como cobre ou ferro) tanto operando como catalisadores ou através da geração do cátion nitrosônio

Todas essas reações podem ocorrer *in vivo*, mas somente algumas delas são eficientes no transporte de informações através da célula. Para

funcionar como um sistema de transdução de sinal, as reações envolvidas têm que apresentar:

- a) reversibilidade: caso contrário haverá necessidade de geração constante de novas proteínas para transportarem o sinal, o que seria demorado e demandaria um alto custo energético
- b) especificidade: alvos específicos devem ser os transportadores do sinal, para evitar que haja perda ou distorções indesejáveis no tráfego de informações.

Como veremos a seguir, reações de nitrosilação de grupamentos sulfidril em resíduos de cisteína proteicos preenchem esses critérios e por isso, podem ser vistos com um sistema integral de transdução de sinal.

Figura 23 - Reações entre NO e tióis em sistemas biológicos. A bioquímica envolvida na formação de nitrosotióis em ambiente fisiológico ainda não está completamente esclarecida. S-nitrosotióis (S-NO) podem ser formados pela interação com: a) oxidantes (como oxigênio molecular e superóxido), via formação intermediária de óxidos de nitrogênio (como dióxido de nitrogênio, trióxido de dinitrogênio e peroxinitrito), b) tióis reduzidos, via formação de um radical intermediário RSNOH e c) centros metálicos (como cobre ou ferro) tanto operando como catalisadores ou através da geração do cátion nitrosônio

2.4.4.2 Nitrosilação de cisteína como mecanismo de transdução de sinal

A comparação da sinalização por S-nitrosilação de resíduos de cisteína com a fosforilação proteica é pertinente, porém algumas diferenças entre esses dois mecanismos de modificação pós-translacional de proteínas são importantes e necessitam esclarecimento. A fosforilação proteica é realizada por enzimas, as quinases, e a reversão dessa reação também é enzimática (realizada pelas fosfatases). Esse mecanismo possibilita um controle rígido das reações, de tal modo que as formas fosforiladas ou não das proteínas podem ser rigorosamente mantidas dentro de limites estritos de concentração (Hess *et al.*, 2005).

A S-nitrosilação dos resíduos de cisteína ocorre por um mecanismo não enzimático. Para que seja considerada como um candidato viável a agir como transdução de sinal, deve possuir reversibilidade e especificidade, características essenciais para essa tarefa (Mannick e Schonhoff, 2002).

A grande maioria das proteínas contém resíduos de cisteína, porém, nem todos eles parecem ser passíveis de sofrerem S-nitrosilação. Esse fato é exemplificado pelo canal de cálcio sensível a rianodina, presente em células musculares. Essa proteína possui 50 tióis livres em sua estrutura e somente um desses grupamentos sofre S-nitrosilação (Eu *et al.*, 2000; Sun *et al.*, 2001), um achado experimental espantoso para um mecanismo não enzimático. Posteriormente, outros experimentos confirmaram esses achados e foram descritos mecanismos que emprestam especificidade à S-nitrosilação.

O tipo de espécie derivada do NO gerada é o primeiro desses mecanismos. A reação do NO com o oxigênio gera diferentes óxidos,

dependendo da concentração dos reagentes e do local onde ocorra. Diferentes óxidos de nitrogênio possuem afinidades diferentes por metais de transição, tióis ou outros alvos, podendo, portanto, ligar-se a proteínas diferentes e causar respostas celulares diferentes (Stamler *et al.*, 1997).

O confinamento da geração de NO e seus alvos num mesmo compartimento subcelular é um outro mecanismo que confere especificidade à reação de S-nitrosilação. O melhor exemplo desse processo é o controle do receptor de glutamato da classe NMDA (N-metil-D-aspartato) (Stamler *et al.*, 2001; Mannick e Schonhoff, 2002). Esse receptor está ligado a proteínas acopladoras (CAPON e PSD95) que aproximam a NO sintase neuronal e as proteínas que terão resíduos de cisteína S-nitrosilados (Jaffrey *et al.*, 1998). A entrada de cálcio pelo receptor ativa a NO sintase, o NO gerado se liga à guanilato cíclica (ativando-a), à Ras-GTP (ativando-a) e ao próprio receptor (desativando-o) (Lipton *et al.*, 2002). Dessa maneira, todo o NO produzido exerce seus efeitos num raio de ação muito pequeno, restringindo a sua ligação com outras proteínas (Mannick e Schonhoff, 2002).

Outro exemplo desse mecanismo de controle da reação de S-nitrosilação ocorre com a caspase 3, enzima participante da cascata de ativação da apoptose. Essa enzima encontra-se inativa, seqüestrada no espaço intermembrana das mitocôndrias, possuindo um resíduo de cisteína S-nitrosilado (Mannick *et al.*, 2001). Quando ocorre ligação do Fas, ativando a apoptose, alterações na tensão de O_2 e no equilíbrio redox da mitocôndria fazem com que essa ligação se rompa, a caspase 3 migre para o citoplasma, agora ativa, e participe da execução do processo de apoptose

celular (Mannick *et al.*, 1999). Esse exemplo mostra como a localização subcelular pode definir se resíduos de cisteína em uma proteína podem sofrer S-nitrosilação ou não.

A compartimentalização subcelular é um mecanismo necessário, porém não suficiente, para conferir especificidade às reações de S-nitrosilação. Foi descrito uma seqüência de aminoácidos que facilita a ocorrência dessa reação. A presença de um aminoácido básico (lisina, arginina ou histidina) e um aminoácido ácido (aspartato ou glutamato) ladeando o (ou na vizinhança próxima do) resíduo de cisteína parece propiciar a S-nitrosilação (Stamler *et al.*, 1997). Essa disposição dos aminoácidos pode ocorrer tanto na estrutura primária quanto na terciária e foi demonstrada, de maneira elegante, como mecanismo de controle da atividade da metionina adenosiltransferase (Perez-Mato *et al.*, 1999).

Os dados mostrados acima sugerem que, apesar de ocorrer de forma não enzimática, a S-nitrosilação é bastante específica, tendo como alvo resíduos de cisteína com características únicas.

A S-nitrosilação de tióis proteicos altera a forma (e portanto, a função) da proteína alvo de maneira reversível. A denitrosilação também ocorre de maneira não enzimática. Mudanças no pH, pO₂, equilíbrio redox, luz, entre outros fatores, podem desestabilizar a ligação NO-tiol, levando à sua quebra (Stamler *et al.*, 2001). Essa reversibilidade da reação é melhor exemplificada pelas reações de S-nitrosilação que controlam a apoptose celular (Mannick *et al.*, 1999).

Existe, portanto, uma base experimental segura, demonstrando que S-nitrosilação de resíduos de cisteína possui especificidade e

reversibilidade, pré-requisitos essenciais para que seja reconhecida como um sistema de transdução de sinal (Mannick e Schonhoff, 2004). Disfunção nesse sistema pode promover ou produzir doenças (Uehara *et al.*, 2006). Por isso, ao invés de pensarmos em doenças por deficiência ou excesso de NO (ligado ou não a uma isoforma particular da NOS), devemos raciocinar mais especificamente em termos de alterações nas modificações pós-translacionais de alvos celulares específicos e/ou disfunção nas vias de transdução de sinal (Foster *et al.*, 2003).

2.4.5 S-Nitrosilação protéica e inflamação

O óxido nítrico desempenha diversos papéis na imunidade: como agente tóxico contra organismos agressores, como indutor de apoptose ou imunorregulador (Coleman, 2001). Ocorre também geração de grandes quantidades de NO nos locais do processo inflamatório, com evidências consistentes apontando a NOS-2 (iNOS ou NOS induzível) como a isoforma responsável pelo aumento na geração de NO observado na resposta imune (Nathan e Xie, 1994). Entretanto, o destino do NO produzido e seu efeito na função celular é menos claro.

O quadro que se desenha parece bastante complexo. O NO pode exercer uma combinação de efeitos tóxicos, regulatórios, apoptóticos e anti-apoptóticos em diferentes tipos celulares nos diferentes estágios do processo inflamatório (Coleman, 2001). Um exemplo é o papel do NO no processo inflamatório cutâneo induzido por contato com alérgenos: em baixas concentrações, o NO é pró-inflamatório, induzindo vasodilatação e

recrutamento de neutrófilos, enquanto em altas doses o NO é anti-inflamatório, diminuindo a expressão de moléculas de adesão, suprimindo a ativação e induzindo apoptose de células inflamatórias (Ross e Reske-Kunz, 2001). Estudos experimentais e clínicos utilizando-se doadores de NO ou inibidores de NO sintases em modelos de inflamação sistêmica, como a sepsis, também tiveram resultados controversos (Kilbourn *et al.*, 1997).

Em meio a esse cenário nebuloso, a S-nitrosilação de resíduos de cisteína vem emergindo como um mecanismo importante na sinalização e controle da resposta inflamatória. Foram descritas aumento da concentração de proteínas S-nitrosiladas em artrites, doença inflamatória pulmonar, asma e esclerose múltipla (Foster *et al.*, 2003).

Um dos principais alvos do NO no processo inflamatório parece ser o fator de transcrição NF- κ B (Marshall *et al.*, 2004), cujo papel na expressão de diversos genes envolvidos na resposta imune é fundamental (Ghosh e Karin, 2002). Recentemente foi demonstrado que a quinase IKK β (responsável pela fosforilação do IK β e, portanto, ativação do NF- κ B) sofre inativação por S-nitrosilação em resíduo de cisteína, pelo NO endógeno ou exógeno, suprimindo um novo mecanismo pelo qual o NO pode exercer efeitos anti-inflamatórios (Reynaert *et al.*, 2004).

Dados bem recentes mostram que em um modelo de inflamação sistêmica (injeção de LPS), ocorre maior mortalidade, hipotensão e lesão hepática em animais incapazes de diminuir a concentração intracelular de nitrosotóis devido a uma deficiência genética de S-nitrosoglutationa redutase (Liu *et al.*, 2004).

Ao mesmo tempo que refletem a importância da formação de S-nitrosotióis em processos inflamatórios, esses dados citados exemplificam a complexidade das interações entre NO e seus derivados e as proteínas envolvidas na inflamação. Assim, novas informações nesse campo de estudo são necessárias para que se possa melhor compreender e agir no processo inflamatório através de um dos seus principais participantes, que é o NO.

2.4.6 Nitrosilação do CD40

Como mostramos no primeiro capítulo, a molécula de CD40 possui 22 resíduos de cisteína em sua porção extracelular. Alguns desses resíduos são elegíveis como alvos par S-nitrosilação, baseados nos critérios discutidos acima. Assim, formulamos a hipótese de que a NO poderia modular a via de sinalização CD40/CD40L através da nitrosilação do receptor CD40.

Inicialmente demonstramos que a exposição direta de macrófagos derivados da linhagem monocítica humana THP-1 a doadores de NO reduzia a resposta pró-inflamatória subsequente ao tratamento dessas células com ligante de CD40 (rhCD40L) (Figura 24). Havia diminuição da secreção das citocinas TNF- α e IL-1 β , seja em nível de RNAm ou proteína, em macrófagos expostos a rhCD40L e tratados previamente com doador de NO (GSNO ou SNAP). Ao contrário, tratamento com inibidores de NO sintase (L-NAME ou 1400W) causava aumento da resposta ao rhCD40L.

O mesmo fenômeno foi observado em relação à expressão e atividade da MMP-9, enzima sabidamente estimulada pela via de sinalização CD40/CD40L.

Na tentativa de determinar o mecanismo da ação dos doadores de NO, demonstramos que ocorre nitrosilação do receptor CD40, através de dois métodos distintos: troca por biotina (mais conhecido pelo nome em inglês biotin switch) e detecção direta do NO por quimioluminescência em analisador de NO (Figura 25).

Entretanto, esses dados foram obtidos após exposição das células a doadores de NO. Para saber se o mesmo fenômeno ocorria num contexto mais fisiológico, estimulamos as células THP-1 a produzirem e NO e, descobrimos mais tarde, elas geram quantidades ínfimas de NO. Assim, tivemos que mudar nosso modelo experimental. Passamos a utilizar células RAW264.7, linhagem de macrófagos murinos, que produzem grande quantidade de NO quando estimulados com LPS e IFN- γ (Figura 26).

Tivemos inicialmente que repetir os experimentos realizados com as THP-1. Doadores de NO causavam o mesmo efeito na resposta induzida por rhCD40L e o receptor CD40 também sofria nitrosilação após exposição a doadores de NO (Figura 26).

Quando estimulamos as células RAW, pudemos detectar uma grande quantidade de NO produzido e uma grande surpresa. O receptor CD40 não era mais nitrosilado, apesar da quantidade aumentada de NO na sua vizinhança (Figura 27). Em outros ensaios, demonstramos que, quando estimuladas com LPS e IFN- γ , os receptores CD40 formam trímeros na membrana do macrófago e quando são previamente tratados com doadores de NO essa trimerização não ocorre (Figura 28).

Intrigados por esse resultado, partimos para experimentos *in vivo*. Camundongos expostos ao LPS foram sacrificados e a nitrosilação do CD40 presente em macrófagos peritoneais foi detectada. Observamos que o CD40 é nitrosilado em repouso, e que perde rapidamente o NO ligado a ele, quando as células são estimuladas (Figura 29). O interessante é que o mesmo fenômeno se repete em pacientes sépticos. Em indivíduos saudáveis, o receptor CD40 presente na membrana de monócitos circulantes apresenta-se nitrosilado, em seu estado basal. Em pacientes com sepse grave ou choque séptico, não pudemos detectar nitrosilação nesse receptor (Figura 30).

Baseado nesses resultados formulamos um modelo de ativação do receptor CD40, que depende do seu estado de nitrosilação (Figura 31).

Figure 24 - NO diminui a responsividade do C40. Células THP-1 tratadas com doadores de NO (GSNO ou SNAP) exibem uma resposta diminuída quando expostos a CD40L recombinante (1 mg/mL). Nesses sistemas, foi observada uma geração diminuída de TNF- α (a), medido por ELISA no sobrenadante de cultura e de transcritos para IL1- β (b), detectados por RT-PCR. Quando tratados como acima, os monócitos (c) e macrófagos (d) THP-1 também apresentavam uma diminuição da expressão e atividade de MMP-9, detectada por RT-PCR ou ensaio zimográfico (d), respectivamente. Ao contrário, tratamento com inibidores de NO sintase, (1mg/ml 1400W ou 10 mM L-NAME) combinado com rhCD40L aumentou a resposta dessas células. Em conjunto, esses dados mostram que NO inibe a sinalização pelo CD40/CD40L em monócitos e macrófagos

Figura 25 - S-nitrosilação do CD40 humano. Macrófagos THP-1 foram tratados (ou não), com GSNO 100 μ M. CD40 foi imunoprecipitado e nitrosilação foi detectada por biotin switch (a) ou redução/quimioluminescência (b). Ambos os ensaios mostram que a exposição a doadores de NO ocasiona nitrosilação do receptor CD40. Tratamento das células com inibidores da NO sintase (L-NAME, 10 mM) bloqueia o fenômeno. Paine (b) mostra diferença entre os sinais de CD40 tratado ou não com HgCl₂, o que corresponde ao NO liberado das moléculas imunoprecipitadas, enquanto (c) é o gel SDS PAGE, corado com prata, mostrando o CD40 imunoprecipitado para a análise mostrada em (b)

Figura 26 - Sinalização pelo CD40 é bloqueado por NO em macrófagos murinos. Macrófagos RAW264.7 foram tratados com LPS 1 mg/mL mais $\text{IFN}\gamma$ 100 U/mL, para desencadear produção de NO, ou 10 mM L-NAME para inibir atividade da NOS. LPS + IFN aumentou a geração de NO (a), avaliado indiretamente pela concentração de NO_2 nos sobrenadantes de cultura pelo ensaio de Griess. Como nas THP-1 humanas, os doadores de NO bloqueiam a resposta à estimulação com CD40L. Níveis de IL-12 estão diminuídos em culturas de RAW264.7 tratadas com GSNO (1-100 mM) ou aumentados com 1400W (1 mg/mL) (b)

Figura 27 - Nitrosilação do CD40 em macrófagos murinos. Macrófagos RAW264.7 foram tratados com LPS 1 mg/mL mais IFN- γ 100 U/mL, GSNO (1 mM) ou 1400W (1mg/ml). CD40 foi imunoprecipitado e a formação de nitrosotíóis analisada por redução/quimioluminescência. Houve aumento da nitrosilação do CD40 em células tratadas com GSNO e diminuição nas tratadas com 1400W. O interessante é que as células que foram expostas ao LPS + IFN, apesar de produzirem mais NO (Figura 26), apresentavam menor nitrosilação do CD40. Quantidades similares de CD40 foram examinadas, como observado no gel abaixo

Figure 28 - Trimerização do CD40 é inibida por NO. Macrófagos RAW264.7 foram estimulados com LPS mais IFN- γ por 4 horas, com, ou sem, doadores de NO (GSNO, 1 mM). Extratos totais foram separados em géis não denaturantes e expostos a anticorpo anti-CD40. Houve um claro aumento na formação dos oligômeros nas células tratadas com LPS + IFN, observado como bandas a aproximadamente 132 kDa, quando comparado a células controle. O tratamento com GSNO diminuiu a formação desses trímeros

Figure 29 - Perda da nitrosilação do CD40 ocorre in vivo, em murinos. Camundongos BALB/c receberam LPS, 10 mg/kg, ou PBS (controle). Após o tempo indicado, macrófagos peritoneais foram obtidos e nitrosilação do CD40 foi detectada por biotin switch. Uma hora após injeção de LPS já se observa perda da nitrosilação de CD40

2.4.7 A via de sinalização CD40/CD40L na sepse: ainda muito a compreender

O maior problema para o estudo de pacientes com diagnóstico de sepse é, a meu ver, determinar em que estágio da doença eles se encontram, do ponto de vista temporal. Em modelos experimentais podemos saber com exatidão o momento em que o agente infeccioso, ou o antígeno foi inoculado. Podemos acompanhar a produção de citocinas, num momento inicial, a proliferação e ativação celular a seguir e, manipulando-as podemos modificar o desfecho do quadro.

No paciente, isso não é possível. Conseguimos, no máximo, uma aproximação, baseada na história clínica, do momento em que o paciente começou a apresentar sintomas sugestivos de infecção. Quando o paciente chega à UTI, em sepse grave, não sabemos há quanto tempo sua resposta imune se iniciou, nem em que ponto ela se encontra.

Esse dado parece irrelevante, mas é ele que impede que as terapias para sepse tenham tido sucesso nos últimos anos. Existem momentos na história natural da sepse que processos pró-inflamatórios predominam, e podem ser lesivos ao organismo, assim como existem momentos em que a resposta imune está prejudicada e essa anergia piora a evolução do paciente.

Se soubermos classificar o quadro séptico de acordo com a resposta imune, teremos muito mais probabilidade de introduzir uma terapêutica adequada, antiinflamatória, antioxidante, capaz de estimular a resposta imune ou outra forma de terapia.

É nesse contexto que coloco os dados obtidos em conjunto com Dr. Luiz Monteiro. Esse tipo de prospecção através da resposta imune do

hospedeiro poderá melhorar o atendimento e tratamento de pacientes sépticos. É um projeto ambicioso e longo, que apenas começou, mas que poderá trazer grandes benefícios.

A complexidade da resposta imune do hospedeiro é exemplificada no trabalho mostrando o papel da nitrosilação do receptor CD40 na sinalização através dessa via. Nada pode ser visto de um ponto de vista maniqueísta. Tudo pode ser bom ou ruim, dependendo do momento e intensidade. O óxido nítrico que pode piorar a hipotensão num paciente já com dificuldades no controle do tônus vascular pode diminuir a sinalização pela via CD40/CD40L, possuindo, portanto efeitos antiinflamatórios, que podem ser indesejáveis, já que o pacientes pode estar necessitando melhorar a resposta ao agente agressor. Complicado? Também acho.

A nitrosilação de resíduos de cisteína como mecanismo de sinalização é por si só, um assunto bastante complexo. Diferente da fosforilação, onde enzimas realizam as reações específicas (fosforilação por quinases e defosforilação por fosfatases), a nitrosilação depende muito mais do ambiente e local onde se encontram as cisteínas alvo. Além disso, fatores como os equilíbrios ácido-básico e redox também interferem.

Toda essa rede de vias de sinalização pode interferir entre si, principalmente em situações onde há ativação de multiplas delas, como no caso da sepse.

Acredito que, embora complexo, o estudo das vias de sinalização na sepse, principalmente aquelas ligadas à imunidade do hospedeiro é um assunto excitante, cujos resultados poderão mudar o modo de classificar e tratar uma doença tão importante.

CONCLUSÃO E DESDOBRAMENTOS

Acredito ter apresentado, nos capítulos anteriores, uma explicação compreensível sobre a via de sinalização CD40/CD40L, suas funções na geração da resposta imune adquirida, a complexidade dos mecanismos de sua regulação e a sua participação na gênese de diversas doenças.

Fica claro, pelo exposto na primeira parte, que o principal motivo da dificuldade em se conseguir manipular terapêuticamente essa via é a complexidade de sua regulação e os diferentes processos, às vezes antagônicos, dos quais ela participa. Na segunda parte, entretanto, demonstramos que um melhor entendimento de sua fisiologia é necessário para que surjam alternativas de tratamento baseados na sua modulação.

Atualmente, em nosso laboratório, estamos envolvidos com três linhas de pesquisa, distintos, mas interligados.

A primeira se destina a utilizar a expressão dos componentes dessa via de sinalização, em especial o CD40L solúvel, como marcadores de doença, especialmente a sepse, a doença coronária aguda e a insuficiência cardíaca.

A segunda, a determinar interações entre vias de sinalização distintas, que possam modular o CD40/CD40L de maneira indireta. É o caso específico de nossos estudos sobre os PPARs e o óxido nítrico.

Finalmente, estamos estudando a sinalização através da nitrosilação proteica não só como maneira de controlar a ativação do CD40, mas também como mecanismo efetivo de manipular algumas das vias efetoras ativadas pelo CD40, como as metaloproteinases e produção de citocinas.

Embora pareçam objetivos distintos, acredito que seja a única maneira viável de se abordar assunto tão vasto quanto à sinalização intracelular.

A extensa rede de vias de transdução de sinal intracelular e de comunicação intercelular não permite, muitas vezes, que abordagens muito reducionistas sejam utilizadas, principalmente quando se tem a ambição de transpor esse conhecimento para a prática clínica.

Reconheço que o estudo em paralelo de diversas moléculas de sinalização é uma tarefa árdua, mas com o auxílio de meus alunos e colaboradores, acredito que poderemos resolver, pelo menos em parte, alguns desses quebra-cabeças que a fisiopatologia de determinadas doenças nos apresenta.

ANEXOS

METODOLOGIAS

Anexo A - Espécies Reativas de Oxigênio como segundos mensageiros na expressão de CD40 e Angiotensina II aumenta a expressão de CD40

1 Cultura de Células Musculares Lisas de Coronárias Humanas

Células Musculares Lisas de Coronárias Humanas (CASMCs) foram compradas da Clonetics (San Diego, CA) e cultivadas em meio Dulbecco, onde foram acrescentados suplementos, de acordo com as orientações do fornecedor. As células foram utilizadas após alcançarem 80-90% de confluência, entre as passagens 6 e 12.

2 Geração de ERO e Expressão de CD40/CD40L em CASMCs

Para investigar a geração de ERO e seu papel na sinalização de induzida por citocinas, CASMCs foram tratadas com IL-1 β recombinante humano (10 ng/ml) ou TNF- α (5 ng/ml) por 12 horas. Após esse período, as células foram coletadas para determinação de ERO por expressão de CD40/CD40L, como descrito abaixo. Em alguns experimentos, 6 horas antes de expor às citocinas, as CASMCs foram tratadas com o antioxidante N-acetilcisteína (NAC, 10 mM) ou o inibidor de flavoproteínas difenileneiodônio(DPI, 10 μ M), com o objetivo de bloquear a geração intracelular de ERO.

Em outra série de experimentos, as CASMCs foram transfectadas com oligonucleotídeos contra a unidade p22^{phox} das NAD(P)H oxidases,

construídos a partir de sequência derivada do rato, como descrito por outros autores (Gorlach *et al.*, 2000). Os oligonucleotídeos eram marcados com fluoresceína e foram transfectados temporariamente usando lipossomos e kit Superfect Transfection Reagent (USA Qiagen Inc., Valencia, CA), de acordo com as instruções dos fabricantes.

Seis horas após a transfecção, as células foram observadas em microscópio de fluorescência determinando a eficiência da transfecção em 50%, baseado no número de células que apresentavam fluorescência intracelular, dividido pelo número total de células. As células transfectadas foram então, expostas a IL-1 β ou TNF- α por mais 12 horas, colhidas e utilizadas em ensaios posteriores.

Os tratamentos descritos acima não foram tóxicos para as células, já que não houve alteração nos ensaios de viabilidade. A viabilidade foi testada pela conversão do MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difenil tetrazolium bromide) a formazam, utilizando NADH e NADPH como cofatores. MTT foi adicionado a uma concentração final de 0.5mg/ml, incubado por 4 horas e solubilizado por 24 h a 37° C. Absorbância foi lida usando leitor de placas Tecan Genius.

3 Experimentos com Ressonância Eletrônica Paramagnética (EPR)

Após os tratamentos descritos acima, a detecção de superóxido foi realizada por EPR, usando o seqüestrador (spin trap) 5,5'-dimethyl-pyrroline-N-oxide (DMPO, Dojindo Laboratories, Kumamoto, Japan). Uma suspensão de 10^7 células foi incubada com o spin trap DMPO, 50 mM, a 37°C , por 30 minutos, após o que as células foram transferidas para uma célula plana de quartzo e os espectros de EPR foram adquiridos à temperatura ambiente, com um espectrômetro Bruker ER 300. O espectrômetro operava em X-band com cavidade TM_{110} usando modulação de frequência de 100 kHz, amplitude de modulação de 0.5 G, potência de microondas de 20 milliwatts e frequência de microondas de 9.78 GHz, como descrito (Souza *et al.*, 2002). Dez aquisições seriais de 60 segundos cada foram acumuladas para a obtenção final do espectro. Incubação com o spin trap não gerou qualquer sinal de EPR. Em alguns experimentos, as CSMCs foram incubadas previamente com o mimético da superóxido dismutase (SODm, M40403, from MetaPhore Pharmaceuticals, St. Louis, MO), permeável a membranas, por 30 minutos antes da incubação como o spin trap. A quantificação dos adutos foi realizada utilizando-se metodologia específica, descrita por nós em outra publicação (Souza *et al.*, 2002).

4 Ensaios de Western Blotting (WB) e Imunoprecipitação (IP)

Após os tratamentos descritos acima, CD40 e CD40L foram detectados por imunoblot e/ou imunoprecipitação. Extratos de CASCs (20 µg) foram separados por SDS/PAGE, sob condições redutoras e transferidos para membranas de nitrocelulose, usando aparato apropriado (0.8 mA/cm², 60 min; Bio-Rad). As membranas foram expostas a anticorpos anti CD40 ou CD40L, diluídos em leite desnatado 1% e PBS. Após incubação por 12 horas, as membranas foram expostas a anticorpo secundário ligado a peroxidase, lavadas, reveladas com substrato quimioluminescente (Super Signal Femto, Pierce Biotechnology, Rockford, IL) e expostas a filmes sensíveis para detecção. Como controle de carregamento, as membranas foram expostas a anticorpos anti-GAPDH, que confirmou quantidades semelhantes de proteínas em todas as colunas.

Para os ensaios de imunoprecipitação, os extratos celulares foram incubados com anticorpo monoclonal contra CD40 or CD40L (Santa Cruz), 5µg para cada 100µl, por 1 h a temperatura ambiente. Proteína G agarose foi adicionada (15µl) e incubação mantida por mais duas horas. Após centrifugação, o pellet foi lavado cinco vezes com 500µl solução adequada (NaCl 500mM, NP-40 1%, Tris 50mM, pH 8). Os complexos imunes foram eluídos com solução de glicina 100mM, pH3, 100µl, at 4°C for 30 min. Finalmente, após mais uma centrifugação, o sobrenadante foi recuperado e

Finally, after another centrifugation, the pellet was recovered. After dislocating agarose beads by heating, samples were separated on SDS/PAGE gel, transferred to nitrocellulose membranes, and exposed to

secondary antibodies. Immunoprecipitation with isotype matched, unspecific antibody elicited no immune complex precipitation.

Em outra série de experimentos, CSMCs foram expostas a peróxido de hidrogênio (100 μ M, diluído em PBS e DTPA, 1 mM) por quatro horas, cultivados em meio livre de soro por mais 12 horas e então coletadas. A detecção de CD40/CD40L foi realizada por imunoblot, como descrito acima.

A quantidade de proteína em cada banda de western blot foi quantificada usando software Un-Scan-It (Silk Scientific Corporation).

5 Regulação de CD40 Dependente de Angiotensina II: Experimentos RT-PCR e WB

CSMCs foram cultivadas como descrito acima e expostas a Ang II por diferentes tempos e concentrações. RNAm para CD40 foi detectado por RT-PCR, com os primers descritos abaixo, como publicado (Pinchuk *et al.*, 1996) e sintetizados por Invitrogen (São Paulo, Brasil):

CD40 sense: 3'TGCCAGCCAGGACAGAAACT 5',

CD40 antisense: 3'GGGACCACAGACAACATCAG 5'

Amplificação de um fragmento de 442 bp foi efetuada utilizando uma temperatura inicial de denaturação de 95°C por 5 min, e 35 ciclos subsequentes como se segue: denaturação, 2 min a 95°C; anelamento, 2 min a 62°C, e extensão 3 min a 72°C. Todas as reações incluíram controle negativo. Os produtos da PCR foram separados (10 μ l por linha) por eletroforese em gel de agarose 1%, contendo brometo de etídio. As imagens dos géis foram adquiridas e a quantidade de RNAm em cada banda

quantificada por densitometria, com software específico Gene Flash and Software Image Gene Tools (Syngene).

A detecção das proteínas CD40 e CD40L após exposição à AngII (200 nM) por 12 horas, foi realizada por western blot como descrito acima.

6 Atividade de CD40/CD40L

Após estimulação com AngII por 12 horas, CSMCs foram expostas a CD40L humano recombinante (1 mg/mL, rCD40L, Peprotech, Mexico). Após 4 horas, o sobrenadante foi coletado e dosagem de IL-1 β foi realizada por ELISA (R&D Systems). As células aderidas foram coletadas, lisadas e a detecção de ciclooxigenase 2 (COX2) foi realizada por imunoprecipitação, como descrito acima (anticorpo monoclonal da BD Pharmingen, Lexington, KY).

7 Hipertensão Renovascular

Os protocolos experimentais seguiram os padrões estabelecidos pelo Comitê de Uso de Animais de Experimentação da Universidade de São Paulo.

Hipertensão renovascular foi induzida em ratos (2R – 1C) como descrito previamente (Callera *et al.*, 2004). Ratos Wistar, machos, (180-200 g) foram anestesiados e após laparotomia mediana, um clipe com diâmetro interno de 0.20 mm foi colocado em volta da artéria renal esquerda. Ratos normotensos (2 R) foram submetidos à laparotomia, sem inserção do clipe. Alguns ratos hipertensos foram tratados com vitamina E (alfa-tocopherol, 200 mg.Kg⁻¹.dia⁻¹, por gavagem). Os animais foram mantidos em sala

climatizada, com ciclo de luz de 12 h e acesso livre à água e comida. Pressão arterial caudal foi medida semanalmente. Após quatro semanas, foram sacrificados e detecção de CD40 na parede arterial foi realizada por western blotting em homogenatos de artérias, ou imunohistoquímica.

Para imunohistoquímica, as aortas torácicas foram fixadas em formalina, cortadas em fragmentos de 5 μ m e expostas a anticorpos primários anti-CD40 e CD40L. As imagens foram adquiridas num microscópio Leica.

8 Análise Estatística

Todos os dados são apresentados como média $\pm$ erro padrão da média (EPM). Comparações entre os grupos foram efetuadas por teste *t* de Student ou análise de variância (ANOVA), com pós-teste Student-Newman-Keuls. O nível de significância foi de 0,05.

Anexo B - Aterosclerose em camundongos deficientes em receptor para LDL e toll-like 4

1 Matrizes animais e condições experimentais

Camundongos deficientes para TLR4 (C57BL/10ScN) e camundongos deficientes para o receptor de LDL (LDLr) (*Idlrm1Her*) foram adquiridos comercialmente do Jackson Laboratory (Bar Harbor, EUA) e estão sendo mantidos no biotério central da FMUSP. Animais heterozigotos para a deficiência de ambos os genes foram obtidos a partir do cruzamento das matrizes. Os animais heterozigotos foram acasalados entre si e camundongos duplo *Knockout* foram obtidos. A ausência da expressão desses receptores foi confirmada por genotipagem utilizando-se reações de RT-PCR usando-se primers específicos para esses receptores.

Os animais gerados para o estudo são mantidos em gaiolas plásticas, em um número de 5 animais/gaiola, em ambiente de temperatura e umidade controlados e ciclo de luz/escuro de 12 h, e submetidos à alimentação *ad libitum* de ração e água. As gaiolas dos animais são limpas três vezes por semana, e a troca da água dos bebedouros, diariamente. Os camundongos com idade entre 12 e 16 semanas, são então divididos aleatoriamente em três grupos:

- a) machos LDLr ^{-/-}
- b) machos TLR4 ^{-/-}
- c) machos duplo *knockout* (LDLr ^{-/-} / TLR4 ^{-/-})

Os animais de todos os grupos são submetidos a uma dieta contendo 18% de gordura hidrogenada (óleo de coco e óleo de soja), 1,25% de

colesterol, em forma de "pellets", durante um período de 12 semanas. Para uma melhor conservação, a dieta é mantida sob refrigeração até momento de sua utilização.

2 Medida do Consumo Alimentar e Peso Corporal

O consumo alimentar de todos os animais é avaliado semanalmente, a partir da data do início da dieta, pela diferença de peso entre a quantidade de ração oferecida e as sobras pesadas na semana subsequente. O consumo "per capita" é avaliado pela média de consumo de cada gaiola/nº de animais.

O peso corporal de cada animal é avaliado quinzenalmente, em uma balança devidamente aferida. A partir do peso corporal de cada animal, determinamos a evolução ponderal média dos grupos no decorrer do estudo.

3 Sacrifício dos Animais e Coleta das Amostras

No final do período estabelecido, os animais são mantidos em jejum por 6 horas e posteriormente transferidos do biotério para o laboratório onde permanecem para ambientação durante 30 minutos, são pesados e anestesiados utilizando-se uma mistura de Rompum (cloridrato de hidrotiazina 16mg/kg peso) e Ketalar (cetamina 50mg/kg de peso) para evitar dor ou sofrimento dos mesmos. O sangue é coletado por punção cardíaca ou aorta abdominal em tubos contendo heparina ou EDTA como anticoagulante. Posteriormente, os órgãos dos animais são perfundidos com solução

fisiológica (NaCl 09%) gelada, e em seguida com formalina a 10% para iniciar a fixação da aorta. A perfusão é pelo ventrículo esquerdo com secção da aorta distal. O fígado é retirado, lavado com salina, e armazenado a -20°C para determinação do conteúdo de colesterol hepático. O coração, juntamente com os ramos aórticos, é cuidadosamente removido e colocado em formalina 10% durante pelo menos 48 horas até o seu processamento para determinação de lesão aterosclerótica.

As carcaças dos animais são descartadas conforme as normas de descarte de material biológico, acondicionadas em sacos plásticos que são armazenados em câmara fria até à posterior incineração das mesmas.

4 Análise do Perfil Lipídico e das Lipoproteínas por Cromatografia Líquida (FPLC)

Amostras de sangue dos animais correspondendo ao período basal (dieta chow) e após dieta aterogênica são extraídas da cauda em tubos contendo EDTA (concentração final 1 mM), centrifugados a 2500 x *g* a 4°C por 10 minutos e alíquotas de plasma estocadas a -70°C para análise de perfil lipídico e lipoproteínas. A análise do perfil das lipoproteínas é feita por cromatografia líquida (FLPC). Alíquotas de 200 µL de um *pool* de plasma de camundongos tratados e controles são injetados numa coluna Superose 6 (HR 10/30) (FPLC System, Pharmacia, Upsalla, Suécia). As lipoproteínas são eluídas numa velocidade de 0,5 mL/min com tampão Tris, pH 7.4. Após a eluição as 10 frações iniciais são descartadas e as 30 frações seguintes de

0,5 mL são coletadas e o colesterol determinado enzimaticamente em analisador automático bioquímico Cobas Mira (F.Hoffmann Roche, basileia, Suíça) utilizando kit comercial da Boehringer-Mannheim. A identificação dos picos correspondentes as VLDL, LDL e HDL é determinada pelo perfil do colesterol total.

5 Análise da Lesão Aterosclerótica

Os corações mantidos em formalina 10% são transferidos para uma cápsula (cassetes) cuidadosamente identificados e colocados sob água corrente durante pelo menos duas horas. Passado este período, estas cápsulas contendo os corações são incubadas, em banho-maria a 40°C por 2 horas, em gelatina (Type A–Porcine Skin) a 5%, em seguida gelatina a 10% (2hs), e finalmente em gelatina a 25% overnight. Posteriormente, são colocados sob refrigeração por três horas ou até atingirem a consistência de um bloco de gelatina e estes são mantidos em formalina 10% a 4°C. Para iniciar o processamento dos cortes, os ventrículos são seccionados entre o ápice e a base num plano paralelo a uma linha definida pelas pontas laterais dos átrios. Os corações são embebidos no composto de TBS (Tissue Freezing Medium- Riange Biomedical Sciences, Durham, NC) e colocados na câmara de congelamento do criostato (Microtomo HM 505 E-Micron Criostato). Os cortes têm início a partir da porção distal do coração. Após a identificação da raiz aórtica, quando os três folhetos valvulares são visíveis, cortes seriados de 10 µm são coletados em laminas de microscopia cobertas

com uma fina camada de gelatina. Cortes sucessivos alternados da aorta proximal são coletados numa área definida como logo após o final dos sinus aórtico até onde a válvula não é mais visualizada, tendo assim a aorta uniformemente arredondada (comprimento total 280 a 400 μm). As laminas são coradas com oil Red O e contra coradas com Hematoxilina e Light Green. A imagem da lesão aterosclerótica é capturada por câmera (Kohler) e pelo microscópio (Leica DMLS) e quantificada utilizando um software específico (Image-ProPlus-Media Cybernetics) versão 3.0 para Windows. A área média é calculada para cada animal e subsequente para cada grupo.

6 Composição da Placa

A aorta ascendente é retirada em bloco e embebida em meio de inclusão para congelamento. São realizados 48 cortes transversais da aorta, de 10 μm de espessura cada um, a partir da inserção da valva aórtica. As laminas são coradas com *oil Red O* e contra coradas com Hematoxilina e *Light Green* para avaliação do tamanho da placa e o conteúdo de gordura em cada corte. Um a cada seis cortes (oito cortes para cada animal) é avaliado morfometricamente quanto ao tamanho da placa e conteúdo lipídico, usando software específico (Leica Qwin). A soma das áreas da placa nos oito cortes é calculada e esse índice é nomeado “tamanho da placa”.

O arco aórtico é retirado e incluído em parafina. São realizados cortes longitudinais, de 5 μm de espessura, que são utilizados para determinar:

- Quantidade de colágeno na placa – por coloração de picrossírius.
- Expressão de moléculas inflamatórias CD40 e CD40L – por imunohistoquímica, usando anticorpos da Santa Cruz, para CD40 H120SCruz proporção 1:60 e para CD40L H215SCruz proporção 1:60.
- Quantidade de células musculares lisas – por imunohistoquímica, usando-se o anticorpo monoclonal Anti α -actina de músculo liso da SIGMA 1:3000.

Anexo C - Interação entre os PPARs e CD40/CD40L

1 Cultura de Células

Células de linhagem monocítica humana THP1 (gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Sergio Bydlowski) são cultivados em frascos de cultura com meio RPMI, suplementado com 10% de soro fetal bovino a 37°C e 5% de CO₂. Um dia antes dos experimentos, as células são tratadas com forbol-éster (PMA, 40nM) em meio sem soro, para se diferenciarem em macrófagos. Após 24 horas de tratamento, essas células aderem ao frasco de cultura, apresentam morfologia característica de macrófagos, além de expressarem marcadores específicos, como determinado em outros experimentos do nosso laboratório.

Os macrófagos derivados das células THP1 são expostos ao CD40L recobinante (Peprotech, Mexico), na dose de 10 µg/ml.

2 Obtenção de Monócitos de Sangue Periférico

A separação de células mononucleares do sangue periférico é obtida através do gradiente de Ficoll-Hypaque.

É coletado 10mL de sangue periférico em tubo contendo anticoagulante (EDTA, heparina ou citrato). Este é cuidadosamente depositado sobre 4 mL de Ficoll-Paque Plus (Amersham Biosciences) e centrifugado por 200g por 35 minutos em temperatura ambiente. Após a centrifugação os mononucleares formam uma banda (anel) distinta na interface. As células contidas no anel

são transferidas para outro tubo com o auxílio de uma pipeta pasteur. É colocado 10mL de solução salina e posteriormente centrifugado 200g por 10 minutos. Este procedimento é repetido três vezes. Ressuspender o pellet de células em 1ml de TRIzol para a extração de RNA.

3 Determinação de RNAm para PPARs por RT-PCR

Para verificar a possível influência de CD40/CD40L na expressão de PPAR, é realizada a análise de transcritos de mRNA. Primeiramente as células são estimuladas com CD40L (10µg/ml) por 2, 6, 16 e 24 horas. Para a extração do RNA total das células, o meio de cultura é retirado e as células são lavadas com PBS. Posteriormente é colocado 1 mL de Trizol no frasco de cultura, que deve ser mantido por 5 minutos a temperatura ambiente. É adicionado 200 µl de clorofórmio para cada ml inicial de TRIzol, sendo levemente homogenizado. Após incubado por três minutos a temperatura ambiente, é centrifugado por 15 minutos a 12.000 g na temperatura de 4°C. O sobrenadante é transferido para um outro tubo que receberá 500µl de isopropanol por ml de TRIzol, sendo incubado por 10 minutos a temperatura ambiente. O produto é centrifugado por 10 minutos na mesma velocidade e temperatura anterior e o sobrenadante é desprezado. É adicionado 1ml de etanol 70% (feito com água DEPC, dietilpirocarbonato) para cada ml inicial de TRIzol, sendo este novamente centrifugado, agora por 5 minutos a 7500g a 4°C. O álcool residual deverá ser retirado e ressuspensionado em água DEPC. O RNA extraído deverá ser armazenado a -80°C por 24 horas antes de ser quantificado por espectrofotometria. Após quantificada, a amostra é

submetida a um RT-PCR, que fará um cDNA a partir do RNA total extraído utilizando uma enzima transcriptase reversa. Para este processo é utilizado 1 µg de RNA que irá gerar 20 µl de cDNA. É realizado então um PCR semi quantitativo com primers específicos para PPAR α , β/δ e γ . A reação é realizada da seguinte forma (todos os reagentes da Invitrogen): 1µl de cDNA, 0,25 µl de *taq* polimerase, 2,5 µl de buffer para a *taq* polimerase, Cloreto de magnésio 1 µl, 1 µl de cada primer (sense e antisense), os nucleotídeos (dntps) 0,5µl e água autoclavada para completar 25 µl.

O PCR é realizado com as seguintes configurações: 92° por 3 min, 94° por 30 seg, temperatura específica de cada primer (descrito abaixo) por 1 min, 72° por 30 seg. Os resultados são analisados a partir da razão da expressão do gene alvo em relação ao gene housekeeping GAPDH.

PPAR α Sense: GTT TGA GGG GGT AAC AGC AA;

PPAR α Antisense: GCT AAC TGC AGA GGG TGA GG,

a 64° C por 32 ciclos;

PPAR β/δ Sense: ACT GAG TTC GCC AAG AGC AT;

PPAR β/δ Antisense: GCG TTG AAC TTG ACA GCA AA,

a 62°C por 26 ciclos

PPAR γ Sense: CAT TCT GGC CCA CCA ACT TTG G;

PPAR γ Antisense: TGG AGA TGC AGG CTC CAC TTT G,

a 64°C por 32 ciclos

GAPDH Sense: GGT GGT CTC CTC TGA CTT CAA CA

GAPDH Antisense: GTT GCT GTA GCC AAA TTC GTT GT

a 62°C por 28 ciclos

4 Determinação de RNAm para PPARs por PCR Real Time

Os níveis de expressão de genes alvo são analisados também por uma forma quantitativa de PCR, o Real-time PCR (Corbett life science). Os primers e suas configurações são as mesmas utilizadas para o PCR semi quantitativo. A reação é realizada da seguinte forma: 1 µl de cDNA, 25 µl do SYBR green mix (Invitrogen), 1 µl de cada primer (sense e antisense) e a água deverá ser adicionada para completar 50 µl. Os resultados são analisados a partir da razão da expressão do gene alvo em relação ao gene housekeeping GAPDH.

5 Silenciamento dos PPARs α , β/δ e γ por RNA de interferência (RNAi)

A sequência alvo para silenciamento da transcrição dos PPARs são (todas no sentido 5'-3'):

PPAR β/δ sense	GCAUGUCACACAACGCUAUTT
PPAR β/δ Antisense	AUAGCGUUGUGUGACAUGCTT

PPAR α sense	GCCCGUUAUCUGAAGAGUUTT
PPAR α antisense	AACUCUUCAGAUAAACGGGCTT

PPAR γ sense	GGAUCUCUCCGUAAUGGAATT
PPAR γ antisense	UCCCAUUACGGAGAGAUUCCTT

As células THP-1 são transfectadas com siRNA (Invitrogen) utilizando o AmpliScribe™ T7-Flash™ Transcription Kit (Epicentre Biotechnologies). Após 6 horas de incubação em meio sem soro, o siRNA é removido e as células são colocadas em meio contendo 10% de SFB. No dia seguinte, as placas são lavadas com PBS e as células são privadas de soro por 24 horas.

6 Determinação das Proteínas PPAR por Western Blotting

Para a obtenção do extrato citoplasmático contendo as proteínas de interesse, as células após serem estimuladas são tratadas com tampão de lise (RIPA buffer- 0,1 % de SDS, 1,0 % de IGEPAL, 1,0 % de oxalato de sódio, 10 mM de Tris.HCl (pH 7,5), 150 mM de NaCl) e posteriormente sonicadas. A amostra é centrifugada e o sobrenadante retirado para a quantificação de proteínas, pelo método de Bradford. Em seguida, as proteínas são submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e transferidas para membranas de nitrocelulose em sistema de transferência semi-seca. São detectadas com anticorpos específicos para PPAR α , β/δ e γ (BD Bioscience, USA) e reveladas por bioluminescência.

Anexo D - Mediadores da resposta imune em pacientes com sepse grave ou choque séptico

Este estudo foi do tipo descritivo prospectivo em que pacientes com diagnóstico de sepse grave ou choque séptico segundo os critérios já descritos foram avaliados em dois momentos diferentes: na fase aguda (quando da internação) e os que sobreviveram ao evento agudo, num segundo momento (fase de estabilização).

Os parâmetros clínicos foram: APACHE, SOFA diário, lactato, Δ de lactato (diferença entre o lactato inicial e após 24 horas) e mortalidade. Os pacientes que vieram a falecer foram divididos entre os que morreram devido ao insulto inicial (óbito precoce) e aqueles que sobreviveram à fase aguda, mas morreram em decorrência de alguma complicação tardia (óbito tardio).

Foram realizadas análises para quantificação de RNA mensageiro dos receptores TLR2, TLR4, CD40 e GR, além de ELISA para CD40L.

Foram realizadas coletas de dez indivíduos saudáveis com distribuição de sexo e idade semelhantes aos dos pacientes estudados. Essas pessoas constituíram o grupo controle e os resultados das análises compõem os valores encontrados naquela que denominamos fase de repouso

1 Casuística

Pacientes admitidos devido aos diagnósticos de sepse grave ou choque séptico eram considerados elegíveis desde que: fossem maiores de 18 anos, que não tivessem o diagnóstico de AIDS e não fossem neutropênicos e que concordassem em participar do estudo.

Após a admissão, no menor prazo de tempo possível era realizada uma coleta de 20 mL de sangue para as aferições e daí a cada 24 horas num total de três amostras. Para os pacientes que sobreviveram ao evento inicial eram colhidas novamente três amostras com intervalo de 24 horas.

O momento da segunda coleta foi definido como:

- Para os pacientes com sepse grave: reversão da disfunção orgânica que motivou a internação em UTI a ponto de se definir alta da UTI.
- Para os pacientes com choque séptico, definimos como necessário que o paciente atingisse uma arbitrária estabilidade hemodinâmica que consideramos como um prazo mínimo de 48 horas do desmame do vasopressor. Alguns desses pacientes apresentaram reversão do choque séptico, mas não chegaram a apresentar o período de tempo necessário para que fossem considerados estáveis e por esse motivo não tiveram a segunda coleta. Dos pacientes que iniciaram coleta na segunda fase (três dias de coleta) nenhum necessitou nova introdução de vasopressor durante os dias de coleta ou nos três dias subseqüentes.

Os pacientes foram então classificados como tendo sobrevivido à internação hospitalar, tendo sobrevivido ao evento inicial que motivou a internação, mas vindo a falecer ainda durante a mesma internação devido a novo evento (óbitos tardios) e aqueles que faleceram durante a fase aguda do evento que motivou a internação (óbitos precoces). Dentre os que sobreviveram ao evento inicial tivemos dois grupos: aqueles classificados como tendo completado o estudo e os que não completaram. Todos os pacientes que sobreviveram ao insulto inicial eram candidatos a nova coleta para aquela que classificamos como segunda fase.

O estudo foi realizado com 19 pacientes internados entre agosto e novembro de 2005.

Dois pacientes deram seu consentimento e posteriormente o retiraram sendo excluídos do estudo. Oito pacientes eram do sexo masculino e nove do sexo feminino. Cinco pacientes apresentavam sepse grave e 12 choque séptico. Quatro dos pacientes com choque séptico apresentaram disfunções orgânicas progressivas e evoluíram para óbito (óbitos precoces). Os outros oito pacientes com esse diagnóstico apresentaram regressão dos critérios clínicos de choque.

Os cinco pacientes com diagnóstico de sepse grave apresentaram melhora das disfunções orgânicas e tiveram alta da UTI.

Dos oito pacientes com choque séptico que apresentaram reversão do choque quatro tiveram outras complicações e vieram a falecer ainda naquela internação. Dos cinco com sepse grave dois também vieram a falecer tardiamente na mesma internação (óbitos tardios). Dentre as

complicações apresentadas, infecção nosocomial foi a responsável pelo óbito em quatro pacientes e hemorragia digestiva em um paciente. As características dos pacientes são apresentadas nas Tabelas 1, 2 e 3.

Tabela 1 - Pacientes segundo idade, sexo e diagnósticos – HCFMUSP - 2005

Paciente	Sexo	Idade	SS ou CS	Diagnóstico
1	M	27	SS	Malária
2	F	72	CS	Infecção partes moles: celulite de mama (neo de mama)
3	F	47	CS	Urosepse: pielonefrite em rim transplantado
4	F	67	CS	Infecção de partes moles: local de punção venosa
5	F	42	CS	Urosepse com obstrução por cálculo
6	F	33	CS	Pneumonia pneumocócica
7	M	81	CS	Infecção partes moles: celulite inguinal pós-operatória
9	M	66	CS	Peritonite no pós-operatório de enterectomia
10	F	39	CS	Colangite
11	M	78	SS	Estafilococcia
12	F	75	SS	Infecção de partes moles
13	F	47	CS	Sepse de origem abdominal
14	F	64	SS	Urosepse
16	M	80	CS	Pneumonia
17	M	45	CS	Infecção de corrente sanguínea associada a cateter de longa permanência
18	M	20	SS	Pneumonia
19	M	30	CS	Pneumonia pneumocócica

M = masculino; F = feminino; SS = Sepses graves; CS = Choque séptico

Tabela 2 - Frequência de hemoculturas positivas ou negativas - HCFMUSP – 2005

Hemocultura	n	%
Positiva	8	47,1
Negativa	9	52,9
Total	17	100,0

Tabela 3 - Germe isolado e Gram dos pacientes com hemocultura positiva – HCFMUSP – 2005

Paciente	Germe isolado	Gram
2	<i>Streptococcus agalactiae</i>	+
3	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-
4	<i>Stafilococcus aureus</i>	+
6	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	+
10	<i>Streptococcus e Proteus</i>	+/-
11	<i>Stafilococcus aureus</i>	+
14	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-
19	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	+

2 Variáveis

O valor preditivo da expressão dos vários marcadores foi testado frente às variáveis:

- Mortalidade
- APACHE (Acute Physiology And Chronic Health Evaluation).
- SOFA (Sequential Organ Failure Assessment)
- Lactato na admissão do paciente
- Diferença entre o lactato do terceiro dia de internação e o da admissão (? de lactato).

2.1 Mortalidade

Consideramos como mortalidade o óbito intrahospitalar.

2.2 APACHE

É um sistema de classificação de gravidade de doença que contempla doze variáveis fisiológicas, a idade do paciente e a presença ou não de doença crônica. É um entre outros vários escores desenvolvidos com a finalidade de estimar a mortalidade para grupos de pacientes internados em UTI. É utilizado também como variável de comparação entre serviços além de ser utilizado como linha de corte na indicação de alternativas terapêuticas. Largamente estudado e validado em diferentes países e em diferentes circunstâncias clínicas. Optamos então pelo APACHE como variável de comparação por ser um instrumento validado de estimativa de mortalidade de uma população.

2.3 SOFA

O SOFA é um escore desenvolvido para a avaliação de disfunção orgânica. São conferidos pontos para avaliar a capacidade de troca de oxigênio (respiratório), dosagem de plaquetas (hematológico), manutenção da pressão arterial e necessidade de vasopressores, além da necessidade de infusão de inotrópicos (cardiovascular), pontuação do paciente na escala de Glasgow (neurológico), dosagem de bilirrubinas (função hepática) e creatinina ou débito urinário (função renal). Tem caráter evolutivo, pois é

aplicado seqüencialmente. Tanto sua confiabilidade quanto acurácia foram demonstradas. A avaliação seriada do SOFA também é uma ferramenta útil no estabelecimento de prognóstico e já foi testado como variável de comparação na validação de marcadores em sepse.

Podemos afirmar que enquanto o APACHE é restrito no tempo, sendo colhidos os piores resultados das 24 horas iniciais do paciente na UTI, o SOFA oferece uma visão mais dinâmica e evolutiva.

2.4 Lactato e ? de lactato

Utilizando as variáveis APACHE e SOFA avaliamos a expressão dos receptores frente à mortalidade observada e à mortalidade estimada, além da evolução clínica dada pela evolução do SOFA.

O lactato pode ser utilizado como índice de gravidade do desequilíbrio entre oferta e consumo de oxigênio.

Sabemos que a lactatemia sofre influência também da eliminação e distribuição do lactato e que o fígado desempenha um papel central na sua eliminação. A presença de disfunção hepática pode ser então responsável pela elevação dos níveis de lactato sem que isso reflita piora da acidose metabólica ou da perfusão tecidual. Elevações transitórias de lactato podem ser vistas após sucesso de terapia de reperfusão (como expansão volêmica no choque) como consequência da eliminação do lactato acumulado em tecidos isquêmicos.

Em pacientes com sepse grave o maior componente da hiperlactatemia continua sendo o aumento da produção e não a diminuição da eliminação do lactato.

Uma das críticas que a monitorização do lactato recebe é o fato de representar uma variável hemodinâmica global que não espelharia as alterações de desequilíbrio entre oferta e consumo de oxigênio que ocorrem regionalmente. No entanto, durante a fase precoce da ressuscitação as variáveis regionais de disfunção orgânica não tiveram desempenho superior aos índices globais.

Sabemos que a hiperlactatemia não representa simplesmente um déficit de perfusão tecidual; outras fontes de produção de lactato podem ocorrer como, por exemplo, pulmonar durante a inflamação pulmonar aguda. Existem, porém, evidências consideráveis de que o lactato se correlaciona com sobrevida nas diferentes formas de choque. Além disso, a capacidade de eliminação do lactato é outro indicador de evolução, uma vez que pacientes que persistem com lactato elevado, a despeito de tratamento adequado, apresentam mortalidade maior do que aqueles que apresentam normalização desse valor.

Apesar de todos os senões e cuidados necessários na sua interpretação, o lactato permanece como um indicador de perfusão global nas fases iniciais do choque.

3 Análise das Vias de Sinalização

3.1 Extração de RNA

O RNA total do *pellet* de leucócitos foi extraído com 1 mL de Trizol (Invitrogen) em tubo de 1,5 mL, seguido de incubação de cinco minutos em temperatura ambiente. Foram adicionados 200 µl de clorofórmio, os tubos foram agitados em *vortex* e incubados por três minutos em temperatura ambiente. Após incubação, as amostras foram centrifugadas (Eppendorf 5804 R) a 4°C durante 15 minutos a 12000g. O sobrenadante foi transferido para outro tubo de 1,5 mL, onde foram adicionados 500 µl de isopropanol gelado. Após incubação por 10 minutos a amostra foi centrifugada a 4°C por 10 minutos a 12000g. O sobrenadante foi desprezado e, ao *pellet* foi adicionado 1 mL de etanol 70% gelado seguido de centrifugação a 4°C durante cinco minutos a 7500g. O sobrenadante foi desprezado e o *pellet* foi reconstituído em 50 µL de água com 0,1% de Dietilpirocarbonato (Sigma) e armazenado em freezer -80°C. A quantificação do material foi realizada em biofotômetro Eppendorf.

3.2 Amplificação por RT PCR

A partir de 1 µg de RNA total, o cDNA foi sintetizado com 1 µl de transcriptase reversa Impron II (Promega); 1 µl de Oligo dT (0,5 µg/µl - Promega); 1 µl de dNTP (10mM – Invitrogen), 6 µl de buffer 5 X; 0,5 µl de RNAsin (Promega), 2,4 µl de Cloreto de magnésio (25 mM).

A reação foi incubada em termociclador MJ Research PTC-200 por 50 minutos a 42°C e 70 °C por 15 minutos.

Após a síntese de cDNA foi feita uma reação de PCR para amplificação de GAPDH como controle positivo e teste da viabilidade de cada amostra.

A reação de PCR foi realizada com 25 µl de volume total com 17,75 µl de água deionizada; 2,5 µl de tampão (10X); 1µl de cloreto de magnésio a 50 mM; 0,5µl mM de dNTPs (10mM); 1 µl de cada primer a 10 pmol/µl; 0,25 µl de Taq polimerase (Invitrogen) e 1 µl de cDNA em termociclador PTC 200 MJ Research.

Todas as reações foram acompanhadas de um controle negativo (todos os componentes da reação, menos o cDNA) para eliminar uma possível contaminação da reação.

Para a avaliação da amplificação, os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em agarose a 1% corado com brometo de etídeo (Horizon® – Life Technologies). Todas as amostras foram normalizadas com a amplificação do gene GAPDH.

Primers utilizados

	Primers	Anelling (°C)	Produto (pb)	Ciclos
TLR2	Sense: 5' TATCGTCTTCTTGGTTCAAGCC 3'	61,7	1200	28
	Reverse: 5' AACAGAGCACAGCACATGCCAGAC 3'			
TLR4	Sense: 5' TCCCTCCAGGTTCTTGATTACAGTC 3'	61,7	652	28
	Reverse: 5' TGCTCAGAACTGCCAGGTCTG 3'			
CD40	Sense: 5' GGGACCACAGACAACATCAG 3'	64	442	28
	Reverse: 5' TGCCAGCCAGGACAGAAACT 3'			
CD40L	Sense: 5' CACCCCCTGTAACTGCCTA 3'	65,2	278	28
	Reverse: 5' CTGCACGCAAAGAAACAAAA 3'			
GR a	Sense: 5' GCAGTTTCACTCTCAATGGG 3'	66	296	28
	Reverse: 5' CTGGCCCTTCAAATGTTGCT 3'			

4 Análise dos Dados

Os resultados das análises dos receptores, bem como os dados clínicos de cada paciente foram submetidos a estatísticas descritivas e testes não paramétricos. A decisão pelos testes não paramétricos foi orientada pelo tamanho da amostra.

No estudo havia 17 pacientes na primeira fase e 10 na segunda. Para as variáveis qualitativas foram apresentadas as frequências absolutas e as frequências relativas. Para as variáveis quantitativas foram utilizadas a média e a mediana e desvio-padrão, mínimo e máximo para apontar a variabilidade.

Em cada uma das duas fases foram feitas avaliações em três dias. Os resultados foram apresentados como as médias dos três dias em cada uma das fases.

Foram realizadas comparações entre pacientes com e sem óbito, e também sem óbito, óbito precoce e óbito tardio e as variáveis citadas.

Para as comparações entre pacientes com e sem óbito o teste utilizado foi o não paramétrico de *Mann-Whitney*, considerando um nível de significância de 5%.

Os pacientes foram classificados em pacientes sem óbito, com óbito e com óbito tardio. Para a comparação entre esses grupos foi utilizado o teste não paramétrico de *Kruskall-Wallis*, considerando um nível de significância de 5%. Para identificar em quais dos três grupos houve diferença foram feitas comparações múltiplas (comparação dois a dois grupos) pelo teste de *Dunn*.

Os dados do APACHE, SOFA e Delta Lactato e os valores dos receptores foram submetidos a teste de correlação. Utilizou-se o coeficiente de Pearson que indica o grau de correlação entre as variáveis. Sabe-se que quanto mais próximo de 1 ou -1, mais forte a correlação linear.

Nas comparações entre fase I e fase II, o interesse foi verificar se havia diferença nos valores dos receptores na primeira fase (3 primeiras coletas) e nos valores da segunda fase. O teste utilizado para estas comparações foi o não paramétrico de *Wilcoxon*, assumindo-se também o nível de significância de 5%.

5 Aspectos Éticos

O protocolo do estudo foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesp da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo com o número 709-05.

Anexo E - Nitrosilação do CD40

1 Linhagens Celulares e Camundongos

A linhagem de monócitos/macrófagos murinos RAW264.7 (Rio de Janeiro Cell Bank) e a linhagem de monócitos humanos THP-1 (ATCC) foram mantidas em meio RPMI 1640 (Sigma), suplementado com 100 U/mL penicillin, 100 µg/ml streptomycin e soro fetal bovino inativado 10% (Gibco). Os monócitos THP-1 foram diferenciados para macrófagos pelo tratamento com 40 nM phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA, Sigma). Camundongos BALB/c machos foram obtidos de nosso Centro de Bioterismo. O protocolo animal foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal da Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.

2 RT-PCR

RNA total foi extraído das células por TRIzol (Invitrogen). RNAm foi amplificado por RT-PCR e os produtos de PCR foram analisados por densitometria e expressos como porcentagem da expressão de GAPDH. Reagentes para RT-PCR foram obtidos da Promega e as reações executadas em termociclador PTC-200 (MJ Research). Os primers usados foram da Invitrogen, conforme sequência abaixo:

GAPDH humano

sense: 5'GGTGGTCTCCTCTGACTTCAACA,

antisense: 5'GTTGCTGTAGCCAAATTCGTTGT;

IL-1 β humano

sense: 5'GGGCCTCAAGGAAAAGAATC,

antisense: 5'TTCTGCTTGAGAGGTGCTGA

3 ELISA

Determinação de citocinas em sobrenadantes de culturas foi realizado por ELISA, com kits de anticorpos monoclonais pareados, conforme instruções do fabricante (BD Biosciences).

4 Ensaio zimográfico

Sobrenadante das células em cultura (10 μ l) foram misturados com iguais volumes de tampão de amostra não redutor para SDS-PAGE e submetidos à eletroforese em gel de acrilamida 10%, contendo 0,1% de gelatina. Os géis foram então lavados com Triton X-100, 2%, por 1h e incubados em tampão de ativação, (50 mM Tris pH 7.4, 200 mM NaCl, 5 mM CaCl_2 and 0.02% NaN_3 , all from Sigma) por 16 h a 37°C. Após coloração com Coomassie Brilliant Blue R-250, a atividade gelatinolítica pode ser observada como bandas claras contra um fundo azul escuro.

5 Análise da sequência da proteína CD40

As seqüências do CD40 humano e murino foram acessadas no sítio Universal Protein Resource, da European Bioinformatics Institute (www.ebi.uniprot.org). Os números de acesso foram: P25942 (human) e P27512 (mouse). Análise dos motivos e alinhamentos foram realizados pela ferramenta online ClustalW, também do European Bioinformatics Institute ClustalW WWW Service at the European Bioinformatics Institute (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>).

6 Avaliação da produção de nitrito por RAW264.7

Produção de nitrito foi analisado em sobrenadantes de cultura de células RAW264.7 em tempos determinados utilizando o reagente de Griess, como descrito previamente (Haendeler *et al.*, 2002). Produção de NO intracelular foi analisada pelo corante fluorescente específico DAF-FM diacetate (Molecular Probes), de acordo com as instruções dos fabricantes.

7 Avaliação da S-nitrosilação de Proteínas por Biotin Switch

O biotin switch foi conduzido de acordo com a descrição de Jaffrey *et al.* (2001), com pequenas modificações. As células foram lavadas com PBS gelado lisadas em tampão HEN (250 mM HEPES pH 7.7, 1 mM EDTA, 0.1 mM neocuproine) contendo 0,5% CHAPS, 0.1% SDS, 20 mM N-ethylmaleimide (NEM) e inibidores de protease, por 30 min, a 4 °C, no escuro. NEM foi removido do lisado pela precipitação com acetona e os lisados foram ressuspensos em tampão contendo 1% SDS. Seuiu-se, então, a adição de 10mM ascorbate e 50 μ M N¹(3-maleimidyl-propionyl) biocytin (MPB, Molecular Probes). As misturas foram incubadas por uma hora, temperatura ambiente e as proteínas precipitadas com acetona, mais uma vez. Para imunoprecipitação do CD40, o pellet foi ressuspendido em tampão NP-40 buffer (150 mM NaCl, 1% NP-40, 50 mM Tris HCl pH 8.0 and protease inhibitors) e incubado por 12 h, com 2 μ g de anti-CD40 ou anticopro controle, a 4°C. Posteriormente, incubou-se com proteína G agarose por 2 h, e a resina lavada extensivamente com tampão NP-40 contendo 600 mM NaCl. As amostras foram então fervidas em tampão redutor e submetidas à imunoblot com anticorpo anti-biotina.

8 Avaliação da S-nitrosilação por redução-quimioluminescência

A S-nitrosilação foi avaliada por redução e quimioluminescência, por método descrito anteriormente, com algumas modificações (Fang *et al.*, 1998). As células foram lavadas em tampão gelado e lisadas com tampão NP40 (150 mM NaCl, 1% NP40, 50 mM Tris HCl pH 8.0) por 30 min a 4°C, no escuro e incubadas por 12 h 2 µg anti-CD40 ou anticorpo controle. Posteriormente, incubou-se com proteína G agarose por 2 h, e a resina lavada extensivamente com tampão 600 mM NaCl. A eluição do imunocomplexo foi obtida por incubação em 100 mM glicina pH 3,0. Eluatos foram divididos em quantidades iguais, uma delas tratada com 2,2 mM (final concentration) HgCl₂, que libera NO de suas pontes S-NO. As amostras foram então analisados em analisador Sievers 280 Nitric Oxide Analyzer (liquid sample mode), de acordo com as instruções do fabricante. O aumento do sinal observado observado nas amostras tratadas com HgCl₂, acima das amostras não tratadas com HgCl₂-foi considerado a quantidade de NO ligado a resíduo de cisteína no CD40 imunoprecipitado.

9 Ensaios de Oligomerização do CD40

Células RAW264.7 foram estimuladas com LPS (100 U/ml) e IFN-γ (1 µg/ml), com ou sem GSNO (100 µM). Após 4 horas, as células foram coletadas e homogeneizadas em tampão de lise semdetergente. Os homogenatos foram separados e gel não denaturante, (10% acrilamida) e posteriormente expostos a anticorpo anti-CD40.

10 Pacientes

Amostras de sangue (20 mL) foram coletadas de 10 pacientes internados na Unidade de Terapia Intensiva do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil, com diagnóstico de sepse grave ou choque séptico segundo a definição do 2001 International Sepsis Definitions Conference (Levy *et al.*, 2003). Os pacientes tinham idade de 60.4 ± 10.7 anos (range 42-76) e todos receberam o tratamento padrão para sua condição. Dez voluntários saudáveis forneceram as amostras controle. O sangue foi coletado e transportado ao abrigo da luz, em tubos contendo 5 units/mL de heparina. Os demais procedimentos foram efetuados a 4°C. Os mononucleares foram isolados usando gradiente de Ficoll-Hypaque (Pharmacia). As células foram lavadas duas vezes em PBS e o procedimento para detecção da nitrosilação foi efetuado como descrito acima.

11 Análise estatística

Todos os dados são apresentados como média $\pm$ erro padrão da média (EPM). Comparações entre os grupos foram efetuadas por teste *t* de Student ou análise de variância (ANOVA), com pós-teste de Tukey. O nível de significância foi de 0,05.

REFERÊNCIAS

Abraham E, Anzueto A, Gutierrez G, Tessler S, San Pedro G, Wunderink R, Dal Nogare A, Nasraway S, Berman S, Cooney R, Levy H, Baughman R, Rumbak M, Light RB, Poole L, Allred R, Constant J, Pennington J, Porter S. Double-blind randomised controlled trial of monoclonal antibody to human tumour necrosis factor in treatment of septic shock. NORASEPT II Study Group. *Lancet*. 1998; 351(9107): 929-33.

Akbiyik F, Ray DM, Gettings KF, Blumberg N, Francis CW, Phipps RP. Human bone marrow megakaryocytes and platelets express PPARgamma, and PPARgamma agonists blunt platelet release of CD40 ligand and thromboxanes. *Blood*. 2004; 104(5): 1361-8.

Alderson MR, Armitage RJ, Tough TW, Strockbine L, Fanslow WC, Spriggs MK. CD40 expression by human monocytes: regulation by cytokines and activation of monocytes by the ligand for CD40. *J Exp Med*. 1993; 178(2): 669-74.

Allen RC, Armitage RJ, Conley ME, Rosenblatt H, Jenkins NA, Copeland NG, Bedell MA, Edelhoff S, Disteché CM, Simoneaux DK, et al. CD40 ligand gene defects responsible for X-linked hyper-IgM syndrome. *Science*. 1993; 259(5097): 990-3.

Anname D, Aegerter P, Jars-Guincestre MC, Guidet B. Current epidemiology of septic shock: the CUB-Rea Network. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003; 168(2): 165-72.

Anolik JH, Aringer M. New treatments for SLE: cell-depleting and anti-cytokine therapies. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2005; 19(5): 859-78.

Armitage RJ, Fanslow WC, Strockbine L, Sato TA, Clifford KN, Macduff BM, Anderson DM, Gimpel SD, Davis-Smith T, Maliszewski CR, et al. Molecular and biological characterization of a murine ligand for CD40. *Nature*. 1992; 357(6373): 80-2.

Aukrust P, Muller F, Ueland T, Berget T, Aaser E, Brunsvig A, Solum NO, Forfang K, Froland SS, Gullestad L. Enhanced levels of soluble and membrane-bound CD40 ligand in patients with unstable angina. Possible reflection of T lymphocyte and platelet involvement in the pathogenesis of acute coronary syndromes. *Circulation*. 1999; 100(6): 614-20.

Azevedo LC, Pedro MA, Souza LC, de Souza HP, Janiszewski M, da Luz PL, Laurindo FR. Oxidative stress as a signaling mechanism of the vascular response to injury: the redox hypothesis of restenosis. *Cardiovasc Res*. 2000; 47(3): 436-45.

Bishop GA, Hostager BS. Molecular mechanisms of CD40 signaling. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2001; 49(2): 129-37.

Blossom S, Chu EB, Weigle WO, Gilbert KM. CD40 ligand expressed on B cells in the BXSB mouse model of systemic lupus erythematosus. *J Immunol*. 1997; 159(9): 4580-6.

Bone RC, Balk RA, Fein AM, Perl TM, Wenzel RP, Reines HD, Quenzer RW, Iberti TJ, Macintyre N, Schein RM. A second large controlled clinical study of E5, a monoclonal antibody to endotoxin: results of a prospective, multicenter, randomized, controlled trial. The E5 Sepsis Study Group. *Crit Care Med*. 1995; 23(6): 994-1006.

Bonifaz L, Bonnyay D, Mahnke K, Rivera M, Nussenzweig MC, Steinman RM. Efficient targeting of protein antigen to the dendritic cell receptor DEC-205 in the steady state leads to antigen presentation on major histocompatibility complex class I products and peripheral CD8⁺ T cell tolerance. *J Exp Med*. 2002; 196(12): 1627-38.

Callera GE, Yogi A, Tostes RC, Rossoni LV, Bendhack LM. Ca^{2+} -activated K^{+} channels underlying the impaired acetylcholine-induced vasodilation in 2K-1C hypertensive rats. *J Pharmacol Exp Ther*. 2004; 309(3): 1036-42.

Cheng G, Schoenberger SP. CD40 signaling and autoimmunity. *Curr Dir Autoimmun*. 2002; 5: 51-61.

Clark EA, Ledbetter JA. Activation of human B cells mediated through two distinct cell surface differentiation antigens, Bp35 and Bp50. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986; 83(12): 4494-8.

Clarkson MR, Sayegh MH. T-cell costimulatory pathways in allograft rejection and tolerance. *Transplantation*. 2005; 80(5): 555-63.

Cocks BG, de Waal Malefyt R, Galizzi JP, de Vries JE, Aversa G. IL-13 induces proliferation and differentiation of human B cells activated by the CD40 ligand. *Int Immunol*. 1993; 5(6): 657-63.

Coleman JW. Nitric oxide in immunity and inflammation. *Int Immunopharmacol*. 2001; 1(8): 1397-406.

Cusack M, Redwood S, Coltart J. Recent advances in ischaemic heart disease. *Postgrad Med J*. 2000; 76(899): 542-6.

Dagenais GR, Pogue J, Fox K, Simoons ML, Yusuf S. Angiotensin-converting-enzyme inhibitors in stable vascular disease without left ventricular systolic dysfunction or heart failure: a combined analysis of three trials. *Lancet*. 2006; 368(9535): 581-8.

Davis JC, Jr., Totoritis MC, Rosenberg J, Sklenar TA, Wofsy D. Phase I clinical trial of a monoclonal antibody against CD40-ligand (IDEC-131) in patients with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol*. 2001; 28(1): 95-101.

Daynes RA, Jones DC. Emerging roles of PPARs in inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol*. 2002; 2(10): 748-59.

de Boer OJ, van der Wal AC, Houtkamp MA, Ossewaarde JM, Teeling P, Becker AE. Unstable atherosclerotic plaques contain T-cells that respond to *Chlamydia pneumoniae*. *Cardiovasc Res*. 2000; 48(3): 402-8.

de Lemos JA, Zirlik A, Schonbeck U, Varo N, Murphy SA, Khera A, McGuire DK, Stanek G, Lo HS, Nuzzo R, Morrow DA, Peshock R, Libby P. Associations between soluble CD40 ligand, atherosclerosis risk factors, and subclinical atherosclerosis: results from the Dallas Heart Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005; 25(10): 2192-6.

De Smedt T, Pajak B, Muraille E, Lespagnard L, Heinen E, De Baetselier P, Urbain J, Leo O, Moser M. Regulation of dendritic cell numbers and maturation by lipopolysaccharide in vivo. *J Exp Med*. 1996; 184(4): 1413-24.

Dhainaut JF, Tenaillon A, Le Tulzo Y, Schlemmer B, Solet JP, Wolff M, Holzapfel L, Zeni F, Dreyfuss D, Mira JP, et al. Platelet-activating factor receptor antagonist BN 52021 in the treatment of severe sepsis: a randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter clinical trial. BN 52021 Sepsis Study Group. *Crit Care Med.* 1994; 22(11): 1720-8.

Ding L, Green JM, Thompson CB, Shevach EM. B7/CD28-dependent and -independent induction of CD40 ligand expression. *J Immunol.* 1995; 155(11): 5124-32.

Duez H, Fruchart JC, Staels B. PPARS in inflammation, atherosclerosis and thrombosis. *J Cardiovasc Risk.* 2001; 8(4): 187-94.

Dzau VJ. Theodore Cooper Lecture: Tissue angiotensin and pathobiology of vascular disease: a unifying hypothesis. *Hypertension.* 2001; 37(4): 1047-52.

Edfeldt K, Swedenborg J, Hansson GK, Yan ZQ. Expression of toll-like receptors in human atherosclerotic lesions: a possible pathway for plaque activation. *Circulation.* 2002; 105(10): 1158-61.

Eu JP, Sun J, Xu L, Stamler JS, Meissner G. The skeletal muscle calcium release channel: coupled O₂ sensor and NO signaling functions. *Cell.* 2000; 102(4): 499-509.

Fang K, Ragsdale NV, Carey RM, MacDonald T, Gaston B. Reductive assays for S-nitrosothiols: implications for measurements in biological systems. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998; 252(3): 535-40.

Fanslow WC, Clifford KN, Seaman M, Alderson MR, Spriggs MK, Armitage RJ, Ramsdell F. Recombinant CD40 ligand exerts potent biologic effects on T cells. *J Immunol*. 1994; 152(9): 4262-9.

Fanslow WC, Srinivasan S, Paxton R, Gibson MG, Spriggs MK, Armitage RJ. Structural characteristics of CD40 ligand that determine biological function. *Semin Immunol*. 1994; 6(5): 267-78.

Faveeuw C, Fougeray S, Angeli V, Fontaine J, Chinetti G, Gosset P, Delerive P, Maliszewski C, Capron M, Staels B, Moser M, Trottein F. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activators inhibit interleukin-12 production in murine dendritic cells. *FEBS Lett*. 2000; 486(3): 261-6.

Fisher CJ, Jr., Agosti JM, Opal SM, Lowry SF, Balk RA, Sadoff JC, Abraham E, Schein RM, Benjamin E. Treatment of septic shock with the tumor necrosis factor receptor:Fc fusion protein. The Soluble TNF Receptor Sepsis Study Group. *N Engl J Med*. 1996; 334(26): 1697-702.

Fisher CJ, Jr., Slotman GJ, Opal SM, Pribble JP, Bone RC, Emmanuel G, Ng D, Bloedow DC, Catalano MA. Initial evaluation of human recombinant interleukin-1 receptor antagonist in the treatment of sepsis syndrome: a randomized, open-label, placebo-controlled multicenter trial. *Crit Care Med.* 1994; 22(1): 12-21.

Flohe SB, Agrawal H, Schmitz D, Gertz M, Flohe S, Schade FU. Dendritic cells during polymicrobial sepsis rapidly mature but fail to initiate a protective Th1-type immune response. *J Leukoc Biol.* 2006; 79(3): 473-81.

Foster MW, McMahon TJ, Stamler JS. S-nitrosylation in health and disease. *Trends Mol Med.* 2003; 9(4): 160-8.

Freudenthal PS, Steinman RM. The distinct surface of human blood dendritic cells, as observed after an improved isolation method. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990; 87(19): 7698-702.

Fries KM, Sempowski GD, Gaspari AA, Blieden T, Looney RJ, Phipps RP. CD40 expression by human fibroblasts. *Clin Immunol Immunopathol.* 1995; 77(1): 42-51.

Fujii S, Liu K, Smith C, Bonito AJ, Steinman RM. The linkage of innate to adaptive immunity via maturing dendritic cells in vivo requires CD40 ligation in addition to antigen presentation and CD80/86 costimulation. *J Exp Med.* 2004; 199(12): 1607-18.

Fuleihan R, Ahern D, Geha RS. Expression of the CD40 ligand in T lymphocytes and induction of IgE isotype switching. *Int Arch Allergy Immunol*. 1995; 107(1-3): 43-4.

Ghosh S, Karin M. Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. *Cell*. 2002; 109 Suppl: S81-96.

Gilliam AC, Kremer IB, Yoshida Y, Stevens SR, Tootell E, Teunissen MB, Hammerberg C, Cooper KD. The human hair follicle: a reservoir of CD40+ B7-deficient Langerhans cells that repopulate epidermis after UVB exposure. *J Invest Dermatol*. 1998; 110(4): 422-7.

Gold JA, Parsey M, Hoshino Y, Hoshino S, Nolan A, Yee H, Tse DB, Weiden MD. CD40 contributes to lethality in acute sepsis: in vivo role for CD40 in innate immunity. *Infect Immun*. 2003; 71(6): 3521-8.

Goldblatt F, Isenberg DA. New therapies for systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Immunol*. 2005; 140(2): 205-12.

Gorlach A, Brandes RP, Bassus S, Kronemann N, Kirchmaier CM, Busse R, Schini-Kerth VB. Oxidative stress and expression of p22phox are involved in the up-regulation of tissue factor in vascular smooth muscle cells in response to activated platelets. *Faseb J*. 2000; 14(11): 1518-28.

Gow AJ, Farkouh CR, Munson DA, Posencheg MA, Ischiropoulos H. Biological significance of nitric oxide-mediated protein modifications. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2004; 287(2): L262-8.

Graf D, Korthauer U, Mages HW, Senger G, Kroczeck RA. Cloning of TRAP, a ligand for CD40 on human T cells. *Eur J Immunol*. 1992; 22(12): 3191-4.

Grammer AC, Lipsky PE. B cell abnormalities in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther*. 2003; 5 Suppl 4: S22-7.

Grewal IS, Flavell RA. CD40 and CD154 in cell-mediated immunity. *Annu Rev Immunol*. 1998; 16: 111-35.

Grewal IS, Flavell RA. The role of CD40 ligand in costimulation and T-cell activation. *Immunol Rev*. 1996; 153: 85-106.

Griendling KK, Minieri CA, Ollerenshaw JD, Alexander RW. Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res*. 1994; 74(6): 1141-8.

Haendeler J, Hoffmann J, Tischler V, Berk BC, Zeiher AM, Dimmeler S. Redox regulatory and anti-apoptotic functions of thioredoxin depend on S-nitrosylation at cysteine 69. *Nat Cell Biol*. 2002; 4(10): 743-9.

Harnett MM. CD40: a growing cytoplasmic tale. *Sci STKE*. 2004; 2004(237): pe25.

Heeschen C, Dimmeler S, Hamm CW, van den Brand MJ, Boersma E, Zeiher AM, Simoons ML. Soluble CD40 ligand in acute coronary syndromes. *N Engl J Med*. 2003; 348(12): 1104-11.

Henn V, Slupsky JR, Grafe M, Anagnostopoulos I, Forster R, Muller-Berghaus G, Kroczeck RA. CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells. *Nature*. 1998; 391(6667): 591-4.

Hess DT, Matsumoto A, Kim SO, Marshall HE, Stamler JS. Protein S-nitrosylation: purview and parameters. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2005; 6(2): 150-66.

Hollenbaugh D, Mischel-Petty N, Edwards CP, Simon JC, Denfeld RW, Kiener PA, Aruffo A. Expression of functional CD40 by vascular endothelial cells. *J Exp Med*. 1995; 182(1): 33-40.

Hotchkiss RS, Karl IE. The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med*. 2003; 348(2): 138-50.

Issemann I, Green S. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature*. 1990; 347(6294): 645-50.

Jaffrey SR, Erdjument-Bromage H, Ferris CD, Tempst P, Snyder SH. Protein S-nitrosylation: a physiological signal for neuronal nitric oxide. *Nat Cell Biol.* 2001; 3(2): 193-7.

Jaffrey SR, Snowman AM, Eliasson MJ, Cohen NA, Snyder SH. CAPON: a protein associated with neuronal nitric oxide synthase that regulates its interactions with PSD95. *Neuron.* 1998; 20(1): 115-24.

Johnson-Leger C, Christensen J, Klaus GG. CD28 co-stimulation stabilizes the expression of the CD40 ligand on T cells. *Int Immunol.* 1998; 10(8): 1083-91.

Jones CB, Sane DC, Herrington DM. Matrix metalloproteinases: a review of their structure and role in acute coronary syndrome. *Cardiovasc Res.* 2003; 59(4): 812-23.

Karmann K, Hughes CC, Schechner J, Fanslow WC, Pober JS. CD40 on human endothelial cells: inducibility by cytokines and functional regulation of adhesion molecule expression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995; 92(10): 4342-6.

Kiechl S, Wiedermann CJ, Willeit J. Toll-like receptor 4 and atherogenesis. *Ann Med.* 2003; 35(3): 164-71.

Kilbourn RG, Szabo C, Traber DL. Beneficial versus detrimental effects of nitric oxide synthase inhibitors in circulatory shock: lessons learned from experimental and clinical studies. *Shock.* 1997; 7(4): 235-46.

Kintscher U, Lyon CJ, Law RE. Angiotensin II, PPAR-gamma and atherosclerosis. *Front Biosci.* 2004; 9: 359-69.

Koho H, Paulie S, Ben-Aissa H, Jonsdottir I, Hansson Y, Lundblad ML, Perlmann P. Monoclonal antibodies to antigens associated with transitional cell carcinoma of the human urinary bladder. I. Determination of the selectivity of six antibodies by cell ELISA and immunofluorescence. *Cancer Immunol Immunother.* 1984; 17(3): 165-72.

Kovanen PT, Kaartinen M, Paavonen T. Infiltrates of activated mast cells at the site of coronary atheromatous erosion or rupture in myocardial infarction. *Circulation.* 1995; 92(5): 1084-8.

Kweon MN, Kiyono H. CD40L in autoimmunity and mucosally induced tolerance. *J Clin Invest.* 2002; 109(2): 171-3.

Lafage-Pochitaloff M, Herman P, Birg F, Galizzi JP, Simonetti J, Mannoni P, Banchereau J. Localization of the human CD40 gene to chromosome 20, bands q12-q13.2. *Leukemia.* 1994; 8(7): 1172-5.

Lane P, Hao G, Gross SS. S-nitrosylation is emerging as a specific and fundamental posttranslational protein modification: head-to-head comparison with O-phosphorylation. *Sci STKE.* 2001; 2001(86): RE1.

Law CL, Wormann B, LeBien TW. Analysis of expression and function of CD40 on normal and leukemic human B cell precursors. *Leukemia*. 1990; 4(11): 732-8.

Lee CH, Chawla A, Urbiztondo N, Liao D, Boisvert WA, Evans RM, Curtiss LK. Transcriptional repression of atherogenic inflammation: modulation by PPARdelta. *Science*. 2003; 302(5644): 453-7.

Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, Cohen J, Opal SM, Vincent JL, Ramsay G. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Crit Care Med*. 2003; 31(4): 1250-6.

Li JJ, Chen JL. Inflammation may be a bridge connecting hypertension and atherosclerosis. *Med Hypotheses*. 2005; 64(5): 925-9.

Liang KW, Sheu WH, Lee WL, Liu TJ, Ting CT, Chen YT, Lee WJ. Coronary artery disease progression is associated with C-reactive protein and conventional risk factors but not soluble CD40 ligand. *Can J Cardiol*. 2006; 22(8): 691-6.

Libby P. Coronary artery injury and the biology of atherosclerosis: inflammation, thrombosis, and stabilization. *Am J Cardiol*. 2000; 86(8B): 3J-8J; discussion 8J-9J.

Libby P. Current concepts of the pathogenesis of the acute coronary syndromes. *Circulation*. 2001; 104(3): 365-72.

Lien E, Ingalls RR. Toll-like receptors. *Crit Care Med*. 2002; 30(1 Suppl): S1-11.

Liew FY, Xu D, Brint EK, O'Neill LA. Negative regulation of toll-like receptor-mediated immune responses. *Nat Rev Immunol*. 2005; 5(6): 446-58.

Lipton SA, Choi YB, Takahashi H, Zhang D, Li W, Godzik A, Bankston LA. Cysteine regulation of protein function--as exemplified by NMDA-receptor modulation. *Trends Neurosci*. 2002; 25(9): 474-80.

Liu L, Yan Y, Zeng M, Zhang J, Hanes MA, Ahearn G, McMahon TJ, Dickfeld T, Marshall HE, Que LG, Stamler JS. Essential roles of S-nitrosothiols in vascular homeostasis and endotoxic shock. *Cell*. 2004; 116(4): 617-28.

Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature*. 2000; 407(6801): 233-41.

Lutgens E, Cleutjens KB, Heeneman S, Koteliansky VE, Burkly LC, Daemen MJ. Both early and delayed anti-CD40L antibody treatment induces a stable plaque phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000; 97(13): 7464-9.

Lutgens E, Daemen MJ. CD40-CD40L interactions in atherosclerosis. *Trends Cardiovasc Med*. 2002; 12(1): 27-32.

Lutgens E, Gorelik L, Daemen MJ, de Muinck ED, Grewal IS, Kotliansky VE, Flavell RA. Requirement for CD154 in the progression of atherosclerosis. *Nat Med*. 1999; 5(11): 1313-6.

Mach F, Schonbeck U, Libby P. CD40 signaling in vascular cells: a key role in atherosclerosis? *Atherosclerosis*. 1998; 137 Suppl: S89-95.

Mach F, Schonbeck U, Sukhova GK, Atkinson E, Libby P. Reduction of atherosclerosis in mice by inhibition of CD40 signalling. *Nature*. 1998; 394(6689): 200-3.

Mach F, Schonbeck U, Sukhova GK, Bourcier T, Bonnefoy JY, Pober JS, Libby P. Functional CD40 ligand is expressed on human vascular endothelial cells, smooth muscle cells, and macrophages: implications for CD40-CD40 ligand signaling in atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94(5): 1931-6.

Mannick JB, Hausladen A, Liu L, Hess DT, Zeng M, Miao QX, Kane LS, Gow AJ, Stamler JS. Fas-induced caspase denitrosylation. *Science*. 1999; 284(5414): 651-4.

Mannick JB, Schonhoff C, Papeta N, Ghafourifar P, Szibor M, Fang K, Gaston B. S-Nitrosylation of mitochondrial caspases. *J Cell Biol*. 2001; 154(6): 1111-6.

Mannick JB, Schonhoff CM. Nitrosylation: the next phosphorylation? *Arch Biochem Biophys*. 2002; 408(1): 1-6.

Mannick JB, Schonhoff CM. NO means no and yes: regulation of cell signaling by protein nitrosylation. *Free Radic Res*. 2004; 38(1): 1-7.

Marshall HE, Hess DT, Stamler JS. S-nitrosylation: physiological regulation of NF-kappaB. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004; 101(24): 8841-2.

Martin G, Duez H, Blanquart C, Berezowski V, Poulain P, Fruchart JC, Najib-Fruchart J, Glineur C, Staels B. Statin-induced inhibition of the Rho-signaling pathway activates PPARalpha and induces HDL apoA-I. *J Clin Invest*. 2001; 107(11): 1423-32.

Martin GS, Mannino DM, Eaton S, Moss M. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med*. 2003; 348(16): 1546-54.

Marx N, Libby P, Plutzky J. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) and their role in the vessel wall: possible mediators of cardiovascular risk? *J Cardiovasc Risk*. 2001; 8(4): 203-10.

Mathur RK, Awasthi A, Saha B. The conundrum of CD40 function: host protection or disease promotion? *Trends Parasitol*. 2006; 22(3): 117-22.

Mayer L, Kwan SP, Thompson C, Ko HS, Chiorazzi N, Waldmann T, Rosen F. Evidence for a defect in "switch" T cells in patients with immunodeficiency and hyperimmunoglobulinemia M. *N Engl J Med*. 1986; 314(7): 409-13.

Mazzei GJ, Edgerton MD, Losberger C, Lecoanet-Henchoz S, Graber P, Durandy A, Gauchat JF, Bernard A, Allet B, Bonnefoy JY. Recombinant soluble trimeric CD40 ligand is biologically active. *J Biol Chem*. 1995; 270(13): 7025-8.

McCord JM. The evolution of free radicals and oxidative stress. *Am J Med*. 2000; 108(8): 652-9.

McLellan AD, Sorg RV, Williams LA, Hart DN. Human dendritic cells activate T lymphocytes via a CD40: CD40 ligand-dependent pathway. *Eur J Immunol*. 1996; 26(6): 1204-10.

Michelsen KS, Doherty TM, Shah PK, Arditi M. Role of Toll-like receptors in atherosclerosis. *Circ Res*. 2004; 95(12): e96-7.

Mosca M, Ruiz-Irastorza G, Khamashta MA, Hughes GR. Treatment of systemic lupus erythematosus. *Int Immunopharmacol*. 2001; 1(6): 1065-75.

Moses AV, Williams SE, Strussenberg JG, Heneveld ML, Ruhl RA, Bakke AC, Bagby GC, Nelson JA. HIV-1 induction of CD40 on endothelial cells promotes the outgrowth of AIDS-associated B-cell lymphomas. *Nat Med*. 1997; 3(11): 1242-9.

Mulhaupt F, Matter CM, Kwak BR, Pelli G, Veillard NR, Burger F, Graber P, Luscher TF, Mach F. Statins (HMG-CoA reductase inhibitors) reduce CD40 expression in human vascular cells. *Cardiovasc Res.* 2003; 59(3): 755-66.

Murad F. Cellular signaling with nitric oxide and cyclic GMP. *Braz J Med Biol Res.* 1999; 32(11): 1317-27.

Murakami K, Ma W, Fuleihan R, Pober JS. Human endothelial cells augment early CD40 ligand expression in activated CD4⁺ T cells through LFA-3-mediated stabilization of mRNA. *J Immunol.* 1999; 163(5): 2667-73.

Naghavi M, Libby P, Falk E, Casscells SW, Litovsky S, Rumberger J, Badimon JJ, Stefanadis C, Moreno P, Pasterkamp G, Fayad Z, Stone PH, Waxman S, Raggi P, Madjid M, Zarrabi A, Burke A, Yuan C, Fitzgerald PJ, Siscovick DS, de Korte CL, Aikawa M, Airaksinen KE, Assmann G, Becker CR, Chesebro JH, Farb A, Galis ZS, Jackson C, Jang IK, Koenig W, Lodder RA, March K, Demirovic J, Navab M, Priori SG, Rekhater MD, Bahr R, Grundy SM, Mehran R, Colombo A, Boerwinkle E, Ballantyne C, Insull W, Jr., Schwartz RS, Vogel R, Serruys PW, Hansson GK, Faxon DP, Kaul S, Drexler H, Greenland P, Muller JE, Virmani R, Ridker PM, Zipes DP, Shah PK, Willerson JT. From vulnerable plaque to vulnerable patient: a call for new definitions and risk assessment strategies: Part II. *Circulation.* 2003; 108(15): 1772-8.

Naghavi M, Libby P, Falk E, Casscells SW, Litovsky S, Rumberger J, Badimon JJ, Stefanadis C, Moreno P, Pasterkamp G, Fayad Z, Stone PH, Waxman S, Raggi P, Madjid M, Zarrabi A, Burke A, Yuan C, Fitzgerald PJ, Siscovick DS, de Korte CL, Aikawa M, Juhani Airaksinen KE, Assmann G, Becker CR, Chesebro JH, Farb A, Galis ZS, Jackson C, Jang IK, Koenig W, Lodder RA, March K, Demirovic J, Navab M, Priori SG, Rekhter MD, Bahr R, Grundy SM, Mehran R, Colombo A, Boerwinkle E, Ballantyne C, Insull W, Jr., Schwartz RS, Vogel R, Serruys PW, Hansson GK, Faxon DP, Kaul S, Drexler H, Greenland P, Muller JE, Virmani R, Ridker PM, Zipes DP, Shah PK, Willerson JT. From vulnerable plaque to vulnerable patient: a call for new definitions and risk assessment strategies: Part I. *Circulation*. 2003; 108(14): 1664-72.

Nathan C, Xie QW. Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. *Cell*. 1994; 78(6): 915-8.

Nathan C. Points of control in inflammation. *Nature*. 2002; 420(6917): 846-52.

Nolan A, Weiden MD, Hoshino Y, Gold JA. Cd40 but not CD154 knockout mice have reduced inflammatory response in polymicrobial sepsis: a potential role for Escherichia coli heat shock protein 70 in CD40-mediated inflammation in vivo. *Shock*. 2004; 22(6): 538-42.

Oliver WR, Jr., Shenk JL, Snaith MR, Russell CS, Plunket KD, Bodkin NL, Lewis MC, Winegar DA, Sznaidman ML, Lambert MH, Xu HE, Sternbach DD, Kliewer SA, Hansen BC, Willson TM. A selective peroxisome proliferator-activated receptor delta agonist promotes reverse cholesterol transport. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001; 98(9): 5306-11.

O'Sullivan B, Thomas R. CD40 and dendritic cell function. *Crit Rev Immunol*. 2003; 23(1-2): 83-107.

Pascual G, Fong AL, Ogawa S, Gamliel A, Li AC, Perissi V, Rose DW, Willson TM, Rosenfeld MG, Glass CK. A SUMOylation-dependent pathway mediates transrepression of inflammatory response genes by PPAR-gamma. *Nature*. 2005; 437(7059): 759-63.

Paulie S, Ehlin-Henriksson B, Mellstedt H, Koho H, Ben-Aissa H, Perlmann P. A p50 surface antigen restricted to human urinary bladder carcinomas and B lymphocytes. *Cancer Immunol Immunother*. 1985; 20(1): 23-8.

Paulie S, Koho H, Ben-Aissa H, Hansson Y, Lundblad ML, Perlmann P. Monoclonal antibodies to antigens associated with transitional cell carcinoma of the human urinary bladder. II. Identification of the cellular target structures by immunoprecipitation and SDS-PAGE analysis. *Cancer Immunol Immunother*. 1984; 17(3): 173-9.

Perez-Mato I, Castro C, Ruiz FA, Corrales FJ, Mato JM. Methionine adenosyltransferase S-nitrosylation is regulated by the basic and acidic amino acids surrounding the target thiol. *J Biol Chem*. 1999; 274(24): 17075-9.

Pinchuk LM, Klaus SJ, Magaletti DM, Pinchuk GV, Norsen JP, Clark EA. Functional CD40 ligand expressed by human blood dendritic cells is up-regulated by CD40 ligation. *J Immunol*. 1996; 157(10): 4363-70.

Psaty BM, Lumley T, Furberg CD, Schellenbaum G, Pahor M, Alderman MH, Weiss NS. Health outcomes associated with various antihypertensive therapies used as first-line agents: a network meta-analysis. *Jama*. 2003; 289(19): 2534-44.

Qin H, Wilson CA, Lee SJ, Zhao X, Benveniste EN. LPS induces CD40 gene expression through the activation of NF-kappaB and STAT-1alpha in macrophages and microglia. *Blood*. 2005; 106(9): 3114-22.

Quezada SA, Jarvinen LZ, Lind EF, Noelle RJ. CD40/CD154 interactions at the interface of tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol*. 2004; 22: 307-28.

Reischl IG, Pollabauer EM, Peiritsch S, Schlager S, Gladstone P, Vooijs WC, Woisetschlager M, Mudde GC. The 'monocytic' cell line I937 displays typical B cell characteristics. *Immunol Lett*. 1996; 49(1-2): 127-31.

Reynaert NL, Ckless K, Korn SH, Vos N, Guala AS, Wouters EF, van der Vliet A, Janssen-Heininger YM. Nitric oxide represses inhibitory kappaB kinase through S-nitrosylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004; 101(24): 8945-50.

Ross R, Reske-Kunz AB. The role of NO in contact hypersensitivity. *Int Immunopharmacol*. 2001; 1(8): 1469-78.

Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med*. 1999; 340(2): 115-26.

Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature*. 1993; 362(6423): 801-9.

Roy M, Waldschmidt T, Aruffo A, Ledbetter JA, Noelle RJ. The regulation of the expression of gp39, the CD40 ligand, on normal and cloned CD4+ T cells. *J Immunol*. 1993; 151(5): 2497-510.

Saito D, Oka T, Kajiyama A, Ohnishi N, Shiraki T. Factors predicting compensatory vascular remodelling of the carotid artery affected by atherosclerosis. *Heart*. 2002; 87(2): 136-9.

Schonbeck U, Libby P. CD40 signaling and plaque instability. *Circ Res*. 2001; 89(12): 1092-103.

Schonbeck U, Libby P. The CD40/CD154 receptor/ligand dyad. *Cell Mol Life Sci.* 2001; 58(1): 4-43.

Schonbeck U, Mach F, Bonnefoy JY, Loppnow H, Flad HD, Libby P. Ligation of CD40 activates interleukin 1beta-converting enzyme (caspase-1) activity in vascular smooth muscle and endothelial cells and promotes elaboration of active interleukin 1beta. *J Biol Chem.* 1997; 272(31): 19569-74.

Schonbeck U, Mach F, Libby P. CD154 (CD40 ligand). *Int J Biochem Cell Biol.* 2000; 32(7): 687-93.

Schonbeck U, Mach F, Sukhova GK, Herman M, Graber P, Kehry MR, Libby P. CD40 ligation induces tissue factor expression in human vascular smooth muscle cells. *Am J Pathol.* 2000; 156(1): 7-14.

Schonbeck U, Mach F, Sukhova GK, Murphy C, Bonnefoy JY, Fabunmi RP, Libby P. Regulation of matrix metalloproteinase expression in human vascular smooth muscle cells by T lymphocytes: a role for CD40 signaling in plaque rupture? *Circ Res.* 1997; 81(3): 448-54.

Schonbeck U, Sukhova GK, Shimizu K, Mach F, Libby P. Inhibition of CD40 signaling limits evolution of established atherosclerosis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000; 97(13): 7458-63.

Semb AG, van Wissen S, Ueland T, Smilde T, Waehre T, Tripp MD, Froland SS, Kastelein JJ, Gullestad L, Pedersen TR, Aukrust P, Stalenhoef AF. Raised serum levels of soluble CD40 ligand in patients with familial hypercholesterolemia: downregulatory effect of statin therapy. *J Am Coll Cardiol*. 2003; 41(2): 275-9.

Sidiropoulos PI, Boumpas DT. Lessons learned from anti-CD40L treatment in systemic lupus erythematosus patients. *Lupus*. 2004; 13(5): 391-7.

Silva E, Pedro Mde A, Sogayar AC, Mohovic T, Silva CL, Janiszewski M, Cal RG, de Sousa EF, Abe TP, de Andrade J, de Matos JD, Rezende E, Assuncao M, Avezum A, Rocha PC, de Matos GF, Bento AM, Correa AD, Vieira PC, Knobel E. Brazilian Sepsis Epidemiological Study (BASES study). *Crit Care*. 2004; 8(4): R251-60.

Slupsky JR, Kalbas M, Willuweit A, Henn V, Kroczeck RA, Muller-Berghaus G. Activated platelets induce tissue factor expression on human umbilical vein endothelial cells by ligation of CD40. *Thromb Haemost*. 1998; 80(6): 1008-14.

Souza HP, Laurindo FR, Ziegelstein RC, Berlowitz CO, Zweier JL. Vascular NAD(P)H oxidase is distinct from the phagocytic enzyme and modulates vascular reactivity control. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001; 280(2): H658-67.

Souza HP, Liu X, Samouilov A, Kuppusamy P, Laurindo FR, Zweier JL. Quantitation of superoxide generation and substrate utilization by vascular NAD(P)H oxidase. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002; 282(2): H466-74.

Souza HP, Souza LC, Anastacio VM, Pereira AC, Junqueira ML, Krieger JE, da Luz PL, Augusto O, Laurindo FR. Vascular oxidant stress early after balloon injury: evidence for increased NAD(P)H oxidoreductase activity. *Free Radic Biol Med*. 2000; 28(8): 1232-42.

Stamler JS, Lamas S, Fang FC. Nitrosylation. the prototypic redox-based signaling mechanism. *Cell*. 2001; 106(6): 675-83.

Stamler JS, Meissner G. Physiology of nitric oxide in skeletal muscle. *Physiol Rev*. 2001; 81(1): 209-237.

Stamler JS, Toone EJ, Lipton SA, Sucher NJ. (S)NO signals: translocation, regulation, and a consensus motif. *Neuron*. 1997; 18(5): 691-6.

Steinman RM, Turley S, Mellman I, Inaba K. The induction of tolerance by dendritic cells that have captured apoptotic cells. *J Exp Med*. 2000; 191(3): 411-6.

Sugimoto K, Galle C, Preiser JC, Creteur J, Vincent JL, Pradier O. Monocyte CD40 expression in severe sepsis. *Shock*. 2003; 19(1): 24-7.

Sun J, Xin C, Eu JP, Stamler JS, Meissner G. Cysteine-3635 is responsible for skeletal muscle ryanodine receptor modulation by NO. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001; 98(20): 11158-62.

Touyz RM. Reactive oxygen species and angiotensin II signaling in vascular cells -- implications in cardiovascular disease. *Braz J Med Biol Res*. 2004; 37(8): 1263-73.

Tsitsikov EN, Ramesh N, Geha RS. Structure of the murine CD40 ligand gene. *Mol Immunol*. 1994; 31(12): 895-900.

Uehara T, Nakamura T, Yao D, Shi ZQ, Gu Z, Ma Y, Masliah E, Nomura Y, Lipton SA. S-nitrosylated protein-disulphide isomerase links protein misfolding to neurodegeneration. *Nature*. 2006; 441(7092): 513-7.

van der Wal AC, Piek JJ, de Boer OJ, Koch KT, Teeling P, van der Loos CM, Becker AE. Recent activation of the plaque immune response in coronary lesions underlying acute coronary syndromes. *Heart*. 1998; 80(1): 14-8.

van Kooten C, Banchereau J. CD40-CD40 ligand. *J Leukoc Biol*. 2000; 67(1): 2-17.

Varo N, de Lemos JA, Libby P, Morrow DA, Murphy SA, Nuzzo R, Gibson CM, Cannon CP, Braunwald E, Schonbeck U. Soluble CD40L: risk prediction after acute coronary syndromes. *Circulation*. 2003; 108(9): 1049-52.

Varo N, Libby P, Nuzzo R, Italiano J, Doria A, Schonbeck U. Elevated release of sCD40L from platelets of diabetic patients by thrombin, glucose and advanced glycation end products. *Diab Vasc Dis Res*. 2005; 2(2): 81-7.

Varo N, Vicent D, Libby P, Nuzzo R, Calle-Pascual AL, Bernal MR, Fernandez-Cruz A, Veves A, Jarolim P, Varo JJ, Goldfine A, Horton E, Schonbeck U. Elevated plasma levels of the atherogenic mediator soluble CD40 ligand in diabetic patients: a novel target of thiazolidinediones. *Circulation*. 2003; 107(21): 2664-9.

von Birgelen C, Mintz GS, de Vrey EA, Serruys PW, Kimura T, Nobuyoshi M, Popma JJ, Leon MB, Erbel R, de Feyter PJ. Preintervention lesion remodelling affects operative mechanisms of balloon optimised directional coronary atherectomy procedures: a volumetric study with three dimensional intravascular ultrasound. *Heart*. 2000; 83(2): 192-7.

Wykes M, Poudrier J, Lindstedt R, Gray D. Regulation of cytoplasmic, surface and soluble forms of CD40 ligand in mouse B cells. *Eur J Immunol*. 1998; 28(2): 548-59.

Xu XH, Shah PK, Faure E, Equils O, Thomas L, Fishbein MC, Luthringer D, Xu XP, Rajavashisth TB, Yano J, Kaul S, Arditi M. Toll-like receptor-4 is expressed by macrophages in murine and human lipid-rich atherosclerotic plaques and upregulated by oxidized LDL. *Circulation*. 2001; 104(25): 3103-8.

Yellin MJ, Brett J, Baum D, Matsushima A, Szabolcs M, Stern D, Chess L. Functional interactions of T cells with endothelial cells: the role of CD40L-CD40-mediated signals. *J Exp Med*. 1995; 182(6): 1857-64.

Zelcer N, Tontonoz P. SUMOylation and PPARgamma: wrestling with inflammatory signaling. *Cell Metab*. 2005; 2(5): 273-5.