

MARIANA TORRENTE GONÇALVES

**AÇÃO DO IMUNOMODULADOR P-MAPA SOBRE O SISTEMA
COMPLEMENTO E RECEPTORES DO TIPO TOLL EM MODELO DE
INFLAMAÇÃO INDUZIDA POR LIPOPOLISSACARÍDEO**

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

Área de Concentração: Imunologia

Orientador: Prof. Dra. Denise Vilarinho Tambourgi

Versão original

São Paulo
2014

RESUMO

GONÇALVES, M. T. **Ação do imunomodulador P-MAPA sobre o sistema complemento e receptores do tipo Toll em modelo de inflamação induzida por lipopolissacarídeo.** 2014. 107 f. Dissertação (Mestrado em Imunologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Concebido inicialmente como um composto antitumoral, o P-MAPA (agregado polimérico de fosfolinoleato-palmitoleato de magnésio e amônio proteico) apresentou potencial imunomodulatório, em diversos estudos, sobre a secreção de citocinas, produção de óxido nítrico por macrófagos, eliminação de patógenos intracelulares e redução da progressão de tumores. No entanto, a sua ação sobre elementos da imunidade inata, como o sistema complemento e receptores do tipo Toll (TLRs), ainda não é conhecida, embora já existam evidências de que o P-MAPA possa agir sobre TLRs. Neste estudo foi avaliado o papel modulador do P-MAPA sobre o sistema complemento, os receptores TLR2 e TLR4, as moléculas acessórias CD14 e CD11b, e os receptores de anafilatoxinas C3aR e C5aR, na inflamação induzida por LPS de *E.coli*, usando o modelo *ex vivo* de sangue total humano. Nossos resultados mostraram que o P-MAPA promove ativação das vias clássica e alternativa do sistema complemento e produção das anafilatoxinas C3a e C5a. Sobre leucócitos de sangue periférico, o composto promoveu aumento da expressão de CD11b e CD14, diminuição da expressão de C5aR, TLR2 e TLR4, quando combinado com LPS, mas não promoveu alterações na expressão de C3aR. O P-MAPA promoveu redução dos níveis de IFN- γ no plasma, aumento da produção de TNF- α , IL-8, IL-12(p70) e peróxinitrito, mas não induziu produção de superóxido, IL-6, IL-1 β , TGF- β ou IL-10. Ensaios, nos quais a inibição do sistema complemento foi induzida, sugerem que o P-MAPA pode interagir direta ou indiretamente (via ativação do complemento) com TLR2 e TLR4. Por meio de testes *in vivo* foi possível determinar a dose letal do P-MAPA e, em conjunto, os dados obtidos no presente estudo mostram que o P-MAPA apresenta ação pró-inflamatória em modelo *ex vivo* de sangue total humano e que o tratamento combinado com LPS leva a uma amplificação dos seus efeitos.

Palavras-chave: P-MAPA. Inflamação. Imunomoduladores. Receptores do tipo Toll. Sistema Complemento. Sangue total humano.

ABSTRACT

GONÇALVES, M. T. **Action of the immunomodulator P-MAPA on the complement system and Toll like receptors in a model of inflammation induced by lipopolysaccharide.** 2014. 107 p. Masters Thesis (Immunology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Originally designed as an anti-tumor compound, P-MAPA (proteinaceous aggregate of ammonium and magnesium phospholinoleate-palmitoleate anhydride) has been described as a promising immunomodulatory compound in several studies, having promoted cytokine secretion, nitric oxide production by macrophages, killing of intracellular pathogens and reduction of tumor progression. However, its role on elements of innate immunity, such as the complement system and Toll-like receptors (TLRs) is unknown, although there is evidence that P-MAPA can activate TLRs. In this study, we have evaluated the modulating effects of P-MAPA on the complement system, TLR2 and TLR4, the accessory molecules CD14 and CD11b, and anaphylatoxins receptors C3aR and C5aR, in *E. coli*'s LPS-induced inflammation, using an *ex vivo* model of human whole blood. Our results demonstrated that the compound promotes activation of the complement's classical and alternative pathways and the production of anaphylatoxins C3a and C5a. On peripheral blood leukocytes, the compound promoted increase of CD11b and CD14 expression, decrease of C5aR, TLR2 and TLR4, when combined with LPS, but did not change C3aR expression. P-MAPA promoted reduction of IFN- γ in plasma, increased production of TNF- α , IL-8, IL-12(p70) and peroxynitrite, but did not induce the production of superoxide, IL-6, IL-1 β , TGF- β or IL-10. In assays where the complement system was inhibited suggest that P-MAPA can interact directly or indirectly (through complement activation) with TLR2 and TLR4. Through *in vivo* tests, we were able to determine a lethal dose for P-MAPA. Altogether, our data indicates that P-MAPA has proinflammatory action in *ex vivo* model of human whole blood and that treatment combined with LPS leads to amplification of its effects.

Keywords: P-MAPA. Inflammation. Immunomodulators, Toll like Receptors. Complement System. Human whole blood.

1 INTRODUÇÃO

1.1 P-MAPA

O agregado polimérico de fosfolinoleato-palmitoleato de magnésio e amônio protéico, conhecido como P-MAPA, é um produto obtido a partir da fermentação de culturas selecionadas de *Aspergillus oryzae* (FARMABRASILIS, 2008). Ele foi concebido, inicialmente, como um tratamento anti-tumoral (FARMABRASILIS, 2008), mas estudos em modelos animais e *in vitro* têm sugerido que o composto pode possuir propriedades imunomodulatórias.

O P-MAPA possui uma história de desenvolvimento distinta. Durante mais de 20 anos, o Dr. Odilon da Silva Nunes, médico residente de Birigui, SP, desenvolveu sozinho o composto, em um pequeno laboratório que mantinha em sua própria casa. Em meados dos anos 1980, seu filho, Iseu Nunes, levou a descoberta do pai ao laboratório do Dr. Nelson Durán, um químico que lecionava na Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Foi com a ajuda do Dr. Durán que se iniciaram os estudos de caracterização do P-MAPA e surgiram as primeiras oportunidades para estudá-lo em um ambiente acadêmico (FIORAVANTI, 2010). Hoje, o P-MAPA foi patenteado, sob regime de patente aberta, e é fornecido pela Farmabrasilis, uma Organização Não Governamental, sediada na cidade de Campinas, SP.

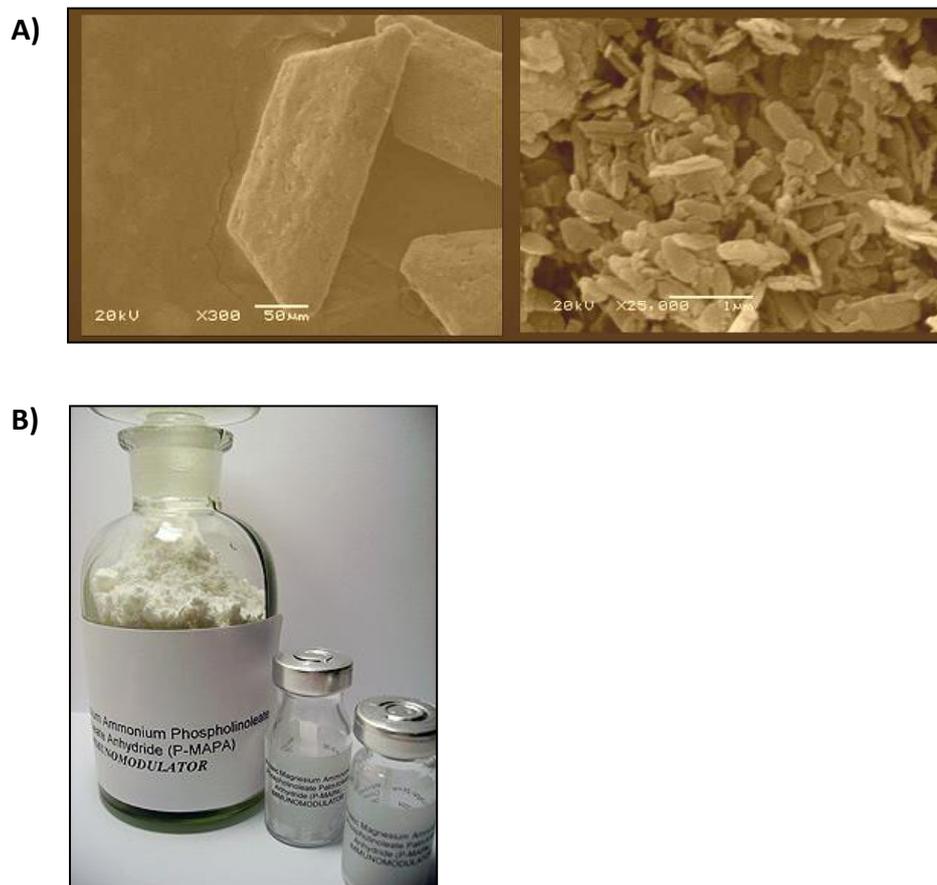
O processo de produção do composto consiste na fermentação do fungo *Aspergillus oryzae* em biorreatores esterilizados, em meio de cultura aquoso de aveia e gelatina, na proporção de 10/1. A mistura é fermentada por 120 horas, sob temperatura de 20 a 35 °C, pH entre 2 a 4, aeração e agitação. Após este período, o meio é filtrado e o composto é extraído com acetado de etila, seguido de precipitação por solução aquosa de carbonato de sódio (20%, pH 11). Como resultado, são formados microcristais (Figura 1) que, em seguida, são lavados com acetato de etila e éter e secados (DURÁN et al., 1990 apud FIORAVANTI, 2010; MELO et al., 2014)¹.

Descrito por Durán e Nunes (1991), este agregado polimérico possui em sua estrutura magnésio (20,1±0,9%), amônio (10±3,3%), fosfato (45,2±2,7%), ácido linoleico (11,6±4,3%) e proteína (0,49±0,07%), com peso molecular totalizando 316 kDa, e a fração

¹DURÁN, N.; NUNES, O. D. S. Characterization of an aggregated polymer from *Penicillium* sp. (PB-7 Strain). **Braz. J. Med. Biol. Res**, v. 23, p. 1289–1302, 1990.

protéica, 16 kDa. Estudos relativos à fração protéica do P-MAPA não foram ainda realizados, não se conhecendo sua função biológica.

Figura 1 – Imagens dos cristais de P-MAPA



A) Cristais fotografados por microscópio eletrônico de varredura. À esquerda, em aumento de 300x, e à direita, em aumento de 25000x. (Fotos: FARMABRAILIS, 2008). **B)** Cristais de P-MAPA em embalagens fornecidas pela Farmabrazilis. (Foto: FARMABRAILIS, 2010).

Devido à sua estrutura complexa, o P-MAPA não é facilmente solubilizado, o que fez com que grupos de estudo optassem por administrar o composto ressuspendido em solução salina (NaCl 0,9%). Apesar desta condição, ensaios *in vitro* e *in vivo* realizados pela Farmabrazilis (2010) não mostraram toxicidade para o composto.

O P-MAPA demonstrou ser eficaz no controle de diferentes tipos de tumores, prolongando o tempo de vida de camundongos BALB/c com tumor ascítico de Ehrlich (EAT), com doses entre 0,5 a 10 mg/kg (JUSTO; DURÁN; QUEIROZ, 2000), de ratos Wistar com tumor de Walker 256, com dose de 0,5 mg/kg e camundongos BALB/c fêmeas

transplantados com plasmocitoma ou carcinoma mamário, com doses de 80 µg/kg (FARMABRASILIS, 2010), e de ratas com câncer de bexiga, com doses de 5 mg/kg, ao longo de 8 semanas (FÁVARO et al., 2012).

Estudos mostraram também a eficácia do P-MAPA na eliminação de patógenos intracelulares, ao evitar a morte e diminuir a carga viral de camundongos infectados com o vírus Punta Toro (DURAN et al., 2009), inibir a infecção por *Plasmodium yoelii* e *Plasmodium chabaudi* em camundongos (DURAN et al., 2008), prolongar a sobrevivência de camundongos infectados com dose letal de *Listeria monocytogenes* (de MELO; JUSTO; de SOUZA QUEIROZ, 2001), reduzir a carga parasitária do protozoário *Leishmania infantum* na pele de cães infectados (SANTIAGO et al., 2013) e reduzir a quantidade de unidades formadoras de colônia (CFU) do bacilo *Mycobacterium tuberculosis* no pulmão de animais tratados (FÁVARO et al., 2012).

Segundo alguns autores, a eficácia do P-MAPA, em prolongar a sobrevivência de animais com câncer ou infectados com patógenos intracelulares, está associada à sua capacidade de induzir a produção e diferenciação de células progenitoras de granulócitos e monócitos pela medula óssea, uma vez que foi detectado aumento do número de CFU-GM (unidades formadoras de colônia de granulócitos e monócitos) em animais com tumores (JUSTO; DURÁN; QUEIROZ, 2000) e infecções por patógenos intracelulares (de MELO; JUSTO; de SOUZA QUEIROZ, 2001), e de células uroteliais progenitoras (*urothelial stem cells*, USCs) em animais com câncer superficial de bexiga (REIS et al., 2011), tratados com 5 mg/kg do composto. Foi também demonstrado que o tratamento com P-MAPA promoveu aumento no número de linfócitos T CD8⁺ em cães com leishmaniose visceral (SANTIAGO et al., 2013).

As características imunoestimulatórias do P-MAPA foram também detectadas em culturas de celulares, tendo estimulado macrófagos a produzirem óxido nítrico (NO) (BROMBERG et al., 2006; MELO et al., 2014) e espécies reativas de oxigênio (ROS) (MELO et al., 2014), o que também poderia ter contribuído para a contenção de infecções e crescimento tumoral.

Tratamentos com o polímero promoveram ainda aumento dos níveis de IFN-γ e IL-2 e diminuição de IL-10 em camundongos pré-tratados por 72 horas antes de serem infectados com *Listeria monocytogenes* (de MELO; JUSTO; de SOUZA QUEIROZ, 2001), em macrófagos de cães infectados com *Leishmania infantum* (SANTIAGO et al., 2013), e em camundongos com tumor ascítico de Ehrlich (EAT), além de ter sido observada restauração da atividade das

células NK e ausência de IL-4 (JUSTO; DURÁN; QUEIROZ, 2003). A produção desse conjunto de citocinas sugere que o P-MAPA promove direcionamento da resposta imune para um perfil do tipo T_h1 (FARMABRASILIS, 2010).

A especialização da resposta imune contra um patógeno é moldada por diferentes citocinas, inicialmente pela ativação de receptores de reconhecimento de patógenos (PRRs), nas células da imunidade inata. Em resposta a microorganismos intracelulares ou antígenos protéicos, macrófagos e células NK desencadeiam a liberação de IL-12, IL-18 e interferon tipo I, a partir da ativação direta de receptores do tipo Toll (TLRs), ou indiretamente, pela secreção de IFN- γ por células NK, que ativam macrófagos e os induzem a produzir IL-12. Ativados, os macrófagos passam a expressar CD40 ligante (CD40L), que ao efetuar ligação com CD40 de um linfócito T CD4⁺ naive, secretam IFN- γ , citocina crucial para a diferenciação do linfócito naive no subconjunto T_h1.

Imunomoduladores são capazes de induzir a produção de citocinas, direta ou indiretamente, incluindo IL-12, IFN- γ , TNF- α e IFN- α (WU et al., 2005), sendo a secreção destes mediadores detectadas em tratamentos com P-MAPA.

Os mecanismos de ação do polímero, no entanto, ainda não estão devidamente esclarecidos. Estudos têm indicado que o P-MAPA atua sobre as células a partir da ativação de receptores do tipo Toll (TLRs) 2 e/ou 4, tendo sido detectada reatividade com estes receptores *in vitro* (FÁVARO et al., 2012). Estudos *in vivo* mostraram que o composto promoveu aumento da expressão de TLR2 e TLR4 por células uroteliais, após o tratamento intravesical de ratas com câncer de bexiga (FÁVARO et al., 2012; REIS et al., 2011), e aumento da expressão de TLR2 em macrófagos de cães infectados com *Leishmania chagasi* (MELO et al., 2014). O composto também induziu fosforilação de IKK e p38 MAPK (*p38 mitogen-activated protein kinase*), indicando duas possíveis vias de sinalização induzidas pela ativação dos TLRs e consequente produção de ROS e NO (MELO et al., 2014). O composto parece também estar envolvido na regulação do gene p53 (REIS et al., 2011).

As propriedades imunoestimulantes, antivirais e antineoplásicas apresentadas pelo P-MAPA o tornam um composto com potencial terapêutico promissor, porém, são necessários estudos mais detalhados da molécula, a fim de se conhecer melhor seus mecanismos de ação sobre o sistema imune. Junto a isso, nada se sabe sobre os efeitos do P-MAPA sobre elementos do compartimento humoral do sistema imune, como o Sistema Complemento, um dos elementos centrais da imunidade inata.

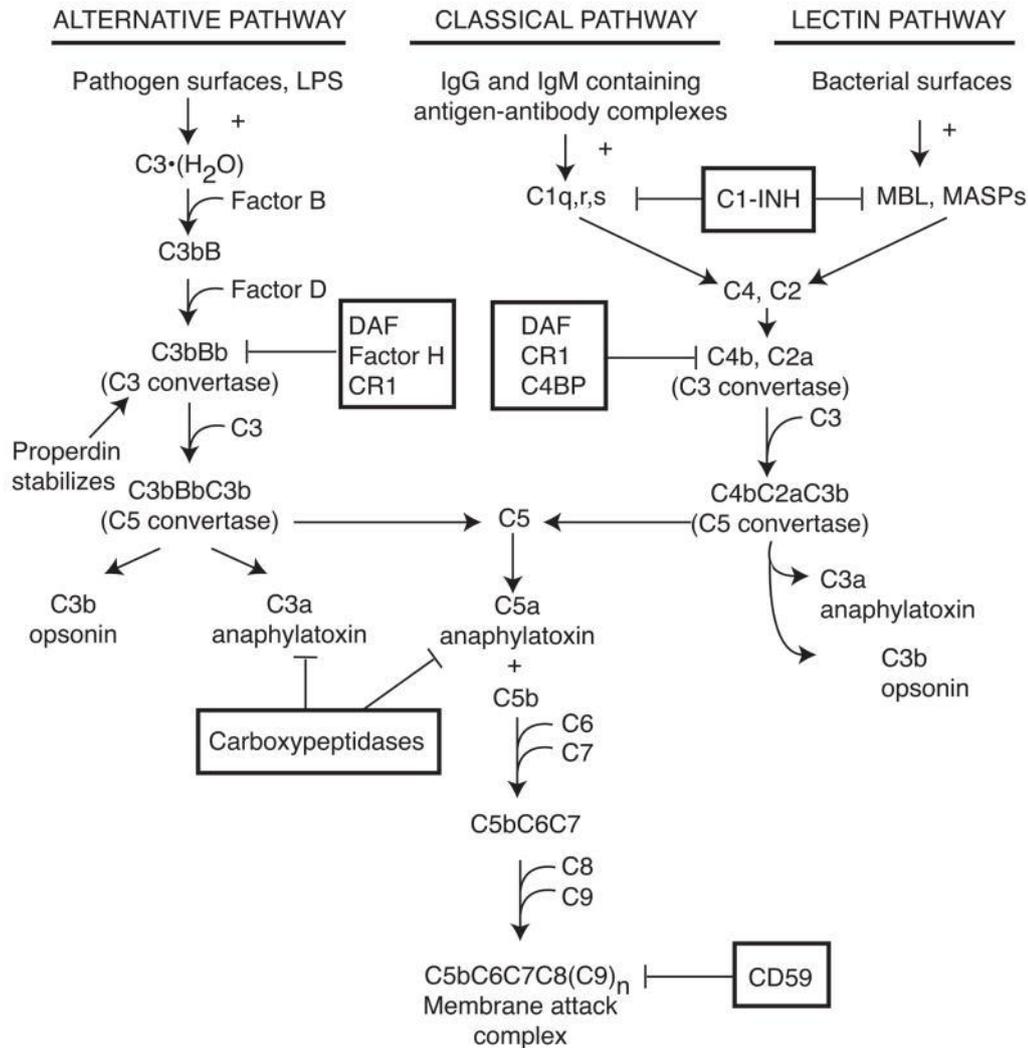
1.2 Crosstalk entre sistema complemento e receptores do tipo Toll

O sistema complemento consiste em um conjunto de mais de 30 proteínas, encontradas no plasma e na superfície de células, cujas principais funções envolvem a destruição e opsonização de microorganismos patogênicos, quimiotaxia de neutrófilos e monócitos, participação na regeneração tecidual (revisado por SARMA; WARD, 2011). Considerado inicialmente apenas como um mecanismo de apoio da imunidade inata, atualmente entende-se o complemento como um dos componentes mais importantes desta, capaz de atuar sobre diversos aspectos da imunidade, e como sendo um mecanismo crucial para a manutenção da homeostase e vigilância do sistema imune.

Embora a ativação deste sistema possa ocorrer por três vias distintas, a via clássica, alternativa ou das lectinas (Figura 2), todas convergem para a formação de uma C3 convertase, que promove a clivagem da proteína C3 e, a partir desta, a produção de fragmentos com propriedades distintas, como a anafilatoxina C3a e a opsonina C3b. A partir da formação de C3 convertases, independente de qual a via de ativação, ocorre amplificação da clivagem de C3 e formação de uma nova convertase, a C5 convertase, responsável por clivar o componente C5 em novos fragmentos de tamanhos e funções distintas: C5a, uma anafilatoxina, e a molécula C5b. Esta última associa-se com os componentes seguintes da cascata do complemento, C6 e C7, e insere-se na membrana celular. Em seguida, os últimos componentes da cascata, C8 e C9, ligam-se ao complexo C5bC6C7, onde ocorre polimerização de várias moléculas de C9 para a formação de um poro lítico na membrana, o complexo de ataque a membrana (MAC) (revisado por RICKLIN et al., 2010; SARMA; WARD, 2011).

As principais anafilatoxinas do complemento, C3a e C5a exercem diversos efeitos sobre neutrófilos, monócitos e macrófagos (MARTIN et al., 1997), como quimiotaxia, aumento da expressão de moléculas de adesão, explosão respiratória e até mesmo ação sobre o endotélio vascular (FERNANDEZ et al., 1978; KLOS et al., 2009; WEBSTER; ZANOLARI; HENSON, 1980). Elas ligam-se a seus receptores específicos, C3aR e C5aR, receptores extracelulares acoplados à proteína G (LANGKABEL; ZWIRNER; OPPERMANN, 1999).

Figura 2 – Esquema das vias de ativação do sistema complemento



Esquema das três vias de ativação do sistema complemento: via alternativa, clássica e das lectinas. Reguladores do complemento estão indicados por caixas de texto (SARMA; WARD, 2011).

Assim como o sistema complemento, os receptores do tipo Toll (TLRs) são peças fundamentais da imunidade inata contra agentes nocivos e, também, no desenvolvimento da imunidade adaptativa. Os TLRs fazem parte da grande família de receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) e são encontrados na superfície e em vesículas intracelulares de células da imunidade inata. Sua função é reconhecer uma variedade de padrões moleculares compartilhados por patógenos, tendo grande importância na discriminação do *self* do não-*self* (revisado por KAWAI; AKIRA, 2011; MORESCO; LAVINE; BEUTLER, 2011).

Tais padrões moleculares compartilhados por patógenos incluem constituintes da parede celular de bactérias, como o lipopolissacarídeo (LPS), lipoproteínas, lipopeptídeos, lipoarabinomanana (LAM), proteínas como a flagelina, RNA viral, e sequências de CpG não metilado em DNA de vírus ou bactérias (JEMATSU; AKIRA, 2008).

O LPS, conhecido também por endotoxina, é um componente da parede externa de bactérias Gram-negativas e pode ser dividido bioquimicamente em regiões lipídica e polissacarídica. O glicolípido central, lipídio A, e o polissacarídeo central são componentes obrigatórios da parede bacteriana e, enquanto os açúcares da cadeia polissacarídea apresentam grande variação e diferem de uma linhagem para outra, o lipídio A está altamente conservado ao longo da evolução e é a porção tóxica da endotoxina (BERCZI; QUINTANAR-STEPHANO; KOVACS, 2006).

O reconhecimento do LPS começa no plasma, pela ligação da endotoxina com a LBP (*lipopolysaccharide binding protein*), uma glicoproteína encontrada no soro em concentrações que variam de 0,5 a 10 µg/mL em humanos (TOBIAS et al., 1992). Ao unirem-se, formam o complexo LPS-LBP que é identificado pelo CD14, uma glicoproteína expressa na superfície de monócitos macrófagos, neutrófilos e células dendríticas. A LBP eleva a interação do CD14 com LPS e facilita a detecção da endotoxina; desse modo, a célula é capaz de detectar níveis extremamente baixos de LPS (MATHISON et al., 1993). O CD14 não possui cauda transmembrana, então age como co-receptor para os receptores TLR4 e TLR2, que reconhecem o LPS diretamente e transmitem os sinais intracelulares para a produção de citocinas (CHOW et al., 1999; YANG et al., 1998). Ainda, o CD14 pode atuar não somente como co-receptor para TLRs na membrana extracelular, mas também para TLRs intracelulares, como TLR7 e TLR9 (BAUMANN et al., 2010). Outra molécula também envolvida no processo de interação com o LPS é o MD-2, um co-receptor presente na superfície de monócitos e macrófagos. MD-2, uma proteína secretada, liga-se ao LPS sem necessidade de LBP, e este, por sua vez, liga-se ao TLR4 na presença de CD14 (CHRISTIANSEN et al., 2012; VIRIYAKOSOL et al., 2001).

A ativação dos TLR2 e TLR4 por LPS promove a associação intracelular dos domínios TIR dos TLRs com MyD88 (*myeloid differentiation primary-response protein 88*), que em seguida recruta IRAK4 (*IL-1R-associated kinase 4*). A cascata de sinalização prossegue até a fosforilação das proteínas IKK e consequente ativação do fator de transcrição NFκB e sua translocação para o núcleo; porém, a sinalização por TLR4 pode ocorrer também de maneira

MyD88 independente, pela ativação de IRF3 (*interferon-regulatory factor*), levando a produção de IFN- β e à ativação tardia de NF κ B (revisado por AKIRA; TAKEDA, 2004). A transcrição de NF κ B, por sua vez, promove a síntese de citocinas inflamatórias TNF- α , IL-6, IL-8 e IL-1 β (AKIRA; TAKEDA, 2004; HEUMANN; ROGER, 2002).

Muitos patógenos podem ativar o sistema complemento e os TLRs, mas a literatura sugere que além de atuarem independentemente, estes elementos interagem entre si, com a finalidade de potencializar a resposta do hospedeiro contra o agente agressor. De acordo com Hajishengallis e Lambris (2010), tais interações, ou *crosstalk*, tem grande valor biológico, na medida em que reforçam a imunidade inata ou regulam a inflamação excessiva, através de interações sinérgicas ou antagônicas, respectivamente. Estudos mostraram que o *crosstalk* promove, em termos gerais, a regulação da expressão de receptores e a regulação da produção de citocinas, induzidas a partir da ativação dos receptores envolvidos.

Através da anafilatoxina C5a e sua ligação com C5aR, o sistema complemento pode regular a produção de citocinas secretadas pela ativação de TLR4 em macrófagos, aumentando a produção de IL-10 (OKAZAKI et al., 2011) ou diminuindo a secreção de IL-12 (HAWLISCH et al., 2005; OKAZAKI et al., 2011), possivelmente pela via de sinalização Erk1/2 (*extracellular signal-regulated kinases*), utilizada pelos TLRs (OKAZAKI et al., 2011). A sinalização do TLR9 pode também ser mediada por produtos do complemento, principalmente por C3a, por meio de C3aR e, em menor extensão, por C5aR. Relação similar ocorre com TLR4, porém é C5aR, e não C3aR, quem mais afeta a sinalização deste receptor (ZHANG et al., 2007). Segundo este último estudo, os sinais gerados por C5a/C3a poderiam regular positivamente a expressão do fator de transcrição NF κ B e amplificar a transdução de sinal feita normalmente por TLR4.

A cooperação entre TLRs e proteínas do complemento, como C3, parece contribuir para a ativação dos mecanismos de destruição de microorganismos e endotoxinas por moléculas microbidas em fagolisossomos de fagócitos. Além de C3, a presença de C5 contribui para a indução da explosão respiratória e destruição de microorganismos, como *E. coli*, em granulócitos (LAPPEGÅRD et al., 2009). No entanto, tais eventos mediados pelo complemento cessam com a inibição do CD14, sugerindo uma interação entre o complemento e este co-receptor (LAPPEGÅRD et al., 2009).

A associação entre CD14 e TLR4 ou TLR2 é fundamental, por exemplo, para indução da síntese de TNF- α (PAPADOPOULOS et al., 2012; PERERA et al., 2001; RABY et al., 2013).

Mas CD14 também opera em associação com proteínas do complemento, como C3 e C5, na promoção da síntese das citocinas TNF- α , IL-6, IL-8 e IL-1 β (BREKKE et al., 2008) e na regulação positiva da expressão de CD11b (BREKKE et al., 2007; MOLLNES et al., 2002), molécula presente na superfície de macrófagos e encontrada em associação com CD18. Juntas, as moléculas formam o complexo CD11b/CD18, denominado CR3 (*complement receptor 3*), uma integrina capaz de mediar a adesão célula-célula e de funcionar como receptor para a opsonina iC3b, um subproduto da clivagem de C3 (ROSS; VĚTVICKA, 1993). Em associação com CD14 e TLR4, CR3 promove a expressão ótima dos genes para IL-12 p35, IL-12 p40 e COX-2 (PERERA et al., 2001).

Os efeitos pró-inflamatórios promovidos por C5a também estão sujeitos à regulação, inclusive pelo próprio sistema: C3aR pode reduzir o recrutamento de neutrófilos, mediado por C5a e C5aR (WU et al., 2013), contribuindo, em parte, para a regulação do processo inflamatório. Porém, C5a é capaz de impedir a internalização de C3aR em monócitos e granulócitos (SETTMACHER et al., 1999). TLR4 também pode modular as respostas a C5a, aumentando-a a partir de sua ativação, ou diminuindo-a, ao modular negativamente C5L2, outro receptor de C5a, reduzindo sua expressão (RABY et al., 2011).

No entanto, o *crosstalk* entre TLRs e elementos do sistema complemento pode ser manipulado por patógenos (HAJISHENGALLIS; LAMBRIS, 2011), e assim, os efeitos sinérgicos das interações, como aumentar a secreção de TNF- α , IL-1 β e IL-6, podem se tornar prejudiciais sob ativação excessiva do complemento (HAJISHENGALLIS; LAMBRIS, 2010). Tais efeitos são observados na sepse, que se caracteriza como um intenso processo inflamatório, resultante de infecção generalizada. Durante a sepse, grandes concentrações de endotoxina induzem ativação excessiva do sistema imune e, em resposta, citocinas inflamatórias podem induzir choque e até mesmo levar à morte (NDUKA; PARRILLO, 2011).

Atualmente, as estratégias terapêuticas para o tratamento de sepse consistem do uso de medicamentos anti-inflamatórios e fatores pró-resolução da inflamação (revisado por BANNENBERG et al., 2005). Mas, como TLR4, TLR2 e o sistema complemento possuem grande importância no estabelecimento e desenvolvimento desta patologia, estudos têm abordado estes receptores e proteínas como alvo de novas estratégias terapêuticas para o tratamento da sepse, testando *in vitro*, o bloqueio de receptores celulares, principalmente CD14 (BREKKE et al., 2007, 2008; CHRISTIANSEN et al., 2012) e receptores de proteínas do

sistema complemento, como CR3 (EGGE, et al., 2013) e C5aR (BREKKE et al., 2007, 2008; MOLLNES et al., 2002).

Apesar das relações entre TLRs e complemento serem alvos potenciais para terapias, o conhecimento das interações entre ambos é relativamente recente, e muitas delas ainda devem ser descobertas (HAJISHENGALLIS; LAMBRIS, 2010).

Experimentalmente, o modelo que vem sendo usado para a avaliação do *crosstalk* entre receptores do tipo Toll e sistema complemento é o de sangue total humano (BREKKE et al., 2007, 2008; MOLLNES et al., 2002). Ele permite investigar as interações do sistema complemento com outras vias inflamatórias utilizando sangue periférico (HAJISHENGALLIS; LAMBRIS, 2010). Estabelecido *in vitro*, o modelo consiste no uso de LPS, principal fator de virulência de bactérias Gram-negativas, para ativar ambos complemento e TLRs, permitindo a análise da resposta inflamatória pela quantificação de citocinas, fatores de crescimento e populações celulares presentes no sangue. Além destes produtos resultantes da ativação celular, este modelo permite analisar a expressão de moléculas relacionadas aos receptores TLR2 e TLR4 e complemento, como o CD14, os receptores de anafilatoxinas, C3aR e C5aR, e o CD11b, todos presente em monócitos, macrófagos e granulócitos.

Baseado nos estudos do *crosstalk* entre TLRs e complemento, o modelo de sangue total oferece a possibilidade de estudar o comportamento imunomodulatório do P-MAPA sob estas interações em ambiente inflamatório, usando material de fácil acesso – sangue periférico humano.

6 CONCLUSÕES

Em conjunto, os resultados deste estudo mostram que o P-MAPA promove uma série de efeitos pró-inflamatórios, relacionadas, principalmente, à sua capacidade de ativar o sistema complemento pelas vias clássica e alternativa. Tais ativações parecem ser importantes para a modulação da expressão de marcadores celulares em leucócitos de sangue periférico humano e produção de citocinas.

A ativação do complemento pelo P-MAPA resultou na geração das anafilatoxinas C5a e C3a, que contribuíram para ativar os receptores celulares estudados, de maneira direta ou indireta. O composto demonstrou capacidade de modular a expressão de marcadores celulares em leucócitos de sangue periférico humano, aumentando a expressão de CD11b e CD14, e reduzindo a expressão de C5aR, TLR4 e TLR2, mas não alterou a expressão de C3aR. O P-MAPA parece agir diretamente sobre TLR2, por meio do ácido linoleico presente em sua composição. Nossos dados sugerem que o composto ativa diretamente o receptor CD11b, sendo que não foi identificado o componente responsável por tal interação.

Os dados de inibição do complemento sugerem que o P-MAPA possa interagir com TLR2 e TLR4 de maneira direta ou indireta, e que por meio dessas interações, o P-MAPA induziria a produção de citocinas. Como resultado da ação do P-MAPA sobre os diferentes receptores, observou-se a produção de TNF- α , IL-8, IL-12(p70), e peróxinitrito, mas não de IL-6, IL-1 β , IL-10, IFN- γ , TGF- β e superóxido. Quando combinado ao LPS, mesmo em diferentes momentos, o P-MAPA pareceu acentuar as modificações na expressão dos receptores, indicando que o composto é capaz de ativar as células com consequente produção de mediadores pró-inflamatórios.

REFERÊNCIAS²

AKIRA, S.; TAKEDA, K. Toll-like receptor signalling. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 4, n. 7, p. 499-511, 2004.

ARMSTRONG, L.; MEDFORD, A. R.; HUNTER, K. J.; UPPINGTON, K. M.; MILLAR, A. B. Differential expression of Toll-like receptor (TLR)-2 and TLR-4 on monocytes in human sepsis. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 136, n. 2, p. 312-319, 2004.

ASSOIAN, R. K.; FLEURDELYS, B. E.; STEVENSON, H. C.; MILLER, P. J.; MADTES, D. K. ; RAINES, E. W.; ROSS, R.; SPORN, M. B. Expression and secretion of type beta transforming growth factor by activated human macrophages. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 84, n. 17, p. 6020–6024, 1987.

BANNENBERG, G. L.; CHIANG, N.; ARIEL, A.; ARITA, M.; TJONAHEN, E.; GOTLINGER, K. H.; HONG, S.; SERHAN, C. N. Molecular circuits of resolution: formation and actions of resolvins and protectins. **J. Immunol.**, v. 174, n. 7, p. 4345-4355, 2005.

BAUMANN, C. L.; ASPALTER, I. M.; SHARIF, O.; PICHLMAIR, A.; BLÜML, S.; GREBIEN, F.; BRUCKNER, M.; PASIERBEK, P.; AUMAYR, K.; PLANYAVSKY, M.; BENNETT, K. L.; COLINGE, J.; KNAPP, S.; SUPERTI-FURGA, G. CD14 is a co-receptor of Toll-like receptors 7 and 9. **J. Exp. Med.**, v. 207, n. 12, p. 2689–2701, 2010.

BERCZI, I.; QUINTANAR-STEPHANO, A.; KOVACS, K. Immunoconversion in acute phase response. In: FAITH, R. E.; MURGO, A. J.; GOOD, R. A.; PLOTNIKOFF, N. P. (Ed.). **Cytokines: stress and immunity**. Boca Raton, FL, EUA: CRC Press, 2006. Chapter 14. p. 215-254.

BEXBORN, F.; ENGBERG, A. E.; SANDHOLM, K.; MOLLNES, T. E.; HONG, J.; EKDAHL, K. N. Hirudin versus heparin for use in whole blood in vitro biocompatibility models. **J. Biomed. Mater. Res. A**, v. 89, n. 4, p. 951-959, 2009.

BIRO, A.; LING, W. L.; ARLAUD, G. J. Complement protein C1q recognizes enzymatically modified low-density lipoprotein through unesterified fatty acids generated by cholesterol esterase. **Biochemistry**, v. 49, n. 10, p. 2167-2176, 2010.

BRAUN, M. C.; LAHEY, E.; KELSALL, B. L. Selective Suppression of IL-12 Production by Chemoattractants. **J. Immunol.**, v. 164, p. 3009-3017, 2000.

BREKKE, O. L.; CHRISTIANSEN, D.; FURE, H.; FUNG, M.; MOLLNES, T.E. The role of complement C3 opsonization, C5a receptor, and CD14 in *E. coli*- induced up-regulation of granulocyte and monocyte CD11b/CD18 (CR3), phagocytosis, and oxidative burst in human whole blood. **J. Leukoc. Biol.**, v. 81, n. 6, p. 1404-1413, 2007.

BREKKE, O.L.; CHRISTIANSEN, D.; FURE, H.; PHARO, A.; FUNG, M.; RIESENFELD, J.; MOLLNES, T.E. Combined inhibition of complement and CD14 abolish *E. coli*-induced cytokine-

²De acordo com:

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

chemokine- and growth factor-synthesis in human whole blood. **Mol. Immunol.**, v. 45, n. 14, p. 3804–3813, 2008.

BROMBERG, N.; JUSTO, G.Z.; SEABRA, A. B.; DURÁN, N. Macrophage nitric oxide (NO) stimulation by an immunomodulator: P-MAPA. **Nitric Oxide**, v. 14, p. A37, 2006.

CAO, H.; GERHOLD, K.; MAYERS, J. R.; WIEST, M. M.; WATKINS, S. M.; HOTAMISLIGIL, G. S. Identification of a lipokine, a lipid hormone linking adipose tissue to systemic metabolism. **Cell**, v. 134, n. 6, p. 933-944, 2008.

CAVAILLON, J. M.; FITTING, C.; HAEFFNER-CAVAILLON, N. Recombinant C5a enhances interleukin 1 and tumor necrosis factor release by lipopolysaccharide-stimulated monocytes and macrophages. **Eur. J. Immunol.**, v. 20, p. 253–257, 1990.

CHOW, J. C.; YOUNG, D. W.; GOLENBOCK, D. T.; CHRIST, W. J.; GUSOVSKY, F. Toll-like receptor-4 mediates lipopolysaccharide-induced signal transduction. **J. Biol. Chem.**, v. 274, n. 16, p. 10689-10692, 1999.

CHRISTIANSEN, D.; BREKKE, O. L.; STENVIK, J.; LAMBRIS, J. D.; ESPEVIK, T.; MOLLNES, T. E. Differential effect of inhibiting MD-2 and CD14 on LPS- versus whole *E. coli* bacteria-induced cytokine responses in human blood. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 946, p. 237-251, 2012.

de MELO, A.; JUSTO, G. Z.; DE SOUZA QUEIROZ, M. L. Stimulation of myelopoiesis in *Listeria monocytogenes*-infected mice by an aggregated polymer isolated from *Aspergillus oryzae*. **Hum. Exp. Toxicol.**, v. 20, p. 38-45, 2001.

DOWLING, J. K.; MCCOY, C. E.; DOYLE, S. L.; BENLARBI, N.; CANAVAN, M.; O'NEILL, L. A.; LOSCHER, C. E. Conjugated linoleic acid suppresses IRF3 activation via modulation of CD14. **J Nutr Biochem**, v. 24, n. 5, p. 920-928, 2013.

DURÁN, M.; MARCATO, P. D.; TASIC, L. J.; DURÁN, N. Nanonization on biotechnological product: Nanocrystals and its polymorphisms. Disponível em: http://www.farmabrasilis.org.br/dbarquivos/Nanonization_82795152.pdf. Acesso em: 17 out. 2013.

DURAN, N. E. C.; NUNES, O. D. Polymeric anhydride of magnesium and proteic ammonium phospholinoleate with antiviral, antineoplastic and immunostimulant properties. Brasil, 1991, US Pat. 5073630.

DURÁN, N.; GOWEN, B. B.; COSTA, F. T. M.; JUSTO, G. Z.; BROCCHI, M.; NUNES, O. S.; NUNES, I. S. A biotechnological product and its potential as a new immunomodulator for treatment of animal phlebovirus infection: Punta Toro virus. **Antiviral Res.**, v. 83, p. 143–147, 2009.

EGGE, K. H.; THORGERSEN, E. B.; LINDSTAD, J. K.; PHARO, A.; LAMBRIS, J.D.; BARRATT-DUE, A.; MOLLNES, T. E. Post-challenge inhibition of C3 and CD14 attenuates *Escherichia coli*-induced inflammation in human whole blood. **Innate Immun.**, v. 20, n. 1, p. 68-77, 2013.

FARMABRASILIS. **P-MAPA Immunomodulator** - General Product Information. 2010.

FARMABRASILIS. **P-MAPA**: Overview, 2008.

FÁVARO, W. J.; NUNES, O. S.; SEIVA, F. R. F.; NUNES, I. S.; WOOLHISER, L. K.; DURÁN, N.; LENAERTS, A. J. Effects of P-MAPA Immunomodulator on Toll-Like Receptors and p53: Potential Therapeutic Strategies for Infectious Diseases and Cancer. **Infect. Agent. Cancer.**, v. 7, n. 1, p. 14, 2012.

FERNANDEZ, H. N.; HENSON, P. M.; OTANI, A.; HUGLI, T. E. Chemotactic response to human C3a and C5a anaphylatoxins. I. Evaluation of C3a and C5a leukotaxis in vitro and under stimulated in vivo conditions. **J. Immunol.**, v. 120, n. 1, p. 109-115, 1978.

FIORAVANTI, C. H. **Fungos, instituições, máquinas e pessoas em negociação**: o percurso do fármaco P-MAPA. 2010. 259 f. Tese (Doutorado em Política Científica e Tecnológica) - Instituto de Geociências, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2010.

FINNEY, D. J. **Probit analysis**. 3rd ed. London: Cambridge University Press, 1971. 333 p.

FOREMAN, K. E.; GLOVSKY, M. M.; WARNER, R. L.; HORVATH, S. J.; WARD, P. A. Comparative effect of C3a and C5a on adhesion molecule expression on neutrophils and endothelial cells. **Inflammation**, v. 20, n. 1, p. 1-9, 1996.

FUREBRING, M.; HAKANSSON, L. D.; VENGE, P.; NILSSON, B.; SJOLIN, J. Expression of the C5a receptor (CD88) on granulocytes and monocytes in patients with severe sepsis. **Crit. Care.**, v. 6, n. 4, p. 363-370, 2002.

GOMES, N. E.; BRUNIALTI, M. K. C.; MENDES, M. E.; FREUDENBERG, M.; GALANOS, C.; SALOMAO, R. Lipopolysaccharide-induced expression of cell surface receptors and cell activation of neutrophils and monocytes in whole human blood. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 43, n. 9, p. 853-859, 2010.

HAJISHENGALLIS, G.; LAMBRIS, J. D. Crosstalk pathways between Toll-like receptors and the complement system. **Trends Immunol.**, v. 31, n. 4, p. 154-163, 2010.

HAJISHENGALLIS, G.; LAMBRIS, J. D. Microbial manipulation of receptor crosstalk in innate immunity. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 3, p. 187-200, 2011.

HAN, C.; JIN, J.; XU, S.; LIU, H.; LI, N.; CAO, X. Integrin CD11b negatively regulates TLR-triggered inflammatory responses by activating Syk and promoting degradation of MyD88 and TRIF via Cbl-b. **Nat. Immunol.**, v. 11, n. 8, p. 734-742, 2010.

HAWLISCH, H.; BELKAID, Y.; BAELDER, R.; HILDEMAN, D.; GERARD, C.; KÖHL, J. C5a negatively regulates Toll-like receptor 4-induced immune responses. **Immunity**, v. 22, n. 4, p. 415-426, 2005.

HEUMANN, D.; ROGER, T. Initial responses to endotoxins and Gram-negative bacteria. **Clin. Chim. Acta.**, v. 323, n. 1-2, p. 59-72, 2002.

HUSEBYE, H.; HALAAS, Ø.; STENMARK, H.; TUNHEIM, G.; SANDANGER, Ø.; BOGEN, B.; BRECH, A.; LATZ, E.; ESPEVIK, T. Endocytic pathways regulate Toll-like receptor 4 signaling and link innate and adaptive immunity. **EMBO. J.**, v. 25, n. 4, p. 683–692, 2006.

JUSTO, G. Z.; DURÁN, N.; QUEIROZ, M. L. S. Myelopoietic response in tumour-bearing mice by an aggregated polymer isolated from *Aspergillus oryzae*. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 388, p. 219–226, 2000.

JUSTO, G. Z.; DURÁN, N.; QUEIROZ, M. L. S. Natural killer cell activity, lymphocyte proliferation and cytokine profile in tumor-bearing mice treated with MAPA, a magnesium aggregated polymer from *Aspergillus oryzae*. **Immunopharmacol. Immunotoxicol.**, v. 25, n. 3, p. 305-319, 2003.

KAWAI, T.; AKIRA, S. Toll-like Receptors and Their Crosstalk with Other Innate Receptors in Infection and Immunity. **Immunity**, v. 34, n. 5, p. 637-650, 2011.

KLOS, A.; TENNER, A. J.; JOHSWICH, K. O.; AGER, R. R.; REIS, E. S.; KOHL, J. The role of the anaphylatoxins in health and disease. **Mol. Immunol.**, v. 46, n. 14, p. 2753-2766, 2009.

KURT-JONES, E. A.; MANDELL L.; WHITNEY, C.; PADGETT, A.; GOSSELIN, K.; NEWBURGER, P. E.; FINBERG, R. W. Role of Toll-like receptor 2 (TLR2) in neutrophil activation: GM-CSF enhances TLR2 expression and TLR2-mediated interleukin 8 responses in neutrophils. **Blood**, v. 100, n. 5, p. 1860-1868, 2002.

LANGKABEL, P.; ZWIRNER, J.; OPPERMAN, M. Ligand-induced phosphorylation of anaphylatoxin receptors C3aR and C5aR is mediated by G protein-coupled receptor kinases. **Eur. J. Immunol.**, v. 9, p. 3035-3046, 1999.

LAPPEGÅRD, K. T.; CHRISTIANSEN, D.; PHARO, A.; THORGERSEN, E. B.; HELLERUD, B. C.; LINDSTAD, J.; NIELSEN, E. W.; BERGSETH, G.; FADNES, D.; ABRAHAMSEN, T. G.; HØIBY, E. A.; SCHEJBEL, L.; GARRED, P.; LAMBRIS, J. D.; HARBOE, M.; MOLLNES, T. E. Human genetic deficiencies reveal the roles of complement in the inflammatory network: lessons from nature. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 106, n. 37, p. 15861-15866, 2009.

LATZ, E.; XIAO, T. S.; STUTZ, A. Activation and regulation of the inflammasomes. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 13, n. 6, p. 397-411, 2013.

LEE, J. Y.; PLAKIDAS, A.; LEE, W. H.; HEIKKINEN, A.; CHANMUGAM, P.; BRAY, G., HWANG, D. H. Differential modulation of Toll-like receptors by fatty acids: preferential inhibition by n-3 polyunsaturated fatty acids. **J. Lipid. Res.**, v. 44, n. 3, p. 479-486, 2003.

LICHTENSTEIN, L. M.; GEWURZ, H.; ADKINSON, N. F., JR.; SHIN, H. S.; MERGENHAGEN, S. E. Interactions of the complement system with endotoxic lipopolysaccharide: the generation of an anaphylatoxin. **Immunology**, v. 16, n. 3, p. 327-336, 1969.

MARTIN, U.; BOCK, D.; ARSENIYEV, L.; TORNETTA, M. A.; AMES, R. S.; BAUTSCH, W.; KOHL, J.; GANSER, A.; KLOS, A. The human C3a receptor is expressed on neutrophils and monocytes, but not on B or T lymphocytes. **J. Exp. Med.**, v. 186, n. 2, p. 199-207, 1997.

MATHISON, J.; WOLFSON, E.; STEINEMANN, S.; TOBIAS, P.; ULEVITCH, R. Lipopolysaccharide (LPS) recognition in macrophages. Participation of LPS-binding protein and CD14 in LPS-induced adaptation in rabbit peritoneal exudate macrophages. **J. Clin. Invest.**, v. 92, n. 4, p. 2053–2059, 1993.

MELO, L. M.; ANDRADE, M. C. M.; LIMA, V. M. F. Increased TLR2 and TLR4 expression in mononuclear cells from dogs naturally infected by *Leishmania sp.* after immunomodulator treatment. In: ANNUAL MEETING OF THE BRAZILIAN SOCIETY OF PROTOZOOLOGY, 26., 2010, Foz do Iguaçu. **Abstracts...** Foz do Iguaçu, 2010. p. 173. Disponível em: <http://itpack31.itarget.com.br/uploads/spz/arquivos/14_imunologia_2010> Acesso em: 4 jul. 2011.

MELO, L. M.; PEROSSO, J.; ALMEIDA, B. F.; SILVA, K. L.; SOMENZARI, M. A.; de LIMA, V. M. Effects of P-MAPA immunomodulator on Toll-like receptor 2, ROS, nitric oxide, MAPKp38 and IKK in PBMC and macrophages from dogs with visceral leishmaniasis. **Int. Immunopharmacol.**, v. 2, p. 373-378, 2014.

MENA, J.; MANOSALVA, C.; RAMIREZ, R.; CHANDIA, L.; CARROZA, D.; LOAIZA, A.; BURGOS, R. A.; HIDALGO, M. A. Linoleic acid increases adhesion, chemotaxis, granule release, intracellular calcium mobilisation, MAPK phosphorylation and gene expression in bovine neutrophils. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 151, n. 3-4, p. 275-284, 2013.

MOLLNES, T.E.; BREKKE, O.L.; FUNG, M.; FURE, H.; CHRISTIANSEN, D.; BERGSETH, G.; VIDEM, V.; LAPPEGÅRD, K.T.; KÖHL, J.; LAMBRIS, J.D. Essential role of the C5a receptor in *E. coli*-induced oxidative burst and phagocytosis revealed by a novel lepirudin-based human whole blood model of inflammation. **Blood**, v. 100, n. 5, p. 1869-1877, 2002.

MORESCO, E. M. Y.; LAVINE, D.; BEUTLER, B. Toll-like receptors. **Current Biology**, v. 21, n. 13, p. R488–R493, 2011.

MORIKIS, D.; ASSA-MUNT, N.; SAHU, A.; LAMBRIS, J.D. Solution structure of Compstatin, a potent complement inhibitor. **Protein. Sci.**, v. 7, n. 3, p. 619-627, 1998.

NAIK, N.; GIANNINI, E.; BROUCHON, L.; BOULAY, F. Internalization and recycling of the C5a anaphylatoxin receptor: evidence that the agonist-mediated internalization is modulated by phosphorylation of the C-terminal domain. **J. Cell. Sci.**, v. 110, p. 2381-2390, 1997.

NDUKA, O.; PARRILLO, J. The pathophysiology of septic shock. **Crit. Care. Clin.**, v. 23, n. 1, p. 41-66, 2011.

NILSSON, B.; LARSSON, R.; HONG, J.; ELGUE, G.; EKDAHL, K. N.; SAHU, A.; LAMBRIS, J. D. Compstatin inhibits complement and cellular activation in whole blood in two models of extracorporeal circulation. **Blood**, v. 92, n. 5, p. 1661-1667, 1998.

OKAZAKI, N.; HAZEKI, K.; IZUMI, T.; NIGORIKAWA, N.; HAZEKI, O. C5a controls TLR-induced IL-10 and IL-12 production independent of phosphoinositide 3-kinase. **J. Biochem.**, v. 149, n. 3, p. 265–274, 2011.

OKUSAWA, S.; YANCEY, K. B.; VAN DER MEER, J. W.; ENDRES, S.; LONNEMANN, G.; HEFTER, K.; FRANK, M. M.; BURKE, J. F.; DINARELLO, C. A.; GELFAND, J. A. C5a stimulates secretion of tumor necrosis factor from human mononuclear cells in vitro. Comparison with secretion of interleukin 1 beta and interleukin 1 alpha. **J. Exp. Med.**, v. 168, p. 443-448, 1988.

PAPADOPOULOS, G.; WEINBERG, E. O.; MASSARI, P.; GIBSON, F. C. 3rd; WETZLER, L. M.; MORGAN, E. F.; GENCO, C. A. Macrophage-specific TLR2 signaling mediates pathogen-induced TNF-dependent inflammatory oral bone loss. **J. Immunol.**, v. 190, n. 3, p. 1148-1157, 2013.

PATWARDHAN, A. M.; SCOTLAND, P. E.; AKOPIAN, A. N.; HARGREAVES, K. M. Activation of TRPV1 in the spinal cord by oxidized linoleic acid metabolites contributes to inflammatory hyperalgesia. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 106, n. 44, p. 18820-18824, 2009.

PERERA, P.Y.; MAYADAS, T.N.; TAKEUCHI, O.; AKIRA, S.; ZAKS-ZILBERMAN, M.; GOYERT, S.M.; VOGEL, S.N. CD11b/CD18 Acts in Concert with CD14 and Toll-Like Receptor (TLR) 4 to Elicit Full Lipopolysaccharide and Taxol-Inducible Gene Expression. **J. Immunol.**, v. 166, p. 574-581, 2001.

RABY, A. C.; HOLST, B.; LE BOUDER, E.; DIAZ, C.; FERRAN, E.; CONRAUX, L.; GUILLEMOT, J. C.; COLES, B.; KIFT-MORGAN, A.; COLMONT, C. S.; SZAKMANY, T.; FERRARA, P.; HALL, J. E.; TOPLEY, N.; LABÉTA, M. O. Targeting the TLR Co-Receptor CD14 with TLR2-Derived Peptides Modulates Immune Responses to Pathogens. **Sci. Transl. Med.**, v. 5, n. 185, 2013.

RABY, A.C.; HOLST, B.; DAVIES, J.; COLMONT, C.; LAUMONNIER, Y.; COLES, B.; SHAH, S.; HALL, J.; TOPLEY, N.; KÖHL, J.; MORGAN, B.P.; LABÉTA, M.O. TLR activation enhances C5a-induced pro-inflammatory responses by negatively modulating the second C5a receptor, C5L2. **Eur. J. Immunol.**, v. 41, n. 9, p. 2741-2752, 2011.

REIS, L.; FERREIRA, U.; BILLIS, A.; CASTELLO, A.; NUNES, I.; DURÁN, N.; CAGNON, V.; FÁVARO, W. Putative cancer stem cells (CSCs) signaling after immunotherapy with bacillus calmette-guerin (BCG) and P-MAPA in the superficial bladder cancer (SBC). **The Journal of Urology**, v. 185, n. 4S, 2011. Supplement.

REMER, K. A.; BRCIC, M.; JUNGI, T. W. Toll-like receptor-4 is involved in eliciting an LPS-induced oxidative burst in neutrophils. **Immunol. Lett.**, v. 85, n. 1, p. 75-80, 2003.

RICKLIN, D.; HAJISHENGALLIS, G.; YANG, K.; LAMBRIS, J. D. Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. **Nat. Immunol.**, v. 9, p. 785-797, 2010.

RIEDEMANN, N. C.; GUO, R. F.; WARD, P. A. A key role of C5a/C5aR activation for the development of sepsis. **J. Leukoc. Biol.**, v. 74, n. 6, p. 966-970, 2003.

RIEDEMANN, N. C.; NEFF, T. A.; GUO, R. F.; BERNACKI, K. D.; LAUDES, I. J.; SARMA, J. V.; LAMBRIS, J. D.; WARD, P. A. Protective effects of IL-6 blockade in sepsis are linked to reduced C5a receptor expression. **J. Immunol.**, v. 170, n. 1, p. 503-507, 2003.

ROSS, G. D.; VĚTVICKA, V. CR3 (CD11b, CD18): a phagocyte and NK cell membrane receptor with multiple ligand specificities and functions. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 92, n. 2, p. 181-184, 1993.

SABROE, I.; JONES, E. C.; USHER, L. R.; WHYTE, M. K.; DOWER, S. K. Toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 in human peripheral blood granulocytes: a critical role for monocytes in leukocyte lipopolysaccharide responses. **J. Immunol.**, v. 168, n. 9, p. 4701-4710, 2002.

SANTIAGO, M. E.; NETO, L. S.; ALEXANDRE, E. C.; MUNARI, D. P.; ANDRADE, M. M.; SOMENZARI, M. A.; CIARLINI, P. C.; de LIMA, V. M. Improvement in clinical signs and cellular immunity of dogs with visceral leishmaniasis using the immunomodulator P-MAPA. **Acta Trop.**, v. 127, n. 3, p. 174-180, 2013.

SARMA, J. V.; WARD, P. A. The complement system. **Cell Tissue Res.**, v. 343, n. 1, p. 227-235, 2011.

SATO, S.; NOMURA, F.; KAWAI, T.; TAKEUCHI, O.; MUHLRADT, P. F.; TAKEDA, K.; AKIRA, S. Synergy and cross-tolerance between toll-like receptor (TLR) 2- and TLR4-mediated signaling pathways. **J. Immunol.**, v. 165, n. 12, p. 7096-7101, 2000.

SCHAAF, B.; LUITJENS, K.; GOLDMANN, T.; VAN BREMEN, T.; SAYK, F.; DODT, C.; DALHOFF, K.; DROEMANN, D. Mortality in human sepsis is associated with downregulation of Toll-like receptor 2 and CD14 expression on blood monocytes. **Diagn. Pathol.**, v. 4, 2009.

SCHINDLER, R.; GELFAND, J. A.; DINARELLO, C. A. Recombinant C5a stimulates transcription rather than translation of interleukin-1 (IL-1) and tumor necrosis factor: translational signal provided by lipopolysaccharide or IL-1 itself. **Blood**, v. 76, p. 1631-1638, 1990.

SENDIDE, K.; REINER, N. E.; LEE, J. S.; BOURGOIN, S.; TALAL, A.; HMAMA, Z. Cross-talk between CD14 and complement receptor 3 promotes phagocytosis of mycobacteria: regulation by phosphatidylinositol 3-kinase and cytohesin-1. **J. Immunol.**, v. 174, n. 7, p. 4210-4219, 2005.

SETTMACHER, B.; BOCK, D.; SAAD, H.; GARTNER, S.; RHEINHEIMER, C.; KOHL, J.; BAUTSCH, W.; KLOS, A. Modulation of C3a activity: internalization of the human C3a receptor and its inhibition by C5a. **J. Immunol.**, v. 162, n. 12, p. 7409-7416, 1999.

SHUTO, T.; KATO, K.; MORI, Y.; VIRIYAKOSOL, S.; OBA, M.; FURUTA, T.; OKIYONEDA, T.; ARIMA, H.; SUICO, M. A.; KAI, H. Membrane-anchored CD14 is required for LPS-induced TLR4

endocytosis in TLR4/MD-2/CD14 overexpressing CHO cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 338, n. 3, p. 1402-1409, 2005.

SLADOWSKI, D.; KINSNER, A.; LANGEZAAL, I.; KAY, S.; COECKE, S. Activation of the complement system as an indicator of pyrogenic reaction to lipopolysaccharide (LPS). **Toxicol. In Vitro**, v. 15, n. 4-5, p. 339-342, 2001.

SMEDEGARD, G.; CUI, L. X.; HUGLI, T. E. Endotoxin-induced shock in the rat. A role for C5a. **Am. J. Pathol.**, v. 135, n. 3, p. 489-497, 1989.

SOKOLOV, A.; HELLERUD, B. C.; LAMBRIS, J. D.; JOHANNESSEN, E. A.; MOLLNES, T. E. Activation of polymorphonuclear leukocytes by candidate biomaterials for an implantable glucose sensor. **J. Diabetes Sci. Technol.**, v. 5, n. 6, p. 1490-1498, 2011.

STEVENS, M. G.; VAN POUCKE, M.; PEELMAN, L. J.; RAINARD, P.; DE SPIEGELEER, B.; ROGIERS, C.; VAN DE WALLE, G. R.; DUCHATEAU, L.; BURVENICH, C. Anaphylatoxin C5a-induced toll-like receptor 4 signaling in bovine neutrophils. **J. Dairy Sci.**, v. 94, n. 1, p. 152-164, 2011.

TOBIAS, P. S.; MATHISON, J.; MINTZ, D.; LEE, J. D.; KRAVCHENKO, V.; KATO, K.; PUGIN, J.; ULEVITCH, R.J. Participation of lipopolysaccharide-binding protein in lipopolysaccharide-dependent macrophage activation. **Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.**, v. 7, n. 3, p. 239-245, 1992.

UEDA, T.; RIEU, P.; BRAYER, J.; ARNAOUT, M. A. Identification of the complement iC3b binding site in the beta 2 integrin CR3 (CD11b/CD18). **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 91, n. 22, p. 10680-10684, 1994.

UEMATSU, S.; AKIRA, S. Toll-Like receptors (TLRs) and their ligands. **Handb. Exp. Pharmacol.**, v. 183, p. 1-20, 2008.

UNNEWEHR, H.; RITTIRSCH, D.; SARMA, J. V.; ZETOUNE, F.; FLIERL, M. A.; PERL, M.; DENK, S.; WEISS, M.; SCHNEIDER, M. E.; MONK, P. N.; NEFF, T.; MIHLAN, M.; BARTH, H.; GEBHARD, F.; WARD, P. A.; HUBER-LANG, M. Changes and regulation of the C5a receptor on neutrophils during septic shock in humans. **J. Immunol.**, v. 190, n. 8, p. 4215-4225, 2013.

VAN EPPS, D. E.; SIMPSON, S.; BENDER, J. G.; CHENOWETH, D. E. Regulation of C5a and formyl peptide receptor expression on human polymorphonuclear leukocytes. **J. Immunol.**, v. 144, n. 3, p. 1062-1068, 1990.

VIRIYAKOSOL, S.; TOBIAS, P.S.; KITCHENS, R.L.; KIRKLAND, T.N. MD-2 binds to bacterial lipopolysaccharide. **J. Biol. Chem.**, v. 276, p. 38044-38051, 2001.

WANG, L.; HAN, G.; WANG, R.; CHEN, G.; XU, R.; XIAO, H.; LI, X.; GENG, S.; LI, Y.; LI, X.; WANG, J.; FENG, J.; RIEDEMANN, N. C.; GUO, R.; SHEN, B.; LI, Y. Regulation of IL-8 production by complement-activated product, C5a, in vitro and in vivo during sepsis. **Clin. Immunol.**, v. 137, n. 1, p. 157-165, 2010.

WANG, M.; KRAUSS, J. L.; DOMON, H.; HOSUR, K. B.; LIANG, S.; MAGOTTI, P.; TRIANTAFILOU, M.; TRIANTAFILOU, K.; LAMBRIS, J. D.; HAJISHENGALLIS, G. Microbial hijacking of complement-toll-like receptor crosstalk. **Sci. Signal.**, v. 3, n. 109, p. ra11, 2010.

WARD, P. A. Functions of C5a receptors. **J. Mol. Med. (Berl.)**, v. 87, n. 4, p. 375-378, 2009.

WEAVER, D. J. Jr; REIS, E. S.; PANDEY, M. K.; KÖHL, G.; HARRIS, N.; GERARD, C.; KÖHL, J. C5a receptor-deficient dendritic cells promote induction of Treg and Th17 cells. **Eur. J. Immunol.**, v. 40, n. 3, p. 710-721, 2010.

WEBSTER, R. O.; ZANOLARI, B.; HENSON, P. M. Neutrophil chemotaxis in response to surface-bound C5a. **Exp. Cell. Res.**, v. 129, n. 1, p. 55-62, 1980.

WITTMANN, M.; ZWIRNER, J.; LARSSON, V.-A.; KIRCHHOFF, K.; BEGEMANN, G., KAPP, A.; GÖTZE, O., WERFEL, T. C5a Suppresses the Production of IL-12 by IFN- γ -Primed and Lipopolysaccharide-Challenged Human Monocytes. **J. Immunol.**, v. 162, p. 6763-6769, 1999.

WU, J. J.; PANG, K. R.; HUANG, D. B.; TYRING, S. K. Advances in antiviral therapy. **Dermatologic Clinics**, v. 23, p. 313–322, 2005.

WU, M. C.; BRENNAN, F. H.; LYNCH, J. P.; MANTOVANI, S.; PHIPPS, S.; WETSEL, R. A.; RUITENBERG, M. J.; TAYLOR, S. M.; WOODRUFF, T. M. The receptor for complement component C3a mediates protection from intestinal ischemia-reperfusion injuries by inhibiting neutrophil mobilization. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 110, n. 23, p. 9439-9444, 2013.

YANG, R. B.; MARK, M. R.; GRAY, A.; HUANG, A.; XIE, M. H.; ZHANG, M.; GODDARD, A.; WOOD, W. I.; GURNEY, A. L.; GODOWSKI, P. J. Toll-like receptor-2 mediates lipopolysaccharide-induced cellular signalling. **Nature**, v. 395, n. 6699, p. 84-88, 1998.

ZAAL, A.; LISSENBERG-THUNNISSEN, S. N.; van SCHIJNDEL, G.; WOUTERS, D.; van HAM, S. M.; ten BRINKE, A. Crosstalk between Toll like receptors and C5a receptor in human monocyte derived DCs suppress inflammatory cytokine production. **Immunobiology**, v. 218, n. 2, p. 175-180, 2013.

ZHANG, X.; KIMURA, Y.; FANG, C.; ZHOU, L.; SFYROERA, G.; LAMBRIS, J. D.; WETSEL, R. A.; MIWA, T.; SONG, W. C. Regulation of Toll-like receptor-mediated inflammatory response by complement *in vivo*. **Blood**, v. 110, n. 1, p. 228-236, 2007.