

EDSON KIYOTAKA ISHIZUKA

**MODULAÇÃO DA FUNÇÃO DE MACRÓFAGOS PELA NATTECTINA: UMA
LECTINA TIPO C DO VENENO DE *Thalassophryne nattereri***

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

Área de concentração: Imunologia

Orientadora: Dra. Carla Lima da Silva

Versão Original

São Paulo
2011

RESUMO

ISHIZUKA, E. K. **Modulação da função de macrófagos pela Nattectina:** uma lectina tipo C do veneno de *Thalassophryne nattereri*. 2011. 78 f. Dissertação (Mestrado em Imunologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

A Nattectina é uma toxina isolada do veneno de *Thalassophryne nattereri* com massa molecular de 15 kDa que possui homologia com lectinas do tipo C. O objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade da Nattectina de ativar as funções de macrófagos e a influência de citocinas Th1/Th2 na ativação polarizada de macrófagos induzida por essa toxina. Nossos resultados mostram que a Nattectina foi capaz de induzir a ativação de macrófagos F4/80^{pos}CD11b^{pos}CD14^{pos}Ly6C^{low} derivados da medula óssea mediante o aumento na expressão de moléculas co-estimuladoras (CD40, CD80, CD86) e MHC de classe II, na expressão de integrinas e da capacidade endocítica. Verificou-se uma dependência positiva da ligação da Nattectina a estruturas glicosiladas expressas nos macrófagos para a indução da expressão de MHC de classe II, da integrina CD49a e para o aumento da capacidade endocítica. A expressão de moléculas co-estimuladoras nos macrófagos foi dependente das vias de sinalização MAPK p38, e principalmente PI3K, enquanto a capacidade endocítica e a produção de MMP-9 foi positivamente regulada pela via ERK1/2. Verificamos ainda que alterações fenotípicas em macrófagos peritoneais e derivados da medula óssea induzida pela Nattectina em camundongos C57BL/6 são consistentes com a ativação clássica M1 dependente das citocinas IL-12 e IFN- γ , e regulada negativamente por IL-4, IL-10 e IL-13. Por fim, demonstramos uma ação coadjuvante da citocina IL-4 com IFN- γ na mobilização de SPMs (*Small Peritoneal Macrophages*) na cavidade peritoneal e na ativação (expressão de MHC de classe II e CCR7) de macrófagos derivados de medula óssea. Dessa forma, a Nattectina pode ser considerada um importante agente imunomodulador, capaz de modular as funções de macrófagos, útil no desenvolvimento de vacinas e com aplicações terapêuticas.

Palavras-chave: Nattectina. Lectina tipo C. Macrófagos. *Thalassophryne nattereri*.

ABSTRACT

ISHIZUKA, E. K. **Modulation of macrophage function by Nattectin:** a C-type lectin from *Thalassophryne nattereri* fish venom. 2011. 78 p. Masters thesis (Immunology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

Nattectin is a 15 kDa toxin isolated from *Thalassophryne nattereri* fish venom that has homology with C-type lectin. The aim of this study was to evaluate the Nattectin ability to activate macrophage functions and the influence of Th1/Th2 cytokines in polarized activation of macrophages induced by Nattectin. Our results show that Nattectin was able to induce F4/80^{pos}CD11b^{pos}CD14^{pos}Ly6C^{low} macrophage derived from bone marrow activation through CD40, CD80 and CD86 costimulatory molecules and MHC class II upregulation, and also an increase in integrins expression and endocytic capacity. It was found a positive dependence of Nattectin binding to glycosylated structures expressed in macrophages for induction of MHC class II, CD49a integrin expression and an increase in endocytic capacity. The expression of costimulatory molecules in macrophages was dependent the p38 MAPK signaling pathway and primarily PI3K signaling, while endocytic capacity and MMP-9 production was positively regulated through ERK1/2 signaling. We also demonstrated that phenotypic modifications in peritoneal and bone marrow-derived macrophages induced by Nattectin in C57BL/6 mice are consistent with classical (M1) activation of macrophages dependent on IL-12 and IFN- γ cytokines, and negatively regulated by IL-4, IL-10 and IL-13. Finally, it was demonstrated an adjuvant role of IL-4 with IFN- γ in mobilization of SPMs (Small Peritoneal Macrophages) to peritoneal cavity and also in activation (expression of MHC class II and CCR7) of bone marrow-derived macrophages. Thus, Nattectin can be considered an important immunomodulatory agent able to modulate macrophage functions, useful in vaccines development and with therapeutic applications.

Key words: Nattectin. C-type lectin. Macrophages. *Thalassophryne nattereri*.

INTRODUÇÃO

A inflamação é uma resposta homeostática, dinâmica e protetora que o hospedeiro lança mão contra as diversas agressões a que é submetido. Dentre as diversas células atuantes neste processo, os macrófagos desempenham um importante papel, incluindo a eliminação de antígenos, a regulação da regeneração e a iniciação da resposta imune adaptativa (SIMON e GREEN, 2005; FUJIWARA e KOBAYASHI, 2005). Estas células iniciam o processo inflamatório pela secreção de citocinas pró-inflamatórias ou “de alerta” (IL-1, TNF- α e IL-6) que desencadeiam uma série de reações humorais e celulares, tanto no sítio da inflamação quanto a distância. A ativação das células do estroma (como fibroblastos e células endoteliais) pelas citocinas IL-1 e TNF- α provoca a secreção de quimiocinas, principalmente IL-8 (ou KC em camundongos) e MCP-1, que são quimiotáticas para neutrófilos e células mononucleares, respectivamente (CAMPBELL e BUTCHER, 2000; HANADA e YOSHIMURA, 2002).

Macrófagos pertencem ao sistema fagocítico mononuclear, que representa um subgrupo de leucócitos originalmente descrito como uma população de células mielóides derivadas da medula óssea, e são células da imunidade inata com funções bem estabelecidas na resposta primária a patógenos, mas também na homeostase do tecido, coordenação da resposta imune adaptativa, inflamação, resolução e reparo. Essas células reconhecem sinais de perigo através de receptores capazes de induzir programas de ativação especializados (GEISSMANN et al., 2010; MARTINEZ; HELMING; GORDON, 2009).

Os macrófagos têm sido considerados por muito tempo importantes células imunes efetoras, visto que Élie Metchnikoff, que ganhou o prêmio Nobel 100 anos atrás por sua descrição de fagocitose, propôs que a chave da imunidade era “estimular a fagocitose” (NATHAN, 2008). Desde esta descoberta, os imunologistas se ocuparam com o conceito dos macrófagos como células imunes efetoras e com a compreensão de como estas células participam na defesa do hospedeiro. Entretanto, por focar somente nas funções imunes dos macrófagos, ignoraram seu papel vital na homeostasia, que é independente de sua participação em respostas imunes.

Macrófagos detectam os sinais de perigo exógenos e endógenos que estão em restos de células necróticas através de receptores *Toll-like* (TLR); receptores *Nod-like* (NLR) e receptores *RIG-I-like* (RLR) (KONO e ROCK, 2008; PARK et al., 2004), os quais sinalizam muitas vezes através de MyD88 (CHEN et al., 2007). Esta função faz dos macrófagos sensores primários de perigo no hospedeiro. A fagocitose de componentes por macrófagos

conduz a mudanças dramáticas na sua fisiologia, incluindo alterações na expressão das proteínas de superfície e na produção de citocinas e de mediadores pró-inflamatórios. As alterações na expressão de proteínas de superfície nos macrófagos em resposta a estes estímulos podem ser usadas como marcadores fisiológicos únicos destas células alteradas.

Uma característica importante dos macrófagos refere-se a sua notável plasticidade, o que permite que essas células respondam eficientemente aos sinais ambientais e mudem seu fenótipo; e sua fisiologia pode ser marcadamente alterada pelas respostas imunes inata e adaptativa. Em humanos, a distinta expressão de CD14 e CD16 permite a diferenciação de macrófagos em dois subtipos: um do tipo clássico $CD14^{high}CD16^{neg}$ e uma população minoritária, não-clássica $CD14^{low}CD16^{pos}$ (PASSLICK; FLIEGER; ZIEGLER-HEITBROCK, 1989; ZIEGLER-HEITBROCK et al., 1993). Em camundongos, duas populações de monócitos em processo final de maturação contínua foram identificadas e denominadas como inflamatórias ou residentes baseadas primeiramente na quantidade de tempo que gastam no sangue antes de migrar para os tecidos para se tornarem macrófagos (GEISSMANN; JUNG; LITTMAN, 2003). Estas populações de monócitos estão representadas aproximadamente igual no sangue dos camundongos (PASSLICK et al., 1989) e podem ser diferenciadas baseadas na expressão de marcadores de superfície celular. Os monócitos inflamatórios são definidos como $CCR2^{pos}$ (CC-chemokine receptor 2), $CX3CR1^{low}$ (CX3C-chemokine receptor 1) e $GR1^{pos}$ (também conhecido como Ly6), enquanto os monócitos residentes são definidos como $CCR2^{neg}CX3CR1^{high}GR1^{neg}$ (GEISSMANN et al., 2003).

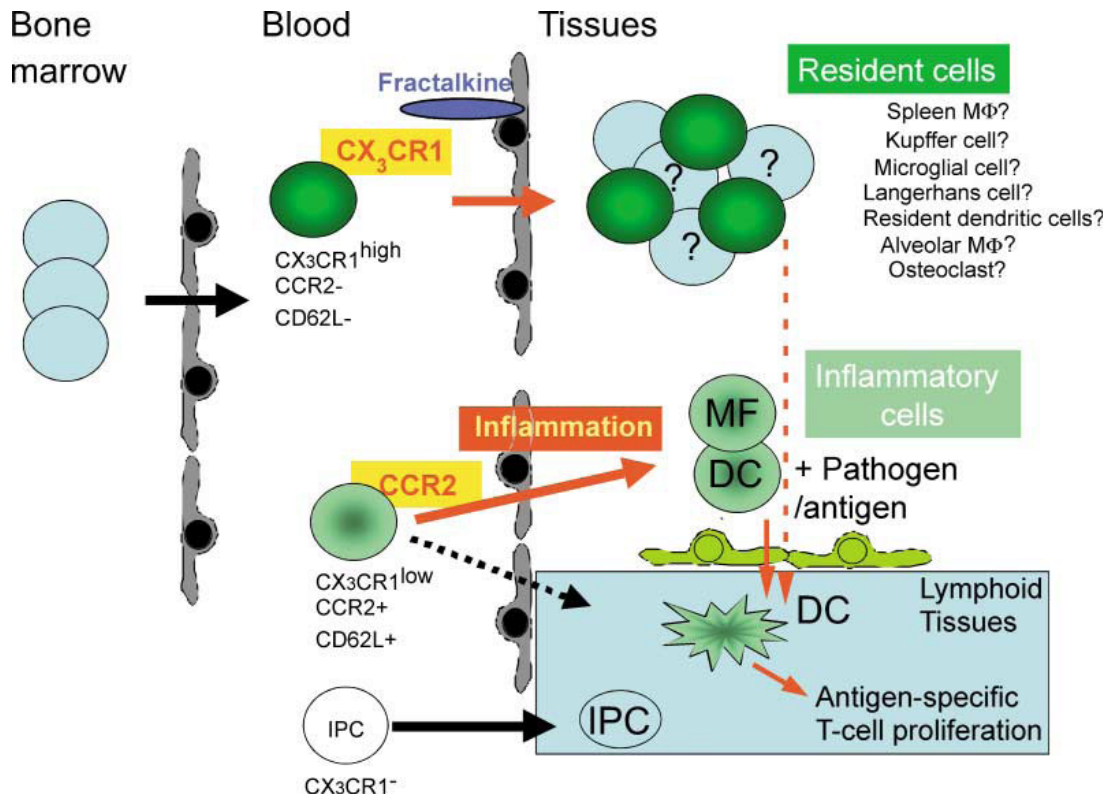


Figura 1- Modelo para a dicotomia funcional dos subtipos de macrófagos.

Fonte - Geissmann et al. (2003)

Em um esforço para equiparar-se à literatura dos linfócitos T, os macrófagos foram classificados, de maneira linear, como macrófagos M1 (classicamente ativados) em um extremo e macrófagos M2 (alternativamente ativados) em outro. Os macrófagos M1 sofrem ativação clássica induzida por $\text{IFN-}\gamma$, que desencadeia uma potente resposta pró-inflamatória necessária para matar patógenos intracelulares, enquanto os macrófagos M2 sofrem ativação alternativa induzida por IL-4 e IL-13, que desencadeiam um fenótipo importante para a resposta imune aos parasitas (MARTINEZ et al., 2009; MOSSER e EDWARDS, 2008). Mas de maneira mais global, envolvendo as funções na homeostasia e na inflamação, os macrófagos podem ser classificados como: macrófagos de defesa, de cicatrização e reguladores. Esta classificação ajuda também a ilustrar como os macrófagos podem evoluir para exibir as características que são compartilhadas por mais de uma população de macrófagos.

Os macrófagos de defesa são aqueles classicamente ativados que são produzidos durante respostas imunes mediadas por células. Na caracterização original de macrófagos classicamente ativados, a combinação de dois sinais, interferon- γ ($\text{IFN-}\gamma$) e o fator de necrose tumoral (TNF) gera uma população de macrófagos que tem aumentada capacidade

microbicida ou tumoricida e secreta níveis elevados de citocinas e de mediadores pró-inflamatórios (MACKANESS, 1977; O'SHEA e MURRAY, 2008).

Os macrófagos da cicatrização podem se desenvolver em resposta aos sinais inatos ou adaptativos. Um dos primeiros sinais inatos a ser liberado durante a injúria do tecido é a citocina IL-4 (LOKE et al., 2007). Basófilos e mastócitos são fontes recentes importantes da produção inata de IL-4, embora outros granulócitos possam também contribuir (BRANDT et al., 2000). IL-4 estimula a atividade da arginase nos macrófagos, permitindo que convertam a arginina em ornitina, um precursor das poliaminas e do colágeno, contribuindo desse modo à produção de matriz extracelular (KREIDER et al., 2007). Os macrófagos da cicatrização podem também ser prejudiciais ao hospedeiro quando sua atividade de produção de matriz é desregulada, similarmente à desregulação da atividade de macrófagos classicamente ativados na auto-imunidade.

Similarmente às duas populações de macrófagos descritos acima, os macrófagos reguladores também estão presentes em ambas as respostas imunes. Embora as respostas de estresse não sejam consideradas tipicamente parte da imunidade inata, o eixo (HPA) *hypothalamic-pituitary-adrenal* pode exercer efeitos marcantes em macrófagos. Glucocorticóides são liberados por células adrenais em resposta ao estresse e podem inibir a defesa do hospedeiro dependente de macrófagos e suas funções inflamatórias inibindo a transcrição de genes de citocinas pró-inflamatórias e diminuindo a estabilidade do RNA mensageiro (STERNBERG, 2006), gerando uma população de macrófagos reguladores. Os macrófagos reguladores podem também aparecer durante os estágios mais tardios das respostas imunes adaptativas com papel de limitar a inflamação crônica (MOSSER, 2003). Há maneiras diferentes de gerar macrófagos reguladores, porém um único mecanismo molecular que medeia este processo de diferenciação fenotípica ainda não foi identificado, embora a sinalização via MAP quinases (*extracellular-signal-regulated kinase* - ERK) apareça como um potencial candidato (LUCAS et al., 2005). Ao contrário dos macrófagos de cicatrização, estes macrófagos reguladores não contribuem para a produção de matriz extracelular, e muitas destas células reguladoras expressam níveis elevados de moléculas co-estimuladoras (CD80 e CD86) e podem conseqüentemente apresentar antígenos a linfócitos T (EDWARDS et al., 2006).

Em resumo, os sinais oriundos da resposta inata ou adaptativa podem influenciar a fisiologia de macrófagos, e estas alterações permitem que os macrófagos participem em processos homeostáticos, tais como remodelamento tecidual e fechamento de feridas e

também na defesa do hospedeiro. A resposta dos macrófagos aos sinais de perigo endógenos é somente um exemplo de quantos estímulos diferentes provocam a ativação dos macrófagos nos tecidos e por isso pesquisas vêm sendo realizadas com imunoterápicos indutores ou supressores capazes de estimular macrófagos, modulando suas funções.

Para que o macrófago exerça suas atividades, é necessário que ele migre para outros sítios através da matriz extracelular, que é uma rede intrincada de macromoléculas que ocupam o espaço extracelular nos tecidos. Além de estabilizar a estrutura física dos tecidos, a matriz influencia o desenvolvimento, a migração, a proliferação, as funções e a sobrevivência das células (VU e WERB, 2000). As moléculas que constituem a matriz extracelular são geradas localmente por diferentes tipos celulares, particularmente por uma família de células denominados fibroblastos. Três classes principais de macromoléculas constituem a matriz: cadeias polissacarídicas de glicosaminoglicanos (GAGs) unidas covalentemente a proteínas formando os PROTEOGLICANOS (agrim, perlecan, sindecam, glicam, CD44 e betaglicam), as PROTEÍNAS FIBROSAS como a família dos colágenos e elastina, e as GLICOPROTEÍNAS como, por exemplo, a laminina e a fibronectina (ORLANDO e CHERESH, 1991; MEREDITH; FAZELI; SCHWARTZ, 1993).

Para a progressão celular pela matriz extracelular intersticial, é necessária uma série coordenada de etapas que incluem a adesão/liberação e a degradação focal da matriz (BIANCHI et al., 1997; LAUFFENBURGER et al., 1996; BASBAUM et al., 1996). As integrinas de leucócitos têm um papel importante nas interações com as proteínas da matriz extracelular durante o processo de transmigração (SHIMIZU e SHAW, 1991; MOSTAFAVIPOUR et al., 2003; SCHWARTZ e GINSBERG, 2002). As integrinas são glicoproteínas transmembrana, compostas por dois heterodímeros não-covalentes designados subunidades α e β , cada uma com grande domínio extracelular e pequena, porém importante, extensão citoplasmática. Existem 15 cadeias α e 8 cadeias β que já foram clonadas e seqüenciadas. Os leucócitos expressam 13 diferentes integrinas as quais medeiam a ligação com as células endoteliais. As mais importantes para adesão endotelial são as integrinas β 1 (CD29), β 2 (CD18) e β 7. A subfamília β 2 é expressa em todos os leucócitos e consiste em uma subunidade β 2 ligada a uma das quatro subunidades α : CD11a (aL), CD11b (aM), CD11c (aX) ou CD11d (aD). Os linfócitos produzem primariamente CD11a/CD18 (LFA-1 ou *lymphocyte function associated antigen-1*), enquanto os eosinófilos, neutrófilos e monócitos produzem todas as quatro β 2 integrinas (IMHOF e AURRAND-LIONS, 2004).

Após a marginação dos leucócitos ao longo do endotélio vascular, as integrinas são ativadas por pelo menos uma de uma variedade de quimiocinas e citocinas quimiotáticas associadas à superfície endotelial, e a firme adesão ao endotélio ocorre pela ligação de integrinas $\beta 1$ e $\beta 2$ expressas nos leucócitos com os vários membros da superfamília das imunoglobulinas expressas no endotélio (ICAM-1, ICAM-2 e VCAM-1).

Durante a adesão firme, a combinação da sinalização via integrinas e exposição a quimiocinas imobilizadas na porção apical das células endoteliais induz uma alteração marcante na morfologia dos leucócitos. Os leucócitos estendem de frente para trás uma extensão apical larga (*lamellipodium*) rica em filamentos F-actina, a qual constitui a extremidade principal de movimento celular. Algumas células do sistema imune como as células dendríticas (*dendritic cells*, DCs) e os macrófagos apresentam estruturas adesivas específicas conhecidas como podossomos. Estas células apresentam-se como um exemplo das poucas células do sistema imune que formam fibras de estresse ou adesão focal — uma característica que pode explicar a sua alta mobilidade dependente de integrina nos substratos, diferentemente das células aderentes como fibroblastos e células endoteliais. Enquanto a formação da extensão *lamellipodium* é regulada pelos processos de polimerização da actina e contração da actomiosina, a desadesão parece ser dependente da contração e da ação de metaloproteinases de matriz (DIAKONOVA; BOKOCH; SWANSON, 2002; VICENTE-MANZANARES e SÁNCHEZ-MADRID, 2004).

Sabendo do papel das integrinas na adesão focal dos leucócitos, vários estudos têm sido realizados para o entendimento dos mecanismos envolvidos na degradação focal da matriz extracelular durante a transmigração dos leucócitos. Recentes trabalhos sugerem um importante papel para as metaloproteinases de matriz (*matrix metalloproteinases*, MMPs) na degradação da matriz extracelular (STERNLICHT et al., 2000; PARKS; WILSON; LÓPEZ-BOADO, 2004; VU e WERB, 2000). MMPs são uma família de endopeptidases dependentes de zinco capazes de degradar todos os componentes da matriz extracelular e que têm sido classificadas de acordo com a especificidade pelo substrato em gelatinases, estromelinas, colagenases (BIRKEDAL-HANSEN, 1995) e metaloproteinase transmembrana (MT-MMP), expressa na superfície de células tumorais invasivas ou em células estromais (SATO et al., 1994). A degradação controlada da matriz extracelular é uma característica importante em uma variedade de processos biológicos, tais como o desenvolvimento do embrião e o remodelamento e reparo tecidual. O reparo de feridas inicia-se com a agregação de plaquetas, formação de coágulos de fibrina e liberação de fatores de crescimento a partir de vias de

coagulação ativadas, células danificadas, plaquetas e componentes da matriz extracelular, seguido pela migração de células inflamatórias para o local da ferida (RAVANTI e KAHARI, 2000). Metaloproteinases são sintetizadas na forma inativa com um pró-peptídeo aminoterminal que deve ser clivado para tornarem-se ativas (GOETZL; BANDA; LEPPERT, 1996; BIRKEDAL-HANSEN, 1995). Entre estas, MMP-2 e MMP-9 são consideradas responsáveis pela degradação de laminina, colágeno tipo IV, este último o maior constituinte da membrana basal (PARKS et al., 2004).

MMP-2 é expressa constitutivamente em várias células, enquanto MMP-9 é induzida principalmente por estímulos inflamatórios como TNF- α , endotoxinas e IL-1, por várias células como também por macrófagos. Outros estudos sugerem que MMP-9 é um forte candidato para a indução/ativação das funções de macrófagos, estas relacionadas com a resposta inflamatória (PARKS et al., 2004). Além disso, MMP-9 está associada aos processos de re-epitelização e eventos reparadores agudos (VU e WERB, 1998), enquanto MMP-2 é importante durante a fase de remodelamento prolongado (AGREN, 1994; STRICKLIN; LI; NANNEY, 1994). As metaloproteinases afetam a sobrevivência e a proliferação ou a morte celular, efeitos regulados por sinais gerados em eventos adesivos específicos. Estas diferenças de efeitos das MMPs refletem diferenças nos substratos das enzimas envolvidos em cada resposta. Assim, a regulação das funções inflamatórias leucocitárias pela interação com os componentes da matriz extracelular pode fornecer informações importantes a respeito de como a resposta inflamatória será resolvida.

Considerando, portanto, que os macrófagos são células importantes no sistema imune tendo em vista a sua participação em diversos processos como inflamação, eliminação de antígenos e regeneração, é importante modular as suas funções através do uso de substâncias como citocinas, agonistas de receptores do tipo *Toll*, galectinas e lectinas derivadas de plantas e animais como, por exemplo, peixes.

No Brasil, o peixe *Thalassophryne nattereri* destaca-se entre os animais peçonhentos de importância médica pelo número de acidentes que provoca, principalmente nas regiões Norte e Nordeste (ALMEIDA et al., 1989; AUTO, 1992; FONSECA e LOPES-FERREIRA, 2000; HADDAD JR et al., 2003; FACÓ et al., 2005). *T. nattereri* é considerado um peixe peçonhento por apresentar glândulas cutâneas especializadas na produção de veneno conectadas a ductos excretores canaliculados (espinhos) localizados em cada um dos lados das regiões dorsal e lateral (FRÓES, 1933a, b, c). Os acidentes provocados pelo *T. nattereri* ocorrem principalmente nas regiões plantar ou palmar das vítimas após a introdução dos

espinhos canaliculados na pele com conseqüente ruptura das glândulas. As principais características do quadro clínico em humanos são dor e edema intensos e duradouros desencadeados imediatamente após o acidente. Em conseqüência, pode haver o desenvolvimento de necrose, que em casos graves acomete todo o membro, levando a seqüelas irreversíveis como a hipertrofia muscular e a perda da função (FONSECA e LOPES-FERREIRA, 2000).

O veneno de *T. nattereri* e suas toxinas vêm sendo amplamente estudados quanto a diferentes aspectos como: os efeitos tóxicos causados nas vítimas humanas (FONSECA e LOPES-FERREIRA, 2000) e em modelos experimentais (LOPES-FERREIRA et al., 1998, 2001, 2002; FACÓ et al., 2003), os aspectos bioquímicos e farmacológicos (LOPES-FERREIRA et al., 2004; MAGALHÃES et al., 2005, 2006), e a capacidade de indução de anticorpos neutralizantes para os principais efeitos tóxicos em camundongos e os mecanismos imunológicos envolvidos nesta resposta (LOPES-FERREIRA et al., 2000; LIMA et al., 2003; GRUND et al., 2006; PIRAN-SOARES et al., 2007). O trabalho de Lima et al. (2003) demonstra que o veneno é capaz de induzir uma resposta inflamatória localizada na pata de camundongos, rica em citocinas de fase aguda, porém com raros leucócitos presentes na lesão. Assim, o estudo deste veneno tornou-se importante para o entendimento do processo de lesão e regeneração tecidual visto no envenenamento como também para o entendimento da relação entre a adesão de leucócitos e a matriz extracelular e os mecanismos de sobrevivência decorrentes desta relação.

Comprovadas as inúmeras atividades biológicas do veneno de *T. nattereri*, tornou-se fundamental o estudo de suas toxinas. Assim, Magalhães et al. (2006) identificaram grupos de toxinas no veneno: a família das proteases Natterinas, constituída por cinco toxinas, 1, 2, 3, 4 e P, com massa molecular em torno de 35 kDa e com homologia entre si, mas não com proteínas existentes nos bancos de dados, e a Nattectina com massa molecular de 15 kDa e com homologia com lectinas do tipo C. Através da análise do domínio CRD (QPD, Gln-Pro-Asp) e N-terminal da seqüência de aminoácidos, foi observado que a Nattectina apresenta afinidade por estruturas terminadas em galactose ou glicanas terminadas em *N*-acetilgalactosamina (GalNAc), semelhante às galectinas (LOPES-FERREIRA et al., 2011). Além disso, a Nattectina também apresenta homologia com outras lectinas descritas como a echinoidina, uma lectina mitogênica e quimiotática isolada do veneno do ouriço-do-mar (*Toxopneustes pileolus*) e a miotoxina TmC4-47.2, isolada do veneno do peixe *Thalassophryne maculosa* (SOSA-ROSALES et al., 2005).

Lectinas formam um grupo de proteínas ligantes de carboidrato estruturalmente heterogêneo que compreende distintas famílias de proteínas evolutivamente relacionadas. Sua principal característica consiste na capacidade de se ligar especificamente e de forma reversível a moléculas de carboidratos. O termo tipo C refere-se à dependência dessas lectinas pelo íon cálcio para exercer suas atividades e também por apresentarem homologia estrutural com o domínio de reconhecimento para carboidratos tipo C (DAY, 1994). As lectinas são particularmente interessantes por suas características biológicas, farmacológicas e bioquímicas. Embora sejam descritas principalmente por possuírem atividade hemaglutinante, vale ressaltar seu importante papel no sistema imune. Destacam-se como moléculas promotoras de comunicação entre células do sistema imune, como reguladoras da migração celular, na captação e apresentação de antígeno e na adesão celular (WILSON; CHEN; RATCLIFFE, 1999).

Muitas lectinas, especificamente aglutinadoras de bactérias ou parasitas têm sido identificadas em animais marinhos invertebrados, especialmente em espécies comercialmente importantes como mexilhão, molusco, camarão, caranguejo e ostra (COMINETTI et al., 2002; DENIS et al., 2003; LUO et al., 2006; NAGANUMA et al., 2006; UTARABHAND; RITTDACH; PAIJIT, 2007; WANG et al., 2007). Desde a identificação e caracterização da primeira lectina *Electrolectin* isolada da enguia *Electrophorus electricus*, um número substancial de lectinas têm sido também identificado em peixes elasmobrânquios e teleósteos, principalmente no plasma, na pele e no muco com função de defesa contra vírus e bactérias (VASTA et al., 2004). Entretanto, não existe nenhum trabalho identificando ou mostrando a relevância de uma lectina isolada do veneno de peixe na regulação do sistema imunológico. Sendo assim, a Nattectina foi recentemente estudada por nosso grupo e demonstramos sua capacidade de induzir resposta imune inata e específica do tipo Th1 em camundongos, mediante a diferenciação e ativação de células dendríticas derivadas de macrófagos (SARAIVA et al., 2011).

Sabendo da importância dos macrófagos em processos homeostáticos assim como na defesa do hospedeiro e contando com a possibilidade de obtenção de agentes terapêuticos de fontes naturais capazes de modular o sistema imune, especificamente macrófagos, o objetivo deste trabalho é a verificação da capacidade da Nattectina na ativação das funções de macrófagos, importantes para a resposta imune inata bem como na indução da resposta adaptativa.

CONCLUSÕES

Este estudo nos permitiu concluir que a Nattectina, uma lectina tipo C do veneno de *Thalassophryne nattereri* é capaz de induzir maturação de macrófagos obtidos de medula óssea que apresentam aumentada expressão de moléculas co-estimuladoras e de MHC de classe II, aumentada capacidade endocítica e maior capacidade de migração pela matriz extracelular (ECM). Verificamos ainda que a capacidade aumentada de expressão de moléculas co-estimuladoras dos macrófagos ativadas pela Nattectina é dependente da sinalização PI3K e MAPK p38. Ademais, as alterações fenotípicas nos macrófagos peritoneais e obtidos de medula óssea induzida pela Nattectina são consistentes com a ativação clássica M1, dependente das citocinas Th1, IL-12 e IFN- γ , e regulada negativamente por IL-4, IL-10 e IL-13. Ainda, também demonstramos uma ação coadjuvante de IL-4 na ação de IFN- γ na mobilização do subtipo SPM na cavidade peritoneal e na ativação (expressão de MHC de classe II e CCR7) de macrófagos derivados de medula óssea.

REFERÊNCIAS¹

AGREN, M. S. Gelatinase activity during wound healing. **Br. J. Dermatol.**, v. 131, p. 634-640, 1994.

AKASHI-TAKAMURA, S.; MIYAKE, K. TLR accessory molecules. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 20, p. 420-425, 2008.

ALMEIDA, V. G.; ROCHA, C. M. Registros de acidentes com peixes peçonhentos e/ou venenosos. **Rev. Soc. Bras. Toxicol.**, v. 2, p. 49-51, 1989.

ARIKAWA, T.; SAITA, N.; OOMIZU, S.; UENO, M.; MATSUKAWA, A.; KATOH, S.; KOJIMA, K.; NAGAHARA, K.; MIYAKE, M.; YAMAUCHI, A.; KOHROGI, H.; HIRASHIMA, M. Galectin-9 expands immunosuppressive macrophages to ameliorate T-cell-mediated lung inflammation. **Eur. J. Immunol.**, v. 40, p. 548-558, 2010.

AUTO, H. F. Acidentes por peixes peçonhentos *Thalassophryne* (Niquim), considerações em torno de 32 casos. **Rev. Esc. Ciênc. Méd. Alagoas.**, v. 5, p. 35-36, 1992.

BASBAUM, C. B.; WERB, Z. Focalized proteolysis: spatial and temporal regulation of extracellular matrix degradation at the cell surface. **Curr. Opin. Cell Biol.**, v. 8, p. 731-738, 1996.

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

BELL, J. K.; MULLEN, G. E.; LEIFER, C. A.; MAZZONI, A.; DAVIES, D. R.; SEGAL, D. M. Leucine-rich repeats and pathogen recognition in Toll-like receptors. **Trends Immunol.**, v. 24, p. 528-533, 2003.

¹ De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BIANCHI, E.; BENDER, J. R.; BLASI, F.; PARDI, R. Through and beyond the wall: late steps in leukocyte transendothelial migration. **Immunol. Today.**, v. 18, p. 586-591, 1997.

BIRKEDAL-HANSEN, H. Proteolytic remodeling of extracellular matrix. **Curr. Opin. Cell Biol.**, v. 7, p. 728-735, 1995.

BRANDT, E.; WOERLY, G.; YOUNES, A. B.; LOISEAU, S.; CAPRON, M. IL-4 production by human polymorphonuclear neutrophils. **J. Leukoc. Biol.**, v. 68, p. 125-130, 2000.

CAMPBELL, J. J.; BUTCHER, E. C. Chemokines in tissue-specific and microenvironment-specific lymphocyte homing. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 12, p. 336-341, 2000.

CANTLEY, L. C. The phosphoinositide 3-kinase pathway. **Science**, v. 296, p. 1655-1657, 2002.

CARPENTER, C. L.; CANTLEY, L. C. Phosphoinositide kinases. **Curr. Opin. Cell Biol.**, v. 8, p. 153-158, 1996.

CHEN, C. J.; KONO, H.; GOLENBOCK, D.; REED, G.; AKIRA, S.; ROCK, K. L. Identification of a key pathway required for the sterile inflammatory response triggered by dying cells. **Nat. Med.**, v. 7, p. 851-856, 2007.

COLTRI, K. C.; OLIVEIRA, L. L.; PINZAN, C. F.; VENDRUSCOLO, P. E.; MARTINEZ, R.; GOLDMAN, M. H.; PANUNTO-CASTELO, A.; ROQUE-BARREIRA, M. C. Therapeutic administration of KM+ lectin protects mice against *Paracoccidioides brasiliensis* infection via Interleukin-12 production in a Toll-like receptor 2-dependent mechanisms. **Am. J. Pathol.**, v. 173, p. 423-432, 2008.

COMINETTI, M. R.; MARQUES, M. R.; LORENZINI, D. M.; LÖFGREN, S. E.; DAFFRE, S.; BARRACCO, M. A. Characterization and partial purification of a lectin from the hemolymph of the white shrimp *Litopenaeus schmitti*. **Dev. Comp. Immunol.**, v. 26, p. 715-721, 2002.

COOK, A. D.; BRAINE, E. L.; HAMILTON, J. A. The phenotype of inflammatory macrophages is stimulus dependent: implications for the nature of the inflammatory response. **J. Immunol.**, v. 171, p. 4816-4823, 2003.

DAI, S. Y.; NAKAGAWA, R.; ITOH, A.; MURAKAMI, H.; KASHIO, Y.; ABE, H.; KATOH, S.; KONTANI, K.; KIHARA, M.; ZHANG, S. L.; HATA, T.; NAKAMURA, T.; YAMAUCHI, A.; HIRASHIMA, M. Galectin-9 induces maturation of human monocyte-derived dendritic cells. **J. Immunol.**, v. 175, p. 2974-2981, 2005.

DAY, A. J. The C-type carbohydrate recognition domain (CDR) superfamily. **Biochem. Soc. Trans.**, v. 22, p. 83-88, 1994.

DENIS, M.; PALATTY, P. D.; BAI, N. R.; SURIYA, S. J. Purification and characterization of a sialic acid specific lectin from the hemolymph of the freshwater crab *Paratelphusa jacquemontii*. **Eur. J. Biochem.**, v. 270, p. 4348-4355, 2003.

DIAKONOVA, M.; BOKOCH, G.; SWANSON, J. A. Dynamics of cytoskeletal proteins during Fcγ receptor-mediated phagocytosis in macrophages. **Mol. Biol. Cell.**, v. 13, p. 402-411, 2002.

EDWARDS, J. P.; ZHANG, X.; FRAUWIRTH, K. A.; MOSSER, D. M. Biochemical and functional characterization of three activated macrophage populations. **J. Leukoc. Biol.**, v. 80, p. 1298-1307, 2006.

FACÓ, P. E.; HAVT, A.; BARBOSA, P. S.; NOBRE, A. C.; BEZERRA, G. P.; MENEZES, D. B.; FONTELES, M. C.; LOPES-FERREIRA, M.; MONTEIRO, H. S. Effects of *Thalassophryne nattereri* fish venom in isolated perfused rat kidney. **Toxicon**, v. 42, p. 509-514, 2003.

FACÓ, P. E.; BEZERRA, G. P.; BARBOSA, P. S. F.; MARTINS, A. M. C.; GUIMARÃES, J. A.; LOPES-FERREIRA, M.; MONTEIRO, H. S. A. Epidemiology of the injuries caused by *Thalassophryne nattereri* (niquim) in Ceara State (1992-2002). **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 38, p. 479-482, 2005.

FALK, L. A.; FORTIER, A. H. Isolation of murine macrophages. In: COICO, R. **Current Protocols in Immunology**. New York: John Wiley & Sons, 1995, v. 3, p. 14-1.1

FONSECA, L. A.; LOPES-FERREIRA, M. Clinical and experimental studies regarding poisoning caused by a fish *Thalassophryne nattereri* (niquim). **An. Bras. Dermatol.**, v. 75, p. 435-443, 2000.

FRÓES, H. P. Peixes toxíforos do Brasil. **Bahia Médica**, v. 4, p. 69-75, 1933a.

FRÓES, H. P. Studies on venomous fishes of tropical countries. **J. Trop. Med. Hyg.**, v. 36, p. 134-135, 1933b.

FRÓES, H. P. Estudo experimental sobre o veneno dos niquins (Thalassophrynidae). **Bahia Médica**, v. 4, p. 225-227, 1933c.

FUJIWARA, N.; KOBAYASHI, K. Macrophages in inflammation. **Curr. Drug Targets Inflamm. Allergy**, v. 4, p. 281-286, 2005.

GALBOIZ, Y.; SHAPIRO, S.; LAHAT, N.; MILLER, A. Modulation of monocytes matrix metalloproteinase-2, MT1-MMP and TIMP-2 by interferon-gamma and -beta: implications to multiple sclerosis. **J. Neuroimmunol.**, v. 131, p. 191-200, 2002.

GARCÍA-GARCÍA, E.; ROSALES, C. Signal transduction during Fc receptor-mediated phagocytosis. **J. Leukoc. Biol.**, v. 72, p. 1092-1108, 2002.

GEISSMANN, F.; JUNG, S.; LITTMAN, D. R. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. **Immunity**, v. 19, p. 71-82, 2003.

GEISSMANN, F.; MANZ, M. G.; JUNG, S.; SIEWEKE, M. H.; MERAD, M.; LEY, K. Development of monocytes, macrophages and dendritic cells. **Science**, v. 327, p. 656-661, 2010.

GESSNER, J. E.; HEIKEN, H.; TAMM, A.; SCHMIDT, R. E. The IgG Fc receptor family. **Ann. Hematol.**, v. 76, p. 231-248, 1998.

GHOSN, E. E. B.; CASSADO, A. A.; GOVONI, G. R.; FUKUHARA, T.; YANG, Y.; MONACK, D. M.; BORTOLUCI, K. R.; ALMEIDA, S. R.; HERZENBERG L. A.; HERZENBERG, L. A. Two physically, functionally, and developmentally distinct peritoneal macrophage subsets. **PNAS**, v. 107, p. 2568-2573, 2010.

GOETZL, E. J.; BANDA, M. J.; LEPPERT, D. Matrix metalloproteinases in immunity. **J. Immunol.**, v. 156, p. 1-4, 1996.

GOODISON, S.; URQUIDI, V.; TARIN, D. CD44 cell adhesion molecules. **Mol. Pathol.**, v. 52, p. 189-196, 1999.

GORDON, S. Alternative activation of macrophages. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 3, p. 23-35, 2003.

GORDON, S.; TAYLOR, P. R. Monocyte and macrophage heterogeneity. **Nat. Rev Immunol.**, v. 5, p. 953-964, 2005.

GRUND, L. Z.; SOUZA, V. M.; FAQUIM-MAURO, E. L.; LIMA, C.; LOPES-FERREIRA, M. Experimental immunization with *Thalassophryne nattereri* fish venom: striking IL-5 production and impaired of B220+ cells. **Toxicon**, v. 48, p. 499-508, 2006.

GU, J.; TANIGUCHI, N. Regulation of integrin functions by N-glycans. **Glycocon J.**, v. 21, p. 9-15, 2004.

HADDAD JUNIOR, V.; PARDAL, P. P. O.; CARDOSO, J. L. C.; MARTINS, I. A. The venomous toadfish *Thalassophryne nattereri* (niquim or miquim): report of 43 injuries provoked in fishermen of Salinópolis (Pará State) and Aracaju (Sergipe State), Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, v. 45, p. 221-223, 2003.

HANADA, T.; YOSHIMURA, A. Regulation of cytokine signaling and inflammation. **Cytokine Growth Factor Rev.**, v. 13, p. 413-421, 2002.

HUANG, B.; PAN, P. Y.; LI, Q.; SATO, A. I.; LEVY, D. E.; BROMBERG, J.; DIVINO, C. M.; CHEN, S.H. Gr-1+CD115+ immature myeloid suppressor cells mediate the development

of tumor-induced T regulatory cells and T-cell anergy in tumor bearing host. **Cancer Res.**, v. 66, p. 1123-1131, 2006.

ICZKOWSKI, K. A. Cell adhesion molecule CD44: its functional roles in prostate cancer. **Am. J. Transl. Res.**, v. 3, p. 1-7, 2010.

IMHOF, B. A.; AURRAND-LIONS, M. Adhesion mechanisms regulating the migration of monocytes. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 4, p. 432-444, 2004.

KAMMANADIMINTI, S.; MANN, B. J.; DUTIL, L.; CHADEE, K. Regulation of Toll-like receptor-2 expression by the Gal-lectin of *Entamoeba histolytica*. **FASEB J.**, v. 18, p. 155-157, 2004.

KIM, Y. H.; CHOI, K. H.; PARK, J. W.; KWON, T. K. LY294002 inhibits LPS-induced NO production through a inhibition of NF-kappaB activation: independent mechanism of phosphatidylinositol 3-kinase. **Immunol. Lett.**, v. 99, p. 45-50, 2005.

KONO, H.; ROCK, K. L. How dying cells alert the immune system to danger. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 8, p. 279-289, 2008.

KREIDER, T.; ANTHONY, R. M.; URBAN JR, J. F.; GAUSE, W. C. Alternatively activated macrophages in helminth infections. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 19, p. 448-453, 2007.

KWIATKOWSKA, K.; SOBOTA, A. Signaling pathways in phagocytosis. **Bioessays**, v. 21, p. 422-431, 1999.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LAI, W. C.; ZHOU, M.; SHANKAVARAM, U.; PENG, G.; WAHL, L. M. Differential regulation of lipopolysaccharide-induced monocyte matrix metalloproteinase (MMP)-1 and MMP-9 by p38 and extracellular signal-regulated kinase 1/2 mitogen-activated protein kinases. **J. Immunol.**, v. 170, p. 6244-6249, 2003.

LARSON, R. S.; SPRINGER, T. A. Structure and function of leukocyte integrins. **Immunol. Rev.**, v. 114, p. 181-217, 1990.

LAUFFENBURGER, D. A.; HORWITZ, A. F. Cell migration: a physically integrated molecular process. **Cell**, v. 84, p. 359-369, 1996.

LEE, H. K.; DUNZENDORFER, S.; SOLDAU, K.; TOBIAS, P. S. Double-stranded RNA-mediated TLR3 activation is enhanced by CD14. **Immunity**, v. 24, p. 153-163, 2006.

LIMA, C.; BIANCA CLISSA, P.; PIRAN-SOARES, A. A.; TANJONI, I.; MOURA-DA-SILVA, A. M.; LOPES-FERREIRA, M. Characterisation of local inflammatory response induced by *Thalassophryne nattereri* fish venom in a mouse model of tissue injury. **Toxicon**, v. 42, p. 499-507, 2003.

LIU, G.; XIA, X.; GONG, S.; ZHAO, Y. The macrophage heterogeneity: difference between mouse peritoneal exudate and splenic F4/80+ macrophage. **J. Cell Physiol.**, v. 209, p. 341-352, 2006.

LOKE, P.; GALLAGHER, I.; NAIR, M. G.; ZANG, X.; BROMBACHER, F.; MOHRS, M.; ALLISON, J. P.; ALLEN, J. E. Alternative activation is an innate response to injury that requires CD4+ T cells to be sustained during chronic infection. **J. Immunol.**, v. 179, p. 3926-3936, 2007.

LOPES-FERREIRA, M.; BARBARO, K. C.; CARDOSO, D. F.; MOURA-DA-SILVA, A. M.; MOTA, I. *Thalassophryne nattereri* fish venom: biological and biochemical characterization and serum neutralization of its toxic activities. **Toxicon**, v. 36, p. 405-410, 1998.

LOPES-FERREIRA, M.; EMIM, J. A.; OLIVEIRA, V.; PUZER, L.; CEZARI, M. H.; ARAÚJO MDA, S.; JULIANO, L.; LAPA, A. J.; SOUCCAR, C.; MOURA-DA-SILVA, A. M. Kininogenase activity of *Thalassophryne nattereri* fish venom. **Biochem. Pharmacol.**, v. 68, p. 2151-2157, 2004.

LOPES-FERREIRA, M.; MAGALHÃES, G. S.; FERNANDEZ, J. H.; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO I. L.; HO P. L.; LIMA C.; VALENTE R.H.; MOURA-DA-SILVA A. M.

Structural and biological characterization of Nattectin, a new C-type lectin from the venomous fish *Thalassophryne nattereri*. **Biochimie**, v.93, p. 971-980, 2011.

LOPES-FERREIRA, M.; MOURA-DA-SILVA, A. M.; MOTA, I.; TAKEHARA, H. A. Neutralization of *Thalassophryne nattereri* (niquim) fish venom by an experimental antivenom. **Toxicon**, v. 38, p. 1149-1156, 2000.

LOPES-FERREIRA, M.; MOURA-DA-SILVA, A. M.; PIRAN-SOARES, A. A.; ANGULO, Y.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J. M.; FARSKY, S. H. Hemostatic effects induced by *Thalassophryne nattereri* fish venom: a model of endothelium-mediated blood flow impairment. **Toxicon**, v. 40, p. 1141-1147, 2002.

LOPES-FERREIRA, M.; NUÑEZ, J.; RUCAVADO, A.; FARSKY, S. H.; LOMONTE, B.; ANGULO, Y.; MOURA-DA-SILVA, A. M.; GUTIÉRREZ, J. M. Skeletal muscle necrosis and regeneration after injection of *Thalassophryne nattereri* (niquim) fish venom in mice. **Int. J. Exp. Pathol.**, v. 82, p. 55-64, 2001.

LUCAS, M.; ZHANG, X.; PRASANNA, V.; MOSSER, D. M. ERK activation following macrophage FcγR ligation leads to chromatin modifications at the IL-10 locus. **J. Immunol.**, v. 175, p. 469-477, 2005.

LUO, T.; YANG, H.; LI, F.; ZHANG, X.; XU, X. Purification, characterization and cDNA cloning of a novel lipopolysaccharide-binding lectin from the shrimp *Penaeus monodon*. **Dev. Comp. Immunol.**, v. 30, p. 607-617, 2006.

MACKANESS, G. B. Cellular immunity and the parasite. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 93, p. 65-73, 1977.

MAGALHÃES, G. S.; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I. L.; LOPES-FERREIRA, M.; LORENZINI, D. M.; HO, P. L.; MOURA-DA-SILVA, A. M. Transcriptome analysis of expressed sequence tags from the venom glands of the fish *Thalassophryne nattereri*. **Biochimie**, v. 88, p. 693-699, 2006.

MAGALHÃES, G. S.; LOPES-FERREIRA, M.; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I. L.; SPENCER, P. J.; ARAÚJO, M. S.; PORTARO, F. C.; MA, L.; VALENTE, R. H.; JULIANO, L.; FOX, J. W.; HO, P. L.; MOURA-DA-SILVA, A. M. Natterins, a new class of proteins

with kininogenase activity characterized from *Thalassophryne nattereri* fish venom. **Biochimie**, v. 87, p. 687-699, 2005.

MAKARENKOVA, V. P.; BANSAL, V.; MATTA, B. M.; PEREZ, L. A.; OCHOA, J.B. CD11b+/Ly-6G+ myeloid suppressor cells cause T cell dysfunction after traumatic stress. **J. Immunol.**, v. 176, p. 2085-2094, 2006.

MARHABA, R.; VITACOLONNA, M.; HILDEBRAND, D.; BANİYASH, M.; FREYSCHMIDT-PAUL, P.; ZÖLLER, M. The importance of myeloid suppressor cells in the regulation of autoimmune effector cells by a chronic contact eczema. **J. Immunol.**, v. 179, p. 5071- 5081, 2007.

MARTINEZ, F. O.; HELMING, L.; GORDON, S. Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 27, p. 451-483, 2009.

MATSUMOTO, R.; MATSUMOTO, H.; SEKI, M.; HATA, M.; ASANO, Y.; KANEGASAKI, S.; STEVENS, R. L.; HIRASHIMA, M. Human ecalectin, a variant of human galectin-9, is a novel eosinophil chemoattractant produced by T lymphocytes. **J. Biol. Chem.**, v. 273, p. 16976-16984, 1998.

MATSUSHITA, N.; NISHI, N.; SEKI, M.; MATSUMOTO, R.; KUWABARA, I.; LIU, F. T.; HATA, Y.; NAKAMURA, T.; HIRASHIMA, M. Requirement of divalent galactoside-binding activity of ecalectin/galectin-9 for eosinophil chemoattraction. **J. Biol. Chem.**, v. 275, p. 8355-8360, 2000.

MEREDITH JR, J. E.; FAZELI, B.; SCHWARTZ, M. A. The extracellular matrix as a cell survival factor. **Mol. Biol. Cell.**, v. 4, p. 953-961, 1993.

METLAY, J. P.; WITMER-PACK, M. D.; AGGER, R.; CROWLEY, M. T.; LAWLESS, D.; STEINMAN, R. M. The distinct leukocyte integrins of mouse spleen dendritic cells as identified with new hamster monoclonal antibodies. **J. Exp. Med.**, v. 171, p. 1753-1771, 1990.

MOSSER, D. M. The many faces of macrophage activation. **J. Leukoc. Biol.**, v. 73, p. 209-212, 2003.

MOSSER, D. M.; EDWARDS, J. P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 8, p. 958-969, 2008.

MOSTAFAVI-POUR, Z.; ASKARI, J. A.; PARKINSON, S. J.; PARKER, P. J.; NG, T. T.; HUMPHRIES, M. J. Integrin-specific signaling pathways controlling focal adhesion formation and cell migration. **J. Cell Biol.**, v. 161, p. 155-167, 2003.

MULLER, W. A. Leukocyte - endothelial cell interactions in leukocyte transmigration and the inflammatory response. **Trends in Immunology**, v. 24, p. 326-333, 2003.

NAGANUMA, T.; OGAWA, T.; HIRABAYASHI, J.; KASAI, K.; KAMIYA, H.; MURAMOTO, K. Isolation, characterization and molecular evolution of a novel pearl shell lectin from a marine bivalve, *Pteria penguin*. **Mol. Divers.**, v. 10, p. 607-618, 2006.

NATHAN, C. Metchnikoff's legacy in 2008. **Nat. Immunol.**, v. 9, p. 695-698, 2008.

O'SHEA, J. J.; MURRAY, P. J. Cytokine signaling modules in inflammatory responses. **Immunity**, v. 28, p. 477-487, 2008.

ORLANDO, R. A.; CHERESH, D. A. Arginine-glycine-aspartic acid binding leading to molecular stabilization between integrin alpha v beta 3 and its ligand. **J. Biol. Chem.**, v. 266, p. 19543-19550, 1991.

PARK, J. S.; SVETKAUSKAITE, D.; HE, Q.; KIM, J. S.; STRASSHEIM, D.; ISHIZAKA, A.; ABRAHAM, E. Involvement of Toll-like receptors 2 and 4 in cellular activation by high mobility group box 1 protein. **J. Biol. Chem.**, v. 279, p. 7370-7377, 2004.

PARKS, W. C.; WILSON, C. L.; LÓPEZ-BOADO, Y. S. Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 4, p. 617-629, 2004.

PASSLICK, B.; FLIEGER, D.; ZIEGLER-HEITBROCK, H. W. Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood. **Blood**, v. 74, p. 2527-2534, 1989.

PIRAN-SOARES, A. A.; KOMEGAE, E. N.; SOUZA, V. M. O.; FONSECA, L. A.; LIMA, C.; LOPES-FERREIRA, M. Neutralizing antibodies obtained in a persistent immune response are effective against deleterious effects induced by the *Thalassophryne nattereri* fish venom. **Toxicon.**, v. 49, p. 920-930, 2007.

RANGASWAMI, H.; BULBULE, A.; KUNDU, G. C. Osteopontin: role in cell signaling and cancer progression. **Trends Cell Biol.**, v. 16, p. 79-87, 2006.

RAO, K. M. MAP kinase activation in macrophages. **J. Leukoc. Biol.**, v. 69, p. 3-10, 2001.

RAVANTI, L.; KAHARI, V. M. Matrix metalloproteinases in wound repair. **Int. J. Mol. Med.**, v. 6, p. 391-407, 2000.

REDONDO-MUÑOZ, J.; UGARTE-BERZAL, E.; GARCÍA-MARCO, J. A.; DEL CERRO, M. H.; VAN DEN STEEN, P. E.; OPDENAKKER, G.; TEROL, M. J.; GARCÍA-PARDO, A. Alpha4beta1 integrin and 190-kDa CD44v constitute a cell surface docking complex for gelatinase B/MMP-9 in chronic leukemic but not in normal B cells. **Blood**, v. 112, p. 169-178, 2008.

RIES, C.; PETRIDES, P. E. Cytokine regulation of matrix metalloproteinase activity and its regulatory dysfunction in disease. **Biol. Chem. Hoppe. Seyler.**, v. 376, p. 345-355, 1995.

ROMMEL, C.; CAMPS, M.; JI, H. PI3K delta and PI3K gamma: partners in crime in inflammation in rheumatoid arthritis and beyond? **Nat. Rev. Immunol.**, v. 7, p. 191-201, 2007.

ROUX, P.P.; BLENIS, J. ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 68, p. 320-344, 2004.

SALLUSTO, F.; CELLA, M.; DANIELI, C.; LANZAVECCHIA, A. Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. **J. Exp. Med.**, v. 182, p. 389-400, 1995.

SAMANNA, V.; MA, T.; MAK, T. W.; ROGERS, M.; CHELLAIAH, M. A. Actin polymerization modulates CD44 surface expression, MMP-9 activation, and osteoclast function. **J. Cell Physiol.**, v. 213, p. 710-720, 2007.

SANO, H.; HSU, D. K.; YU, L.; APGAR, J. R.; KUWABARA, I.; YAMANAKA, T.; HIRASHIMA, M.; LIU, F. T. Human galectin-3 is a novel chemoattractant for monocytes and macrophages. **J. Immunol.**, v. 165, p. 2156-2164, 2000.

SARAIVA, T. C.; GRUND, L. Z.; KOMEAGAE, E. N.; RAMOS, A. D.; CONCEIÇÃO, C.; ORII, N. M.; LOPES-FERREIRA, M.; LIMA, C. Nattectin a fish C-type lectin drives Th1 responses *in vivo*: license macrophages to differentiate into cells exhibiting typical DC function. **Toxicon.**, 2011. Submitted.

SATO, H.; TAKINO, T.; OKADA, Y.; CAO, J.; SHINAGAWA, A.; YAMAMOTO, E.; SEIKI, M. A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumour cells. **Nature**, v. 370, p. 61-65, 1994.

SCHMITZ, G.; ORSÓ, E. CD14 signaling in lipid rafts: new ligands and co-receptors. **Curr. Opin. Lipidol.**, v. 13, p. 513-521, 2002.

SCHWARTZ, M. A.; GINSBERG, M. H. Networks and crosstalk: integrin signalling spreads. **Nat. Cell Biol.**, v. 4, p. E65-E68, 2002.

SHIMIZU, Y.; SHAW, S. Lymphocyte interactions with extracellular matrix. **FASEB J.**, v. 5, p. 2292-2299, 1991.

SIMON, S. I.; GREEN, C. E. Molecular mechanics and dynamics of leukocyte recruitment during inflammation. **Annu. Rev. Biomed. Eng.**, v. 7, p. 151-185, 2005.

SNOEK-VAN BEURDEN, P. A.; VON DEN HOFF, J. W. Zymographic techniques for the analysis of matrix metalloproteinases and their inhibitors. **Biotechniques**, v. 38, p. 73-83, 2005.

SOSA-ROSALES, J. I.; D'SUZE, G.; SALAZAR, V.; FOX, J.; SEVCIK, C. Purification of a myotoxin from the toadfish *Thalassophryne maculosa* (Günter) venom. **Toxicon.**, v. 45, p. 147-153, 2005.

SPRINGER, T.; GALFRÉ, G.; SECHER, D. S.; MILSTEIN, C. Mac-1: a macrophage differentiation antigen identified by monoclonal antibody. **Eur. J. Immunol.**, v. 9, p. 301-306, 1979.

STERNBERG, E. M. Neural regulation of innate immunity: a coordinated nonspecific host response to pathogens. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 6, p. 318-328, 2006.

STERNLICHT, M.; COUSSENS, L. M.; VU, T. H.; WERB, Z. Biology and regulation of the matrix metalloproteinases. In: CLENDENINNN, N. J.; APPELT, K. **Cancer drug discovery and development: Matrix metalloproteinase inhibitors in cancer therapy.** New Jersey: Humana Press Totowa Inc., 2000. p. 1-37.

STOUT, R. D.; JIANG, C.; MATTA B.; TIETZEL, I.; WATKINS, S. K.; SUTTLES, J. Macrophages sequentially change their functional phenotype in response to changes in microenvironmental influences. **J. Immunol.**, v. 175, p. 342-349, 2005.

STRICKLIN, G. P.; LI, L.; NANNEY, L. B. Localization of mRNAs representing interstitial collagenase, 72-kda gelatinase, and TIMP in healing porcine burn wounds. **J. Invest. Dermatol.**, v. 103, p. 352-358, 1994.

ULEVITCH, R. J.; TOBIAS, P. S. Recognition of gram-negative bacteria and endotoxin by the innate immune system. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 1, p. 19-22, 1999.

UNDERHILL, D. M.; OZINSKY, A. Phagocytosis of microbes: complexity in action. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 20, p. 825-852, 2002.

UTARABHAND, P.; RITTIDACH, W.; PAIJIT, N. Bacterial agglutination by sialic acid-specific lectin in the hemolymph of the banana shrimp, *Penaeus (Fenneropenaeus) merguensis*. **Sci. Asia.**, v. 33, p. 41-46, 2007.

VASTA, G. R.; AHMED, H.; DU, S.; HENRIKSON, D. Galectins in teleost fish: Zebrafish (*Danio rerio*) as a model species to address their biological roles in development and innate immunity. **Glycoconj. J.**, v. 21, p. 503-521, 2004.

VICENTE-MANZANARES, M.; SÁNCHEZ-MADRID, F. Role of the cytoskeleton during leukocyte responses. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 4, p. 110-122, 2004.

VU, T. H.; WERB, Z. Gelatinase B: structure, regulation, and function. In: PARKS, W. C.; MECHAM, R. P. **Biology of extracellular matrix-metalloproteinases**. San Diego: Academic Press, 1998. p. 115-148.

VU, T. H.; WERB, Z. Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology. **Genes Dev.**, v. 14, p. 2123-2133, 2000.

ZIEGLER-HEITBROCK, H. W.; FINGERLE, G.; STROBEL, M.; SCHRAUT, W.; STELTER, F.; SCHÜTT, C.; PASSLICK, B.; PFORTE, A. The novel subset of CD14+/CD16+ blood monocytes exhibits features of tissue macrophages. **Eur. J. Immunol.**, v. 23, p. 2053-2058, 1993.

YOUN, J. I.; NAGARAJ, S.; COLLAZO, M.; GABRILOVICH, D. I. Subsets of myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice. **J. Immunol.**, v. 181, p. 5791-5802, 2008.

WANG, H.; SONG, L.; LI, C.; ZHAO, J.; ZHANG, H.; NI, D.; XU, W. Cloning and characterization of a novel C-type lectin from Zhikong scallop *Chlamys farreri*. **Mol. Immunol.**, v. 44, p. 722-731, 2007.

WILSON, R.; CHEN, C.; RATCLIFFE, N. A. Innate immunity in insects: the role of multiple, endogenous serum lectins in the recognition of foreign invaders in the cockroach, *Blaberus discoidalis*. **J. Immunol.**, v. 162, p. 1590-1596, 1999.

WOESSNER JR, J. F. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. **FASEB J.**, v. 5, p. 2145-2154, 1991.