MÁRCIO JOSÉ FERREIRA

**O papel crítico da sinalização TLR/MyD88 no efeito inibitório
das proteases Natterinas no recrutamento celular**

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

São Paulo
2012

MÁRCIO JOSÉ FERREIRA

**O papel crítico da sinalização TLR/MyD88 no efeito inibitório
das proteases Natterinas no recrutamento celular**

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

Área de concentração: Imunologia

Orientador(a): Dra Monica Lopes-Ferreira

Co-orientador(a): Dra Carla Lima

Versão original

São Paulo
2012

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Ferreira, Marcio Jose.

O papel crítico da sinalização TLR/MyD88 no efeito inibitório das proteases Natterinas no recrutamento celular / Marcio Jose Ferreira. -- São Paulo, 2012.

Orientador: Profa. Dra. Mônica Valdyrce dos Anjos Lopes Ferreira.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Imunologia. Área de concentração: Imunologia. Linha de pesquisa: Resposta imunológica induzida por venenos animais.

Versão do título para o inglês: The critical role of TLR/MyD88 signaling in the inhibitory effect of proteases Natterins in cell recruitment.

1. Receptores imunológicos 2. Peixes venenosos 3. Receptores do tipo Toll 4. *Thalassophryne nattereri* 5. Natterinas 6. Fosfatases I. Ferreira, Profa. Dra. Mônica Valdyrce dos Anjos Lopes II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Imunologia III. Título.

ICB/SBIB0106/2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato: Márcio José Ferreira

Titulo da Tese: O papel crítico da sinalização TLR/MyD88 no efeito
inibitório das proteases Natterinas no recrutamento celular

Orientador (a): Profa. Dra. Mônica Valdyrce dos Anjos Lopes Ferreira

A Comissão Julgadora dos Trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão
pública realizada a/...../....., considerou

() **Aprovado(a)**

() **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:.....
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone : (55) (11) 3091-7733 - telefax : (55) (11) 3091-7438
e-mail: cep@icb.usp.br

Comissão de Ética em Pesquisa

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB N° 311/09, referente ao projeto intitulado: “*Alterações morfológicas e funcionais induzidas em células endotéliais pelas proteases Natterinas*” sob a responsabilidade de **Márcio José Ferreira**, foi analisado na presente data pela CEEA - COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL e pela CEPSh - COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não envolve manipulação animal ou humana que justifique uma aprovação quanto aos princípios éticos exigidos por ambas as Comissões.

São Paulo, 22 de maio de 2009.

PROF. DR. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador da CEEA - ICB/USP

PROF. DR. PAOLO M.A. ZANOTTO
Vice-Coordenador da CEPsh - ICB/USP

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO BUTANTAN

Av. Vital Brazil, 1500, CEP 05503-900, São Paulo, SP, Brazil
Telefone: (55) (011) 3726-7222 ramal 2106 - Fax: (55) (011) 3726-1505

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Alterações morfológicas e funcionais induzidas em células endoteliais pelas proteases Natterinas" **protocolo nº 723/10**, sob a responsabilidade de Mônica Lopes Ferreira e Márcio José Ferreira, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO INSTITUTO BUTANTAN (CEUAIB) em reunião de **13/05/2010**.

We certify that the research entitled "Morphological and functional changes induced in endothelial cells by proteases Natterinas", **protocol nº 723/10**, under the responsibility of Mônica Lopes Ferreira and Márcio José Ferreira, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Research, adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation, and was approved by the ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL RESEARCH of BUTANTAN INSTITUTE in the meeting of 05/13/2010

Vigência do Projeto:	Nº de animais/espécie
06/2010 – 06/2014	
Laboratório Especial de Toxinologia Especial	210 camundongos Swiss Machos 210 camundongos C57BL/06

São Paulo, 09 de agosto 2010.

Dra. Denise V. Tambourgi
Presidente da CEUAIB

De acordo:

Dr. Otávio Azevedo Mercadante
Diretor do Instituto Butantan

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - CEP. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **92** nas fls. **90** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) Mônica Valdyrce A. Lopes Ferreira, Coordenador(a) da Linha de pesquisa **Resposta imunológica induzida por venenos animais** do qual participam o(s) alunos **Márcio José Ferreira e a pesquisadora Carla Lima**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela *COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS* (CEUA) em **01.10.2010, com validade de 3 anos.**

São Paulo, 04 de outubro de 2010.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEUA - ICB/USP

Profa. Dra. PATRÍCIA GAMA
Secretária
CEUA - ICB/USP

A Minha Família

Aos meus pais Antonio e Antonia (meus verdadeiros mestres) por me ensinarem a ter honestidade, paciência, coragem e determinação em tudo o que eu fizesse

À minha "vozinha" Sebastiana por me ensinar a ter fé e esperança quando tudo parecia perdido

Às minhas irmãs Maria Alesandra e Aliandre por me ensinarem a não ter medo e por sempre terem acreditado em mim

Ao meu companheiro Erialdo, pessoa singular em minha vida que me ensinou a dizer a verdade por mais difícil que seja.

Ao meu querido Érick por me fazer acreditar que é possível ser pai e por me deixar praticar a arte de se educar um filho

Aos meus sobrinhos Paloma, Pâmela, Eduardo, Pablo e Vinicius pelos sorrisos arrancados e pela alegria que sinto quando estamos juntos

A todos, OBRIGADO!

**À Dra. Mônica Lopes-Ferreira e
Dra. Carla Lima**

Pela oportunidade que me deram de progredir, por terem acreditado em mim e por terem me orientado e ensinado toda a conduta profissional. Sou eternamente grato pelo apoio e dedicação durante a execução deste trabalho e por toda ajuda e paciência a mim conduzida. Se antes era menino, agora sou homem digno. E parte disso devo a vocês. Obrigado!

AGRADECIMENTOS

Aos colegas do Laboratório de Imunorregulação:

À Lidiane Zito Grund - “*A altruísta*” - por todas as dúvidas esclarecidas sobre imunologia, pelo auxílio dado em todos os experimentos e, principalmente, por me fazer acreditar que existem pessoas que realmente se importam com as outras.

À Evilin Naname Komegae - “*A Prática*” - pelo companheirismo durante o período do cursão, pelo treinamento dado a mim nos experimentos de cultivo celular e por me ensinar que praticidade é fundamental. Tenho certeza que tive uma dedicada professora.

À Erica Coutinho - “*A determinada*” - pela paciência que teve comigo durante o seu treinamento e pelo auxílio dado em alguns experimentos e por mostrar a sua determinação em aprender mais a cada dia. `

A Adriano Gonçalves - “*O gente boa*” - pelo companheirismo ainda recente, pelos conselhos e dicas de vivência.

À Fernanda Bruni - “*A colorida*” - por sua dedicação e paciência durante meu treinamento de microscopia intravital, pela ajuda e contribuição em outros ensaios e por me lembrar que as energias da natureza são mais supremas que qualquer outra.

A Edson Kiyotaka Ishizuka - “*O discreto*” - pelo auxílio dado aos experimentos, pela convivência harmoniosa e por ensinar a importância de se ter discrição.

À Fernanda Magalhães - “*A mãe*” - pela convivência tranquila, pelos conselhos, pelas indicações durante minha crise de asma e pela troca de experiência que muito me ajudou com o Érick.

A Anderson Ramos, Denise, Alessandra, Douglas Boletini pelo tempo de convivência, por todas as conversas, pela descontração e pela troca de experiências.

Aos colaboradores do Lab. Especial de Toxinologia Aplicada:

Zezé e Isaias pela contribuição e auxílio durante estes anos.

À Sra. Luci e ao Sr. Roberto Siqueira pelas diversas vezes que me ajudaram com a injeção de tratamento dos animais.

Às Sras. Silvia, Cida, Vera Lúcia e Dadá pela manutenção da ordem e limpeza do ambiente de trabalho e dos materiais utilizados no laboratório.

Às amigas:

Ana Albuquerque e Verinha, grandiosas amigas que sempre estiveram ao meu lado por muitos anos. Obrigado pela cumplicidade, confidências, conselhos e pelos inúmeros momentos de descontração e lazer.

À dona Dulcenéia (Dulce), pela dedicação de mãe que sempre me deu, pelos conselhos, por sempre me ajudar quando necessito e pela sua contribuição no período em que estive doente com crise asmática.

À Jessica Araceli Rocha pelos inúmeros conselhos e por tantas vezes que ouviu minhas lamentações em nossos almoços. Sou muito grato a ti minha amiga.

A todos os animais que cederam suas vidas em função deste trabalho

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – **FAPESP** e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - **CNPq** - pelo apoio financeiro no decorrer do projeto

A todos aqueles que contribuíram com este trabalho e que eu tenha esquecido de mencionar...

... A todos, muito obrigado!

"Cada um que passa em nossa vida, passa sozinho,
pois cada pessoa é única e nenhuma substitui a outra.

Cada um que passa em nossa vida, passa sozinho,
mas quando parte, nunca vai só nem nos deixa a sós.
Leva um pouco de nós, deixa um pouco de si mesmo.
Há os que levam muito, mas há os que não levam
nada".

(Kalil Gibram).

RESUMO

Ferreira MJ. O papel crítico da sinalização TLR/MyD88 no efeito inibitório das proteases Natterinas no recrutamento celular. [tese (Doutorado em Imunologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2012.

Estudos desenvolvidos anteriormente pelo nosso grupo mostram que o veneno do peixe peçonhento *Thalassophryne nattereri* desenvolve uma resposta inflamatória celular inadequada caracterizada por um número reduzido de leucócitos na lesão. A partir de uma combinação de abordagens proteômicas e transcriptômicas a composição do veneno de *T. nattereri* foi estudada e proteínas majoritárias presentes no veneno deste peixe, uma família de proteases nomeadas Natterinas foram identificadas. Neste trabalho, nosso objetivo foi avaliar se as Natterinas são as toxinas responsáveis pela a ação inibitória do recrutamento de leucócitos durante a inflamação e os prováveis mecanismos e moléculas envolvidos neste processo. Inicialmente padronizamos a concentração (0,02 µg/mL) e o tempo de tratamento (6 h) ideais para os ensaios subsequentes de microscopia intravital. Os animais receberam tratamento intraescrotal com as Natterinas e após 6 h tiveram o músculo cremáster exposto para a indução do rolamento de leucócitos pela aplicação tópica da quimiocina KC, de LPS ou do agonista de PAR-4 (agPAR-4) na concentração de 0,02 µg/mL sobre a microcirculação. Nossos resultados revelaram que o tratamento com as Natterinas reduz o rolamento de leucócitos induzido pela KC aos 30 min de observação e que esta redução não possui relação alguma com a ação proteásica das Natterinas sobre a KC. No entanto, as Natterinas não são capazes de reduzir/inibir o rolamento de leucócitos induzido pelo agPAR-4 indicando que este receptor não sofre interferência pelas proteases Natterinas. Sabendo da intrínseca relação dos receptores do tipo Toll (TLR) com o receptor de quimioquina CXCR1 avaliamos o efeito inibitório das Natterinas no rolamento de leucócitos induzido pela KC utilizando animais TLR2 KO e mutante de TLR4 e verificamos que o efeito inibitório das Natterinas depende de ambos os receptores (TLR2 e TLR4). Estes dados também foram semelhantes nos estudos de migração de células para a cavidade peritoneal. De maneira surpreendente, quando tratamos os animais com as Natterinas e aplicamos o LPS na microcirculação notamos uma inibição quase total no rolamento de leucócitos, indicando um papel inibitório para as Natterinas no rolamento de leucócitos induzido pelo LPS. Esta inibição das Natterinas é parcialmente dependente da sua atividade proteásica e dependente da expressão de TLR2 e MyD88, reforçando a participação dos receptores TLR neste processo. O efeito inibitório das Natterinas não sofre influência de reguladores endógenos da inflamação como a IL-10, os corticóides, a enzima heme oxigenase-1 (HO-1) ou do antagonista do receptor de IL-1 (IL-1Ra), no entanto, o seu efeito inibitório é totalmente dependente da via de sinalização PI3K e da ação de proteínas serina/treonina fosfatases. Finalmente, avaliamos o efeito inibitório das Natterinas na endotoxemia (sepsis) causada pelo LPS de dois tipos distintos de bactérias (*E. coli* e *S. abortus*) e notamos que as Natterinas diminuem o recrutamento de células para a cavidade peritoneal desses animais, especialmente de neutrófilos e, ainda, são capazes de aumentar a sobrevivência dos animais com choque. Em conjunto, os dados demonstram que o efeito inibitório das Natterinas, além de depender parcialmente da sua atividade proteásica não está relacionado com a clivagem proteolítica da quimiocina KC ou por indução de reguladores endógenos como IL-10, corticóides, a enzima HO-1 ou IL-1Ra. O efeito inibitório das Natterinas parece ser dependente da ativação da via de sinalização TLR/MyD88 e PI3K e

das proteínas serina/treonina fosfatases, contribuindo de forma significativa na sobrevivência de animais induzidos a endotoxemia por LPS.

Palavras-chave: Natterinas. *Thalassophryne nattereri*. Toll Like Receptors. Proteases. KC. PI3K.

ABSTRACT

Ferreira MJ. The critical role of TLR/MyD88 signaling in the inhibitory effect of proteases Natterins in cell recruitment. [Ph. D thesis (Immunology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2012.

Studies developed previously by our group show that the venom of *Thalassophryne nattereri* venomous fish develops an inappropriate cellular inflammatory response characterized by a reduced number of leukocytes at the site of injury. Combined proteomic and transcriptomic approaches to study the composition of the venom of *Thalassophryne nattereri* venomous fish revealed the primary structures of the major toxins as a family of proteases Natterins, never described on venoms and a C-type lectin Nattectin. In this study, our aim was evaluate if Natterins are the responsible for the inhibition of the leukocyte recruitment during inflammation and discover the mechanisms and molecules involved in this process. Firstly, we standardized the ideal concentration (0.02 µg/mL) and treatment time (6 h) for subsequent intravital microscopy assay. Animals received intraescrotal treatment with Natterins and 6 h after; the cremaster muscle was exposed for the leukocyte rolling induction by topical application of the chemokine KC, LPS or agonist of PAR-4 (agPAR4) at 0.02 µg/mL. Our results showed that treatment with Natterins reduces the leukocytes rolling induced by KC at 30 min of observation and that this reduction have no correlation with the protease activity of Natterins on KC. However, Natterins were unable to inhibit the leukocyte rolling induced by agPAR-4 indicating that this receptor is not affected by Natterins. Next, we evaluated the inhibitory effect of Natterins in the leukocyte rolling induced by KC using TLR2 KO or TLR4 mutant mice and we found that the inhibitory effect of Natterins is dependent of the expression of both receptors. These data were also similar in the studies of cell migration into the peritoneal cavity. When rolling behavior was determined after topical application of LPS in mice pre-treated with Natterins, the proportions of rolling leukocytes in venules were almost the same in control-mice; and the inhibitory effect was independent of this protease activity and totally dependent on the TLR2 and MyD88 expression, reinforcing the involvement of TLR receptors in this process. Natterins inhibitory effect was not influenced by endogenous regulators of inflammation such as IL-10, corticosteroids, the heme oxygenase-1 (HO-1) or IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra), however, its inhibitory effect is completely dependent on the PI3K signaling pathway and the action of protein serine/threonine phosphatases. Finally, we showed that Natterins abolished the neutrophilia in the peritoneal cavity of animals with endotoxemia (sepsis) caused by two distinct types of LPS from *E. coli* or *S. abortus* and increased the survival of animals with shock. Together, these data demonstrate that the inhibitory effect of Natterins seems to be dependent of TLR/MyD88 and PI3K signaling pathways activation and protein serine/threonine phosphatases, and support the inhibitory capacity of the Natterins in acute and systemic inflammatory processes.

Keywords: Natterins. *Thalassophryne nattereri*. Toll Like Receptors. Proteases. KC. PI3K.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema ilustrativo das etapas da migração de leucócitos	20
Figura 2 - Peixe peçonhento <i>Thalassophryne nattereri</i>	29
Figura 3 - Caracterização das toxinas majoritárias presentes no veneno de <i>Thalassophryne nattereri</i>	31
Figura 4 - Padronização da concentração e do tempo de tratamento com as Natterinas.....	41
Figura 5 - As Natterinas não reverterem o rolamento de leucócitos induzido pelo agonista de PAR4	43
Figura 6 - As Natterinas inibem tardiamente o rolamento de leucócitos induzido pela KC sem clivar a quimiocina.....	46
Figura 7 - Dependência positiva da sinalização TLR2 na inibição pelas Natterinas do rolamento de leucócitos induzido pela KC.....	49
Figura 8 - Dependência positiva da sinalização TLR4 na inibição pelas Natterinas do rolamento de leucócitos induzido pela KC.....	51
Figura 9 - Dependência positiva da sinalização TLR2 na inibição pelas Natterinas do extravasamento de leucócitos induzido pela KC.....	54
Figura 10 - Dependência positiva da sinalização TLR4 na inibição pelas Natterinas do extravasamento de leucócitos induzido pela KC.....	56
Figura 11 - A inibição pelas Natterinas do rolamento de leucócitos induzido pelo LPS independe da atividade proteolítica ou do tempo do tratamento.....	59
Figura 12 - Dependência positiva da sinalização MyD88 na inibição pelas Natterinas do rolamento de leucócitos induzido pela LPS.....	62
Figura 13 - Dependência positiva da sinalização TLR2 na inibição pelas Natterinas do rolamento de leucócitos induzido pela LPS.....	63
Figura 14 - Ausência da interferência de corticoides ou da enzima HO-1 no efeito inibitório das Natterinas sobre o rolamento de leucócitos induzido pelo LPS.....	67
Figura 15 - Ausência da participação do antagonista solúvel do receptor de IL-1 na inibição pelas Natterinas do rolamento de leucócitos induzido pelo LPS.....	69
Figura 16 - A ação inibitória das Natterinas no rolamento de leucócitos é independente de IL-10	71

Figura 17 - A ação inibitória das Natterinas no rolamento de leucócitos depende de serina/treonina fosfatases.....	74
Figura 18 - A ação inibitória das Natterinas no rolamento de leucócitos dependente de PI3K	75
Figura 19 - As Natterinas inibem o recrutamento de neutrófilos em camundongos com endotoxemia induzida por baixa dose de LPS de <i>E. coli</i>	79
Figura 20 - As Natterinas inibem o recrutamento de neutrófilos em camundongos com endotoxemia induzida por alta dose de LPS de <i>E. coli</i>	80
Figura 21 - As Natterinas inibem o recrutamento de neutrófilos em camundongos com endotoxemia induzida por alta dose de LPS de <i>S. abortus equi</i>	82
Figura 22 - As Natterinas retardam a morte de camundongos com endotoxemia induzida por alta dose de LPS de <i>S. abortus equi</i>	83

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 OBJETIVOS	33
3 ETAPAS REALIZADAS	34
4 MATERIAL E MÉTODOS	35
4.1 Animais	35
4.2 Obtenção e inativação das Natterinas	35
4.3 Tratamento com as Natterinas e agentes inflamatórios	36
4.4 Avaliação por microscopia intravital do rolamento de leucócitos	36
4.5 Avaliação da participação de reguladores endógenos no efeito inibitório das Natterinas	37
4.6 Análise da participação de reguladores negativos da sinalização TLR no efeito inibitório das Natterinas	37
4.7 Análise da degradação proteolítica da quimiocina KC pelas Natterinas	38
4.8 Análise da migração de células para a cavidade peritoneal	38
4.9 Indução de sepse pela injeção de LPS	39
4.10 Análise estatística	39
5 RESULTADOS	40
5.1 Efeito das Natterinas no rolamento de leucócitos induzido pelo agonista do receptor PAR-4	40
5.2 As Natterinas inibem o rolamento de leucócitos induzido pela quimiocina KC	44
5.3 A inibição pelas Natterinas do rolamento de leucócitos induzido pela KC é dependente da sinalização TLR2/TLR4	47
5.4 As Natterinas inibem também o extravasamento de neutrófilos de maneira dependente da sinalização TLR2/TLR4	52
5.5 A inibição pelas Natterinas do rolamento de leucócitos induzido pelo LPS é independente da atividade proteolítica ou do tempo de aplicação	57
5.6 A inibição pelas Natterinas do rolamento de leucócitos induzido pelo LPS é dependente de MyD88 e TLR2	60
5.7 Análise da participação de reguladores endógenos da inflamação no efeito inibitório das Natterinas	64
5.8 Análise da participação de reguladores intracelulares no efeito inibitório das Natterinas	72
5.9 Efeito das Natterinas na endotoxemia induzida por baixa e alta dose LPS de <i>E. coli</i> e <i>S. abortus</i>	76
6 DISCUSSÃO	84
7 CONCLUSÃO	94
REFERÊNCIAS	95

1 INTRODUÇÃO

A reação inflamatória é uma resposta imediata do tecido vascularizado produzida primariamente por células da imunidade inata em resposta a uma infecção ou danos teciduais podendo ser aguda ou crônica, dependendo do tipo e da persistência do agente lesivo (Foster e Medzhitov, 2009; Kumar et al., 2005; Nathan, 2002). Essa resposta compreende eventos vasculares, celulares e linfáticos, cuja finalidade é eliminar o agente agressor e restaurar o tecido à sua forma e função normais (Garcia-Leme, 1989).

Uma resposta inflamatória efetiva necessita primeiramente da ativação de células endoteliais para o subsequente recrutamento de leucócitos para o sítio de inflamação. Este recrutamento é induzido por moléculas quimioatratoras (quimiocinas) que são inicialmente liberadas por fagócitos mononucleares ou células endoteliais ativadas no local da lesão (Wong e Fish, 2003).

Independente da natureza do estímulo que inicia o processo inflamatório, as células do sistema fagocitário mononuclear (monócitos circulantes e macrófagos teciduais) são ativadas e secretam citocinas como IL-1, IL-6 e TNF- α (Baumann e Gauldie, 1994; De Filippis et al., 2008). Estas citocinas agem localmente ativando fibroblastos, células endoteliais e leucócitos causando a liberação de um segundo conjunto de citocinas que incluem, além de IL-1 e TNF- α , a liberação de IL-6, IL-8 e de quimiocinas inflamatórias (MIP-1) e quimioatratoras de macrófagos (MCP-1). Essas proteínas juntamente com a IL-1 e IL-8, atraem monócitos e neutrófilos para o sítio da lesão que secretam citocinas para retroalimentar o processo inflamatório.

A ativação do endotélio é um evento importante no processo inflamatório podendo ocorrer de duas maneiras: através de uma resposta rápida e independente da expressão de novos genes (tipo I) e uma resposta mais lenta, que depende da ativação de novos genes (tipo II) (Pober e Sessa, 2007). A ativação do tipo I ocorre entre dez a vinte minutos após a injúria e é mediada pela ativação dos receptores acoplados à proteína G (GPCR) que ativam a fosfoliase A₂ produzindo PGI₂ e óxido nítrico (NO) que juntos induzem vasodilatação e relaxamento da musculatura lisa das arteríolas terminais. Esse evento provoca a exocitose de vesículas secretórias especializadas (corpos de weibel-Palade, WPB) contendo P-selectina (CD62) para a superfície luminal da célula iniciando o processo de ligação dos leucócitos com as células endoteliais (Pober e Sessa, 2007). A ativação endotelial do tipo II requer a

presença de mediadores inflamatórios como TNF- α e IL-1 que desencadeiam a ativação dos fatores de transcrição NF κ B e AP-1. Esse processo é mais lento em relação ao tipo I, pois depende da transcrição e tradução de novas proteínas pelas células endoteliais (Pober e Sessa, 2007).

Durante o extravasamento de leucócitos para o local inflamado as alterações hemodinâmicas modificam a orientação das células sanguíneas, originando o fenômeno conhecido por marginação leucocitária, onde os leucócitos que se localizavam na região vascular central passam a percorrer a periferia do vaso (Cotran et al., 1999). Neste contexto, o endotélio vascular desempenha um papel central, tanto pela expressão de moléculas de adesão que facilitam a migração de monócitos e neutrófilos, quanto pela modificação do tônus vascular mediado por metabólitos do ácido araquidônico (prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos), óxido nítrico e pelas cininas, sofrendo vasodilatação (eritrema), aumento da permeabilidade vascular (edema) e hipotensão arterial.

Na periferia do vaso, a interação dos leucócitos com as células endoteliais ocorre em diferentes etapas (Fig. 1). Primeiramente os leucócitos rolam sobre o endotélio devido o aumento na expressão de selectinas sobre a superfície dos leucócitos (L-selectina ou CD62L) e das células endoteliais (E-selectina) sendo esta família de moléculas de adesão as responsáveis pelo contato inicial dos leucócitos com o endotélio vascular (Butcher, 1991; Rankin, 2004; Springer, 1994). Este contato se dá pela interação das selectinas do endotélio com os seus ligantes glicosilados PSGL-1 (glicoproteína ligante de selectina P-1) e ESL-1 (ligante de selectina-1) presentes nos leucócitos (Beutler, 2004; Ley et al., 2007; Serhan, 2007). Dessa forma, há uma redução na velocidade de deslocamento do leucócito dentro do vaso proporcionando, então, o estabelecimento de outras ligações (Ley, 2002; Luster et al., 2005).

Figura 1 – Esquema ilustrativo das etapas da migração de leucócitos

Fonte: Choi (2009).

As selectinas constituem uma família de lectinas que reconhecem carboidratos específicos e medeiam a aderência de neutrófilos e monócitos ao endotélio. Três tipos de selectinas conhecidas foram denominadas de acordo com o tecido no qual foram identificadas. E-selectinas que aparecem nas células endoteliais após terem sido ativadas por citocinas inflamatórias como a IL-1; a L-selectina encontrada nos leucócitos e responsáveis pelo endereçamento (*homing*) dos linfócitos para os linfonodos, e a P-selectina (principal selectina) que é constitutivamente expressa em plaquetas ativadas e em células endoteliais estando armazenadas na forma de alfa-grânulos e corpos de Weibel-Palade (vesículas citoplasmáticas) respectivamente (Rankin, 2004). Considera-se que as E-selectinas sejam as principais responsáveis pela aderência dos leucócitos ao endotélio porque além de mediar a interação fraca de neutrófilos com o endotélio, induzem a expressão de moléculas de adesão como as integrinas e as ICAMs. A interação estabelecida por selectinas corresponde ao passo inicial na seqüência de eventos que resultará no extravasamento dos neutrófilos para os sítios de inflamação.

Na etapa seguinte, os leucócitos aderem-se firmemente à superfície vascular e as principais moléculas envolvidas nesta fase são as integrinas ($\alpha 4\beta 1$ - VLA-4; $\alpha 4\beta 7$ - LPAM-1; $\alpha 1\beta 2$ - LFA-1) e as imunoglobulinas (ICAM-1 e VCAM-1). A firme adesão dos neutrófilos ao endotélio ocorre através da ligação das integrinas LFA-1 (CD11a/CD18) e CR3 (CD11b/CD18) com os seus respectivos ligantes como ICAM-1, ICAM-2 e VCAM-1 (Rankin, 2004).

As integrinas, uma outra família de moléculas de adesão, são expressas pelos leucócitos e são compostas por duas subunidades (α e β) (Imhof e Aurrand-Lions 2004) que possuem um longo domínio extracelular que se liga aos componentes da matriz extracelular (ECM) ou aos seus ligantes específicos, presentes nas células. Entre as integrinas, destacam-se aquelas pertencentes a subfamília das $\beta 2$ integrinas, tais como a VLA-4, expressa em neutrófilos, cujo ligante é a VCAM-1, encontrada na superfície das células endoteliais. Essa ligação entre VLA-4 e VCAM-1 é responsável pela aderência firme do neutrófilo ao endotélio, facilitando o seu recrutamento para o foco inflamatório. A VCAM-1 também participa da aderência de linfócitos, monócitos, eosinófilos e basófilos à superfície endotelial (Bochner et al., 1991).

Imediatamente após a aderência ao endotélio, inicia-se o processo da transmigração através do vaso (Smith, 2008; Weber et al., 2007) envolvendo a participação de moléculas juncionais tais como as moléculas de adesão celular endotelial/plaquetária-1 (PECAM-1), as moléculas de adesão juncional (JAMs) e as CD99 (Petri e Bixel, 2006). Os leucócitos emitem pseudópodes entre as junções das células endoteliais, atravessam a membrana basal e finalmente migram para o espaço intersticial, em direção ao foco da lesão, processo este, dirigido por um gradiente de quimiocinas. As quimiocinas são pequenos peptídeos com função quimioatratora e apresentam atividade mediada através de receptores acoplados à proteína G (Murdoch e Finn, 2000). Estas proteínas podem ser divididas em três famílias de acordo com a posição dos resíduos de cisteína (CC, CXC, CX₃C) (Charo e Taubman, 2004), além de serem classificadas em constitutivas (homeostáticas) ou induzidas (inflamatórias) (Moser e Loetscher, 2001). Uma vez expressas na superfície das células endoteliais, as quimiocinas ativam receptores acoplados à proteína G (GPCR) presentes na superfície dos leucócitos que, então, ativam a expressão e a polarização de integrinas nos leucócitos. Dentre as quimiocinas da família CXC, a KC (CXCL1) homólogo murino de IL-8 (CXCL8) e a MIP-2 são os melhores quimioatratores de neutrófilos (Kobayashi, 2008).

As células endoteliais apresentam um glicocálix rico em proteoglicanos, que serve de ancoragem para as quimiocinas (Tanaka et al., 1993; Webb et al., 1993). O trabalho de transporte e apresentação das quimiocinas até as células endoteliais parece ser desempenhado pelos glicosaminoglicanos (GAGs) presentes na matriz extracelular. As quimiocinas, moléculas básicas, interagem eletrostaticamente com as GAGs, especialmente o heparan sulfato. A formação do complexo GAG-quimiocina é transportada até a célula endotelial que realiza a transcitose deste complexo e o apresenta na sua membrana luminal para uma possível interação com os leucócitos (Kuschert et al., 1999; Parish, 2006).

Dentre os leucócitos, os neutrófilos, são as primeiras células a alcançarem o local da inflamação seguido pela migração dos monócitos que posteriormente se diferenciam em macrófagos. Uma vez no sítio inflamatório, essas células iniciam o processo de fagocitose do agente lesivo e dos debris celulares e o sucesso desse evento caracteriza a última etapa da inflamação. Assim como os mononucleares, os neutrófilos são células secretoras de citocinas (Kasama et al., 2005) como o TNF- α , fatores angiogênicos como o VEGF (Fator de crescimento endotelial vascular) e interleucinas, como a IL-8 ou KC.

As citocinas e os fatores secretados pelos neutrófilos são produzidos em resposta a diferentes estímulos como, por exemplo, ao LPS (lipopolissacarídeo) que é o maior componente da membrana de bactérias gram-negativas e apresenta a característica de ativar o sistema imune de forma complexa. Esta endotoxina ativa o sistema complemento (Sladowski et al., 2001), além do complexo de receptores CD14/TLR4/MD2, promovendo a secreção de citocinas próinflamatórias em diversos tipos celulares (Crowley, 1996).

Os receptores do tipo Toll (*Toll-Like receptors* – TLR) são receptores que reconhecem padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) (Kawai e Akira, 2010). Este receptores foram descritos inicialmente em *Drosophila melanogaster* e denominados *Toll* e associados a defesa contra parasitas. Posteriormente, foram descritos receptores homólogos em mamíferos e então denominados de “*Toll-Like Receptors*”. Atualmente, cerca de 13 membros de TLR são conhecidos em mamíferos e todos eles apresentam pequenas diferenças nas cadeias de aminoácidos que compõem as proteínas que os formam. Por causa destas diferenças, cada TLR é capaz de reconhecer classes diferentes de moléculas biológicas presentes em diversos microorganismos, como por exemplo, LPS, lipoproteínas, flagelina, peptideoglicana, DNA entre outras (Akira et al., 2006; Takeda et al., 2003).

Interações dos TLRs (domínio extracelular C-terminal rico em leucinas repetidas) com seus ligantes específicos conduzem ao recrutamento intracelular de moléculas adaptadoras com domínio N-terminal TIR, tais como MyD88, TIRAP, TRIF e TRAM. Este processo resulta no recrutamento de proteínas da família IRAK e TRAF para o complexo receptor, gerando a ativação de MAPKs e JUN N-terminal (JNKs), p38 e ERKs quinases culminando na ativação dos fatores de transcrição IRF3, IRF5 e IRF7 (*interferon regulatory factor*), NFκB e AP-1 que são essenciais para a indução da resposta imune inata e adaptativa (Akira et al., 2006; Kawai e Akira, 2007). A ativação final do NFκB pode ser desencadeada por um sinal proveniente de um TLR e a via de sinalização pode ser dependente ou independente da proteína adaptadora denominada Fator 88 de diferenciação mielóide (MyD88). A sinalização MyD88-dependente é compartilhada por todos os TLR, exceto o TLR3 (Kawai e Akira, 2010). Se a via de ativação for independente de MyD88, o sinal proveniente do TLR ativa o NFκB através de outras duas moléculas adaptadoras como o TRIF e TRAM, ou ainda MyD88 pode associar-se a outra proteína adaptadora como a MAL (ou TIRAP) para sinalizar a produção de NFκB.

Além dos receptores TLR, investigações recentes tem mostrado a participação de outros receptores na resposta inflamatória. É o caso dos receptores ativados por proteases (PAR) que podem atuar nos processos de captura, adesão e transmigração de leucócitos (Vergnolle, 2005). Estes receptores pertencem à superfamília dos receptores acoplados a proteína G e são caracterizados por um mecanismo único de ativação que envolve a proteólise da região N-terminal do seu domínio extracelular. Esta clivagem, devido a ação de proteases, libera um novo domínio N-terminal que se liga ao próprio receptor no seu segundo *loop* extracelular e desencadeia uma cascata de sinalização. Até agora quatro membros da família PAR foram descritos: PAR1, PAR2, PAR3 e PAR4 (Vergnolle, 2009).

Os receptores PAR1, PAR3 e PAR4 são preferencialmente ativados pela trombina, enquanto o PAR2 pode ser ativado pelas serino-proteases, tripsina, triptase de mastócito, protease-3 derivada de neutrófilo, entre outras (Dale e Vergnolle, 2008). Por outro lado, um outro aspecto extremamente interessante dessa família de receptores é o fato de que a proteólise da região N-terminal provoca a dessensitização do receptor, tornando-o irresponsivo (Vergnolle, 2009). Investigações recentes mostram a participação de PAR4 na indução de edema, pela sua ativação através de calicreína plasmática ou tecidual (Hollenberg et al., 2004; Houle et al., 2005). Além disso, tem sido proposto também que PAR4 monitorado por microscopia intravital participa no rolamento e aderência de

leucócitos mediados por trombina em vênulas mesentéricas de ratos (Vergnolle et al., 2002). Evidências adicionais para a presença funcional de PAR4 em células endoteliais de diferentes origens têm sido também relatadas por Kataoka et al. (2003) suportando o envolvimento de PAR4 na inflamação.

Embora a detecção de patógenos ou de outros agentes inflamatórios pelas células da imunidade inata seja essencialmente importante no controle ou no curso da doença, a resposta inflamatória desencadeada precisa ser controlada afim de se evitar danos teciduais extensivos e a manifestação de estados patológicos cronicamente graves (Biswas e Lopes-Collazo, 2009). Neste sentido um dos mecanismos de regulação inflamatória que ocorre é a coexpressão de genes protetores (Bach et al., 1997). Entre as substâncias antiinflamatórias produzidas naturalmente está a enzima de resposta ao estresse, heme oxigenase-1 (HO-1) produzida pela ativação do gene *Hmox1* (Seldon et al., 2007; Soares et al., 1998, 2004) e a produção endógena de corticóides pela glândula adrenal após a ativação do eixo hipotalâmico-pituitário-adrenal (HPA) (Besedovsky et al., 1986).

A enzima heme oxigenase-1 (HO-1) é a isoforma induzida desta família de enzimas e atua na degradação do grupamento Heme da hemoglobina gerando metabólitos como monóxido de carbono (CO), biliverdina (BVD) e ferro livre (Freitas et al., 2006). Esta enzima é expressa por diversas células incluindo células endoteliais, células da musculatura vascular, basófilos, monócitos, macrófagos, neutrófilos e fibroblastos. A expressão dessa enzima ocorre em resposta a uma diversidade de condições como estresse oxidativo, exposição a citocinas, óxido nítrico e a endotoxinas (Datta e Lianos, 1999; Freitas et al., 2006; Willis et al., 1996). Ultimamente, diversos estudos têm demonstrado que a HO-1, o seu substrato (Heme) e seus metabólitos (CO e BVD) são capazes de modular o processo inflamatório. O grupo Heme parece ativar a produção de espécies reativas de oxigênio e estimula a expressão de moléculas de adesão e, conseqüentemente, a migração de leucócitos para o sítio inflamatório (Wagener et al., 1999; 2001; 2003). Além disso, o aumento dos metabólitos de HO-1 como CO e BVD reduz substancialmente a liberação de mediadores inflamatórios, a expressão de moléculas de adesão e regula o rolamento, aderência e migração de leucócitos (Hayashi et al., 1999; Vicente et al., 2003) sugerindo que a expressão de HO-1 tem efeito protetor.

Com relação aos corticoesteróides, em particular o cortisol, sua produção tem início pela liberação do hormônio adrenocotrófico (ACTH) secretado na porção anterior da

glândula pituitária sob estímulo do fator liberador hipotalâmico - CRF (Damiani et al., 1984). Posteriormente, o ACTH estimula a zona fasciculata do córtex da adrenal a produzir o cortisol que é liberado e transportado pelo sangue através da ligação com proteínas plasmáticas como a albumina e a globulina ligante de cortisol - CBG. Estudos anteriormente descritos, apontam um possível aumento nas concentrações de corticóides após a injeção de endotoxinas (Melby et al., 1960; Moberg, 1971), além disso, observações clínicas e experimentais têm demonstrado que os corticosteróides exercem uma potente atividade antiinflamatória (Damiani et al., 1984).

Outro mecanismo proposto para o controle da inflamação é a regulação da sinalização TLR realizada por reguladores intracelulares como MyD88s, SOCS1, TOLLIP, A20 e CYLD (Jeong e Lee, 2011). Reguladores extrínsecos da sinalização TLR também já foram caracterizados, como a curcumina, um componente ativo do açafrão-da-Índia (*Curcuma longa*) que reduz a expressão de TLR4, MyD88 e NFκB em modelos experimentais de colite (Lubbad et al., 2009). Outros estudos também mostram que a sinalização TLR pode ser regulada negativamente por mecanismos de retroalimentação. Por exemplo, Darragh et al. (2010) mostraram que macrófagos ativados pelo LPS aumentam a expressão gênica de IL-1Ra (antagonista do receptor de IL-1) por mecanismos dependentes das proteínas quinases MSK1 e MSK2 (proteína quinase induzida por estresse e mitógeno) demonstrando que estas quinases e a IL-1Ra atuam como importantes reguladores negativos da inflamação.

IL-1Ra é um antagonista natural de IL-1 sendo produzido localmente por diversos tecidos em resposta a uma infecção ou inflamação (Gabay et al., 1997). Esta molécula pode ser detectada em altos níveis na circulação e o seu principal papel fisiológico está relacionado com a inibição competitiva dos efeitos produzidos pela IL-1 após ligação ao seu receptor (Arend e Gabay, 2000). Células endoteliais da veia umbilical de humanos (HUVEC) estimuladas com LPS, PMA (acetato de forbol miristato) ou com TGF-β aumentam a expressão gênica de mRNA para IL-1Ra embora pacientes com doenças coronárias demonstrem que os níveis endógenos de IL-1Ra produzidos nos vasos não sejam suficientes para inibir os efeitos da IL-1 produzida localmente (Arend e Gabay, 2000).

A via de sinalização de TLR também pode ser regulada através da degradação proteassômica de componentes importantes da sinalização TLR. Esta degradação é feita por um complexo protéico (proteassomo) que identifica e degrada algumas proteínas intracelulares, sendo esta proteólise conduzida por três tipos de enzimas diferentes como a

E1 (ativação da ubiquitina), E2 (conjuga a ubiquitina) e E3 (liga a ubiquitina) (Kwak et al., 2011). Após a ativação de TLR2 e TLR4 pelos seus respectivos ligantes, a proteína adaptadora Mal (proteína adaptadora semelhante a MyD88) é fosforilada pela quinase Btk e interage com a SOCS-1, uma E3 ligase, que induz a poliubiquitinação e a degradação da proteína Mal pelo complexo proteassômico 26S, mostrando a regulação negativa da sinalização TLR pela SOCS-1 (Miggin e O'Neill; 2006). Do mesmo modo, estudos feitos *in vitro* com células endoteliais mostram que o tratamento destas células com TGF- β resulta na ubiquitinação da molécula adaptadora MyD88, sugerindo que o TGF- β facilita a degradação proteassômica de MyD88 diminuindo os níveis celulares desta proteína e, dessa forma, regulando negativamente a sinalização TLR (Naiki et al., 2005).

A fosforilação/desfosforilação de proteínas é um importante evento nos mecanismos de sinalização no qual os sinais extracelulares regulam a homeostasia celular. Os sinais efetores extracelulares atuam modulando proteínas quinases e fosfatases que catalizam atividades opostas de fosforilação e desfosforilação (Barford, 1996). Enquanto as proteínas quinases transferem um fosfato do ATP para uma proteína, as proteínas fosfatases removem um grupo fosfato de resíduos específicos das proteínas (Campbell et al., 2011). Com base na sua função, as proteínas fosfatases podem ser divididas em tirosina fosfatases (Sarmiento et al., 1998) ou serina/treonina fosfatases (Barford et al., 1998). Esta última pode ser dividida em quatro classes distintas (PP1, PP2A, PP2B e PP2C) com base no substrato e na sua especificidade de inibição.

Outra classe importante de proteínas são as quinases, responsáveis por mediar a maior parte da transdução de sinal e controlar diversos processos celulares incluindo metabolismo, transcrição gênica, ciclo celular, rearranjo do citoesqueleto, movimento celular, apoptose e diferenciação celular (Manning et al., 2002). Devido ao seu conservado domínio catalítico essas proteínas compõem uma das maiores superfamílias de proteínas eucarióticas (Hanks, 2003).

A fosfatidilinositol-3 quinase (PI3K) pertence a uma subfamília de proteínas quinases envolvida em diferentes vias de sinalização e controla as principais funções celulares. Esta enzima forma um complexo heterodimérico composto de duas subunidades regulatória (p85) e outra catalítica (p110), recrutando lipídios como segundos mensageiros (Yuan e Cantley, 2008). A PI3K é conhecida por sua dupla especificidade quinase já que ela é capaz de fosforilar tanto lipídios como proteínas. A ativação da PI3K resulta na geração de

fosfatidilinositol 3,4,5 trifosfato (PIP3) a partir do fosfatidilinositol 4,5 bifosfato (PIP2) induzindo o recrutamento de outras proteínas sinalizadoras (Brown et al., 2011). Estudos realizados por Guha e Mackman (2002) demonstram que a inibição da PI3K aumenta a produção de diversas citocinas próinflamatórias, e este efeito está associado a um aumento de atividade da p65, subunidade do fator de transcrição NFκB. As evidências diretas para o envolvimento da PI3K com a sinalização TLR foram mostradas inicialmente por Arbibe et al. (2000) ao demonstrarem que mutações específicas nos resíduos de tirosina no domínio citosólico do TLR2 resultava na perda de habilidade da p85 de se associar com o TLR2, impedindo a ativação do NFκB.

Outro componente importante da regulação inflamatória é a citocina IL-10. Esta citocina é produzida por diversos tipos celulares incluindo células T helper 2 (Th2), células B, macrófagos, monócitos e queratinócitos (Goldman e Velu, 1995) e desempenha um papel central na regulação da resposta inflamatória. A ativação e proliferação de macrófagos são inibidos pela IL-10 através de mecanismos dependentes da sinalização Stat1 e Stat3 limitando a resposta inflamatória (O'Farrell, 1998). Além disso, a IL-10 tem mostrado atenuar a inflamação em uma variedade de modelos experimentais como em modelo de lesão vascular (Zimmerman et al., 2004), doenças autoimunes (Kok et al., 2003) e de isquemia/reperfusão hepática (Yoshidome et al., 1999). Hickey et al. (1998) demonstraram em seus estudos de microscopia intravital que animais deficientes de IL-10 apresentam aumento no rolamento e na aderência de leucócitos, mostrando que a produção de IL-10 endógena atua como reguladora homeostática dos eventos hemodinâmicos e de interação leucócito-endotélio. Além disso, a IL-10 é produzida nos camundongos rapidamente após a exposição ao LPS (Durez et al., 1993; Marchant et al., 1994) no entanto, o pico de produção da IL-10 ocorre ao mesmo tempo que o do TNF-α que é uma citocina proinflamatória com papel central na patogênese do choque endotóxico.

Outros estudos sustentam que a IL-10 pode ser uma ferramenta importante no tratamento do choque endotóxico (sepse) já que a injeção de IL-10 em camundongos induzidos a endotoxemia com LPS impede a morte desses animais (Gerard et al., 1993; Howard et al., 1993). A endotoxemia provocada por LPS é um método bastante utilizado para os estudos de sepse principalmente porque a resposta do hospedeiro na sepse apresenta um desbalanço dos mediadores pró e antiinflamatórios.

Diante desta infinidade de moléculas é interessante ressaltar que os mecanismos celulares e moleculares pertinentes a inflamação podem não responder corretamente quando determinadas moléculas são inibidas ou deixam de exercer sua função. Isto pode acontecer, por exemplo, quando determinadas substâncias tóxicas são injetadas no organismo alterando o seu equilíbrio homeostático. Neste sentido, o veneno do peixe peçonhento *Thalassophryne nattereri* popularmente conhecido como niquim, constitui uma ferramenta importante para o estudo da inflamação já que estudos desenvolvidos pelo nosso grupo mostram uma resposta inflamatória irregular nos acidentes causados por estes animais.

O *Thalassophryne nattereri* (Fig. 2A) pertence à família *Batrachoididae* e são agrupados em 15 espécies, das quais quatro são encontradas no Brasil: *Thalassophryne nattereri*, *Thalassophryne punctata*, *Thalassophryne reticulata* e *Thalassophryne amazonica*. No entanto, os únicos relatos de acidentes referem-se à espécie *T. nattereri* (Fróes 1933a,b,c). Este peixe é encontrado ao longo da costa norte e nordeste do Brasil, principalmente no encontro de águas marinhas e fluviais, vivendo entre rochedos ou plantas marinhas encobertos pela areia ou lodo e em locais relativamente rasos. O *T. nattereri* possui o mais completo aparelho inoculador de veneno, consistindo de quatro espinhos, sendo dois localizados na região dorsal e um em cada lateral (Fig. 2B). Todos os espinhos possuem comunicação com as glândulas produtoras e reservatórios de veneno. Os espinhos são canaliculados, de forma cônica, pontiagudos e se articulam com o plano ósseo subjacente, encontrando-se encobertos por um prolongamento de pele do peixe que serve como bainha (Fig. 2C).

Os acidentes provocados pelo *T. nattereri* geram um importante problema de ordem médica, econômica e social e já foram notificados em Salvador (Almeida e Rocha, 1989), Alagoas (Auto, 1992), Fortaleza (Facó et al., 2005), Natal e Pará (Haddad Jr et al., 2003) afetando principalmente pescadores e turistas. O envenenamento ocorre através da liberação do veneno pelos espinhos por meio da pressão exercida por áreas corpóreas, como a região plantar ou palmar. Um dos principais sintomas decorrentes do envenenamento provocado pelo peixe *T. nattereri* é a dor que se instala imediatamente após o acidente e é de grande intensidade segundo relato das vítimas. Eritema e edema também são notados de imediato com eflorescência de bolhas com conteúdo seroso. Estes acidentes evoluem para necrose, que na maioria das vezes se instala precocemente após o acidente e permanece

Figura 2* – Peixe peçonhento *Thalassophryne nattereri*.

(A)

(B)

(C)

Em A, temos a foto de um exemplar de *T. nattereri* coletado na Lagoa Mundaú no estado de Alagoas (IBAMA, 14693-1). Em seguida temos uma foto indicando a exata localização dos espinhos sendo dois na região dorsal e um em cada lateral do peixe (B). O aparato inoculador de veneno é esquematizado em C, mostrando que a pressão nas glândulas localizadas na base dos espinhos promove a passagem do veneno pelo canal do espinho. FONTE: Fotos e ilustrações gentilmente cedidas pela Dra. Monica Lopes-Ferreira (2001).

* Lopes-Ferreira M. São Paulo, 2001

por um longo período de tempo sem que haja um eficiente processo de cicatrização (Fonseca e Lopes-Ferreira, 2000).

Utilizando modelo murino conseguimos reproduzir os principais sintomas locais do envenenamento observado em humanos: dor, edema e necrose. Estes estudos demonstraram que diferente de outros venenos como os de serpentes ou de abelhas, os efeitos locais induzidos pelo veneno do peixe ocorrem independentemente da presença de toxinas com atividade hemorrágica além de ser desprovido de atividade fosfolipásica A2 (Lopes-Ferreira et al., 1998).

A análise histológica da lesão provocada pelo veneno mostrou a presença de edema, mionecrose, hiperemia e/ou congestão nas veias e vênulas, presença de trombos, além de pouco infiltrado celular inflamatório (Lopes-Ferreira et al., 2001). A reação inflamatória causada pelo veneno de *T. nattereri* provoca um atraso na remoção do material necrosado por parte das células inflamatórias (Lopes-Ferreira et al., 2001). Além disso, a injeção do veneno na pata de camundongos desenvolve uma resposta inflamatória celular inadequada apresentando um número reduzido de leucócitos no tecido lesado (Lima et al., 2003). Este comportamento também foi observado no músculo gastrocnêmio de camundongo onde a reação inflamatória induzida pelo veneno de *T. nattereri* revelou um infiltrado pobre em macrófagos e de leucócitos polimorfonucleares (Lopes-Ferreira et al., 2001).

Pareja-Santos et al. (2009) demonstraram que o veneno de *T. nattereri* altera a estrutura da matriz extracelular do coxim plantar de camundongos pela ativação de metaloproteinases de matriz como MMP-2 e MMP-9, além de diminuir o conteúdo de fibras colagenosas durante a fase de cicatrização da lesão. Foi também demonstrado que o veneno afeta a organização do citoesqueleto celular e a formação de *pseudopodia* de células epiteliais. Este cenário indica um papel ambíguo do veneno na resposta inflamatória. Por um lado ele demonstra uma potente atividade próinflamatória ilustrada pela super-regulação de mediadores inflamatórios, e por outro, ele afeta a habilidade de regeneração tecidual devido à desorganização da matriz extracelular causada pela atividade aumentada das MMPs, a qual dificulta a infiltração de células inflamatórias.

A caracterização das toxinas encontradas no veneno de *T. nattereri* foi realizada através da abordagem de química de proteínas (isolamento e sequenciamento de peptídeos internos e N-terminal) e de biologia molecular (transcriptoma da glândula venenífera do peixe e expressão dos cDNAs que codificam as toxinas). Utilizando estas abordagens foi

Figura 3 – Caracterização das toxinas majoritárias presentes no veneno de *Thalassophryne nattereri*.

Cromatografia de gel filtração da fração MS3 em coluna de HPLC mostrando a família de proteases Natterinas. A direita é possível observar uma eletroforese SDS-PAGE do veneno (1) mostrando a família de proteases Natterinas com peso molecular entre 30-45 kDa e a Nattectina 15 kDa. Na fração MS3 o SDS-PAGE confirmou a presença das Natterinas (2).

FONTE: Magalhães et al. (2005)

possível verificar a existência, na glândula venenífera do peixe, as seguintes toxinas (Fig. 3): a família das Natterinas, constituídas por 5 toxinas 1, 2, 3, 4 e P, na faixa de massa molecular de 30-45 kDa, que apresentam homologia entre si mas não com proteínas existentes nos bancos de dados, e a Nattectina com massa molecular de 15 kDa, que apresenta homologia com lectinas do tipo C (Magalhães et al., 2005, 2006). As Natterinas, como foram nomeadas, são capazes de induzir edema e nocicepção, além de clivar o cininogênio humano e peptídeos sintéticos derivados de cininogênio liberando Lys-BK e calidina (Magalhães et al., 2005).

Recentemente, nosso grupo demonstrou no trabalho de Komegae et al. (2011) que as Natterinas possuem a capacidade de se ligar e clivar o colágeno tipo I como também o colágeno tipo IV, impedindo a aderência de células HeLa e comprometendo a sobrevivência. A evidência da atividade de degradação e consequente remodelamento de componentes da matriz extracelular pelas toxinas Natterinas leva os autores a proporem mais um mecanismo

de ação que explica a deficiente migração e fixação de células inflamatórias no tecido inflamado.

Ainda, nosso grupo avaliou em camundongos a capacidade das Natterinas proteoliticamente ativas de induzir e manter resposta imune de memória com produção persistente de anticorpos e diferenciação de distintos subtipos de células B e de células secretoras de anticorpos de longa vida (ASC). Considerando que estímulos policlonais via TLR4 podem contribuir para as respostas imunes humorais e que a sinalização via TLR4 é suficiente para induzir e/ou manter a expressão de BLIMP-1 pelas células B, também foi avaliado o papel de TLR4 na modulação da resposta humoral induzida pelas Natterinas. Foi observado por Komegae et al. (2010) que TLR4 regula positivamente a fase inicial da síntese de anticorpos anafiláticos IgG1 e principalmente IgE induzidos pelas Natterinas e negativamente a produção tardia destes anticorpos. Ademais, observa-se uma dependência positiva da sinalização via TLR4 no controle tardio de células B1a na medula óssea e de ASC B220^{pos} ou ASC B220^{neg} no peritônio. Um controle negativo na resposta tardia de células B1a foi visto no peritônio, de B1b e B2 no peritônio e no baço, de B efetora/memória nos três compartimentos e de ASCs B220^{pos} ou ASC B220^{neg} no compartimento esplênico.

É importante ressaltar que a participação dos receptores *Toll* nas respostas inflamatórias induzidas por toxinas ou proteases animais ainda não é bem caracterizada. No entanto, dados da literatura mostram que proteases secretadas por helmintos (*Fasciola hepática*) bloqueiam a sinalização de TLR4 e TLR3 independente de MyD88 e dependente de TRIF. Este bloqueio provoca alterações na função dos macrófagos devido à degradação de TLR3 nos endossomos (Donnelly et al., 2010), indicando que proteases animais podem atuar sobre os receptores do tipo *Toll* ou na sua sinalização.

Com base nestas informações e nos estudos que revelam o potencial inibitório do veneno no recrutamento de células inflamatórias para o local da lesão e, ainda, considerando que as Natterinas são as toxinas majoritárias presentes no veneno de *T. nattereri* formulamos a hipótese que seriam as Natterinas as responsáveis pela inibição do recrutamento de leucócitos observada no envenenamento?

2 OBJETIVOS

Conhecendo o potencial inibitório do veneno do peixe *Thalassophryne nattereri* no recrutamento de células inflamatórias para o local da lesão e considerando que as Natterinas são as toxinas majoritárias presentes no veneno deste peixe o objetivo deste trabalho foi avaliar se as Natterinas apresentam ação inibitória no recrutamento de leucócitos durante a inflamação induzida por agentes inflamatórios conhecidos (LPS, KC ou agonista de PAR-4) utilizando principalmente a microscopia intravital. A microscopia intravital vem sendo amplamente utilizada para a caracterização de agentes inflamatórios e para pesquisa de novas drogas antiinflamatórias, onde é possível obter informações dos eventos dinâmicos na microvasculatura *in vivo*. Com esta técnica é possível estudar as interações leucócito-endotélio durante o processo inflamatório, observando os eventos celulares de rolamento, adesão e migração, em uma determinada vênula pós-capilar (Gavim e Chatterjee, 2004). Investigamos também os mecanismos pelos quais as Natterinas exercem o seu efeito inibitório, avaliando a influência da sua atividade proteásica, a participação dos receptores do tipo Toll (TLR2 e TLR4) e da sinalização MyD88 e a participação de reguladores negativos endógenos neste processo. Finalmente, investigamos se as Natterinas conseguem reverter a inflamação presente em animais com endotoxemia provocada por LPS. O estabelecimento de um modelo murino com o uso da microscopia intravital e de animais deficientes em receptores do tipo *Toll* permitirá a ampliação do entendimento dos mecanismos negativos de regulação da resposta inflamatória.

3 ETAPAS REALIZADAS

Neste trabalho avaliamos se as Natterinas apresentam ação inibitória no recrutamento de leucócitos durante a inflamação induzida por agentes inflamatórios conhecidos (LPS, KC ou agonista de PAR-4) utilizando principalmente a microscopia intravital e modelo de migração na cavidade peritoneal de camundongos. A microscopia intravital vem sendo amplamente utilizada para o entendimento da fisiopatologia da inflamação, além da caracterização de agentes inflamatórios e para pesquisa de novas drogas antiinflamatórias, onde é possível obter informações dos eventos dinâmicos na microvasculatura *in vivo*. Com esta técnica é possível estudar as interações leucócito-endotélio durante o processo inflamatório, observando os eventos celulares de rolamento, aderência e transmigração em vênula pós-capilar, bem como estudar as alterações do fluxo sanguíneo e do diâmetro dos vasos. Ao notarmos que as Natterinas, proteases presentes no veneno do peixe *Thalassophryne nattereri*, são capazes de inibir o recrutamento de leucócitos induzido pela quimiocina KC e por LPS investigamos a participação de reguladores negativos endógenos da inflamação, tais como os corticóides, a enzima de resposta ao estresse Heme Oxigenase-1 (HO-1), o antagonista do receptor de IL-1 (IL-1Ra) ou a citocina antiinflamatória IL-10. Também verificamos se as proteases Natterinas poderiam clivar a quimiocina KC já que dados da literatura mostram que proteases animais podem clivar esta quimiocina. O mecanismo de ação das Natterinas foi investigado utilizando animais deficientes em TLR2, TLR4 e MyD88 previamente tratados com as Natterinas e aplicados topicamente no músculo cremáster com LPS ou KC para a indução do rolamento de leucócitos. A participação de moléculas sinalizadoras como PI3K e serina/treonina fosfatases do tipo 1, assim como a atividade do proteassoma 26S também foram investigadas. Finalmente, para validarmos o efeito inibitório das Natterinas *in vivo*, investigamos o seu efeito inibitório no modelo de endotoxemia provocada por LPS obtido das bactérias *Escherichia coli* e *Salmonella abortus equi*.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados para a realização deste estudo camundongos machos das seguintes linhagens: Swiss e C57BL/6 selvagens (WT) provenientes do Instituto Butantan e C57BL/6 deficientes no gene de MyD88 (MyD88 KO), IL-10 (IL-10 KO) ou de TLR2 (TLR2 KO), C3H/Hepas selvagens (WT) ou mutantes no gene de TLR4 (C3H/HeJ) provenientes da Universidade de São Paulo, todos pesando entre 18 e 20 g. Os animais foram mantidos no Biotério do Laboratório Especial de Toxinologia Aplicada em estantes ventiladas sob condições controladas de temperatura, umidade e iluminação (Ciclo claro/escuro 12 h) com água e ração *ad libitum*, até a execução do procedimento experimental. Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com os princípios éticos adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e pela Comissão de Ética em Experimentação Animal do Instituto Butantan (723/10) e do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (311/09 e 92/10).

4.2 Obtenção e inativação das Natterinas

As Natterinas foram obtidas segundo protocolo padronizado em nosso laboratório (Magalhães et al., 2005). Para a realização dos nossos ensaios a concentração proteica das Natterinas foi determinada colorimetricamente pelo método de Bradford (1976), usando como padrão soro albumina bovina (Sigma – Chemical Company; ST. Louis, MO, USA) e posteriormente foi estocada a -20 °C até a sua utilização. A presença de endotoxina nas amostras foi avaliada pelo teste de LAL (Limulus Amebocyte Lysate) de acordo com as instruções do fabricante (BioWhittaker Inc., Walkersville, MD). Para a inativação das Natterinas, amostras contendo 1 mL de Natterinas a 0,02 µg/mL foram fervidas a 98 °C por 5 min.

4.3 Tratamento com as Natterinas e agentes inflamatórios

Inicialmente foi realizada uma padronização para escolher a melhor concentração e o tempo de tratamento com as Natterinas para a análise da microcirculação. Para isto, camundongos machos foram previamente tratados por via intraescrotal com 50 µL de Natterinas nas concentrações de 10 µg/mL, 1 µg/mL ou 0,1 µg/mL diluídas em solução salina 0,9% por um período de 2 h ou ainda 0,02 µg/mL diluídas em salina 0,9% por um período de 6 h. A concentração de Natterinas escolhida para o pré-tratamento foi aquela que não provocou a estase total dos vasos, 0,02 µg/mL no tempo de 6 h de tratamento. Seis horas após o pré-tratamento com as Natterinas, os animais foram anestesiados e tiveram o músculo cremaster exposto para aplicação tópica de 20 µL dos seguintes agentes a) Salina 0,9% esteril; b) LPS a 0,02 µg/mL (*E. coli* 055:B5); c) KC a 0,01 µg/mL (453-KC – R&D System); d) agonista de PAR-4 a 0,02 µg/mL (agPAR-4, A3227 - Sigma).

4.4 Avaliação por microscopia intravital do rolamento de leucócitos

A microscopia intravital vem sendo amplamente utilizada para a caracterização de agentes inflamatórios e para pesquisa de novas drogas antiinflamatórias, onde é possível obter informações dos eventos dinâmicos na microvasculatura *in vivo*. Com esta técnica é possível estudar as interações leucócito-endotélio durante o processo inflamatório, observando os eventos celulares de rolamento, adesão e migração em vênulas pós-capilares (Gavins e Chatterjee, 2004).

Para a realização dos experimentos, camundongos machos pré-tratados ou não com as Natterinas foram deixados por um período de 6 h, após o qual foram anestesiados por via intraperitoneal (i.p.) com 150 µL de solução relaxante 1:4 (Xilazina: PBS 1x, *Calmium*®, *Agener União*, Brasil, Cod. 039-0643) seguida da injeção de 0,1 mL de Quetamina (*Holliday-Scott SA*-. Buenos Aires, cod. 042-0823) para cada 10 g de peso corpóreo. Em seguida foram mantidos sobre uma placa quente com temperatura controlada (37 °C) e, com o auxílio de uma tesoura e pinça de ponta fina, o músculo cremaster foi exposto. Imediatamente após a exposição do cremaster, os agentes inflamatórios LPS e KC ou agonista de PAR-4 foram aplicados topicamente no volume de 20 µL e a contagem do número de leucócitos em rolamento se fez em uma vênula pós-capilar selecionada de diâmetro entre 25 a 40 µm. A

contagem de leucócitos foi realizada a cada 10 min da aplicação do agente inflamatório e os animais foram mantidos por um período de observação de 30 min. O experimento foi realizado em um microscópio óptico (Axio Imager A.1, Carl-Zeiss, Germany) com máquina fotográfica (IcC 1, Carl-Zeiss, Germany) acoplada ao sistema. As imagens foram posteriormente analisadas com o auxílio do programa Axiovision 4.6 (Carl-Zeiss).

4.5 Avaliação da participação de reguladores endógenos no efeito inibitório das Natterinas

Para verificar o papel de reguladores endógenos tais como os corticóides, a enzima Heme oxigenase-1 (HO-1), ou o antagonista do receptor de IL-1R (IL-1Ra) no efeito inibitório das Natterinas, grupos independentes de camundongos da linhagem Swiss foram submetidos a um tratamento antes da aplicação das Natterinas. Os animais foram previamente injetados por via i.p. com:

- a) 200 µL de Metirapone a 0,5 mg/mL (inibidor da síntese de glicocorticoides, SIGMA, M2696) 2 vezes ao dia por 3 dias consecutivos de acordo com Georén et al. (2005) ou;
- b) 200 µL de Zinco protoporfirina a 1 mg/mL (ZnPPIX - inibidor da enzima HO-1, SIGMA, 282820) 2 vezes ao dia por 1 dia de acordo com Lin et al. (2010) e Kato et al. (2001); ou ainda com;
- c) 500 µL de anti-IL-1Ra a 5 µg/mL (antagonista do receptor de IL-1R, BD Pharmingen™, 553693) 30 min antes.
- d) Para avaliação do papel imunomodulador da citocina IL-10 no efeito inibitório das Natterinas foram utilizados animais C57BL/6 deficientes no gene de IL-10 (IL-10 KO).

4.6 Análise da participação de reguladores negativos da sinalização TLR no efeito inibitório das Natterinas

Para investigar se o efeito inibitório das Natterinas é dependente da geração de reguladores negativos intracelulares ou solúveis, grupos independentes de camundongos Swiss machos foram tratados por via i.p. com:

- a) inibidor de proteassomo 26S MG132 a 10 μ M (*proteinase inhibitor* – Sigma, C2211) ou;
 - b) inibidor de serina/treonina fosfatases IPP-1 a 10 nM (*specific inhibitor of Type-1 protein serine/threonine phosphatases* - PP1 Sigma, P2745) ou;
 - c) Wortmannin a 0,005 μ M (*specifically inhibits phosphatidylinositol 3-kinase* – Sigma, W1628);
- todos 30 min antes do pré-tratamento com as Natterinas.

4.7 Análise da degradação proteolítica da quimiocina KC pelas Natterinas

Para avaliação da ação proteolítica das Natterinas sobre a quimiocina KC, incubamos por 1 h a 37 °C as Natterinas e a KC em concentrações equivalentes (0,02 μ g/mL). Após a incubação, as amostras foram entregues ao setor de Proteômica do Laboratório Especial de Toxinologia Aplicada para análise. A mistura foi filtrada em filtro com poro de 10 kDa e o filtrado analisado por espectrometria de massas MALDI-TOF, em um sistema Ettan MALDI-TOF/Pro (Amersham Biosciences, Suécia). As amostras em solução foram misturadas na proporção de 1:1 com uma solução supersaturada de matriz para proteínas (ácido sinápico), depositadas em placa de metal (0.4 a 0.8 μ l) e deixadas para secar em temperatura ambiente. Foi utilizado o modo automático de controle do equipamento e aquisição de dados que foram analisados por um *software*.

4.8 Análise da migração de células para a cavidade peritoneal

Para investigar o efeito inibitório das Natterinas no recrutamento celular para a cavidade peritoneal, camundongos machos, C57BL/6 (WT) ou TLR2 KO, mutantes de TLR4 (C3H/Hej) ou seu controle C3H/HePas foram tratados no dorso por via subcutânea com 100 μ L de Natterinas a 0,02 μ g/mL. Após 6 h da aplicação, os animais foram aplicados por via i.p. com 500 μ L de KC a 0,01 μ g/mL. Após 2 h da injeção de KC nos animais tratados ou não com as Natterinas, tiveram a cavidade peritoneal lavada com 5 mL de tampão PBS + EDTA 10 mM para obtenção da suspensão celular. Em seguida, o material coletado foi centrifugado a 269.64 g a 4 °C por 10 min, o sobrenadante separado e o botão celular foi ressuspenso em PBS + 0,1% BSA para contagem celular. A contagem total de leucócitos foi efetuada em

câmara de Neubauer na diluição de 1:10 em solução Turk (0,2% azul de cristal de violeta em 30% de ácido acético). Para a contagem diferencial, alíquotas contendo 100 µL das suspensões celulares foram aplicadas em lâminas de vidro, submetidas a centrifugação em centrífuga Cytospin e coradas com kit Hema-3 Stain Set (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA) para a contagem de neutrófilos em microscópio óptico Nikon ECLIPSE E200 com objetiva de 40x, de acordo com os aspectos morfológicos como descrito em Cook et al. (2003).

4.9 Indução de sepse pela injeção de LPS

Para avaliar o efeito das Natterinas na inibição da endotoxemia provocada pelo LPS camundongos Swiss machos foram tratados ou não com 100 µL das Natterinas a 0,06 mg/mL no dorso por via subcutânea. Após 6 h do tratamento com as Natterinas os animais receberam uma única dose de LPS de *E. coli* ou de *S. abortus equi* (Sigma). Doses de 1,5 mg/Kg ou de 30 mg/Kg foram administrada por via i.p. diluídas em 500 µL salina 0,9%. A partir desse instante os animais foram observados periodicamente a cada 1 h para a verificação de morte por um período de 48 h. Após 4 ou 48 h de injeção do LPS, os animais foram mortos para lavagem da cavidade peritoneal e obtenção da suspensão celular para contagem total e diferencial das células como descrito acima. A porcentagem de animais sobreviventes foi calculada em relação ao número inicial de animais (n = 5).

4.10 Análise estatística

As diferenças estatísticas entre os grupos experimentais foram detectadas após análise de variância (One-Way ANOVA), seguido do teste paramétrico Bonferroni. Todas as análises foram realizadas no programa Prism (Graph Pad Software) e as diferenças entre os grupos foram consideradas significativas para valores de $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Efeito das Natterinas no rolamento de leucócitos induzido pelo agonista do receptor PAR-4

Inicialmente, definimos a concentração ideal das Natterinas e o melhor tempo de tratamento dos animais (Fig. 4). Para isto, pela via intraescrotal foram injetadas soluções contendo as Natterinas nas seguintes concentrações: 10, 1 ou 0,1 µg/mL diluídas em solução salina 0,9% estéril e os animais foram deixados por um período de 2 h antes da avaliação da microcirculação. Também foi testada a concentração de 0,02 µg/mL por um período de 6 h. Após a exposição e análise da microcirculação revelou-se que todas as concentrações testadas no período de 2 h induziram estase total das vênulas de pequeno calibre, com fluxo normal apenas nas vênulas de maior calibre. Além disso, o fluxo sanguíneo não foi reestabelecido aos 30 min de observação. A análise do cremaster após a injeção intraescrotal das Natterinas a 0,02 µg/mL não demonstrou danos no fluxo normal na microcirculação. Dessa forma, a concentração de 0,02 µg/mL e o tempo de tratamento de 6 h foram escolhidos para os ensaios de microscopia intravital.

Investigações recentes apontam uma possível contribuição dos receptores ativados por proteases (PAR) na inflamação assim como no processo de captura, adesão e transmigração de leucócitos. Estes receptores foram descobertos recentemente e pertencem a superfamília de receptores acoplados a proteína G. Eles são ativados por serino-proteinases através da clivagem proteolítica do seu domínio N-terminal e, até o momento, quatro tipos de PARs foram identificados: PAR1, PAR2, PAR3 e PAR4 (Vergnolle, 2009). Nossos resultados apresentados na Figura 5 mostram que o agonista de PAR-4 (agPAR4, GYPGQV), aplicado topicamente é capaz de induzir aumentado rolamento de leucócitos nas vênulas pós-capilares em relação aos animais controles negativos, permanecendo assim durante todo o tempo de observação. Os animais tratados previamente com as Natterinas continuaram apresentando aumentado rolamento de leucócitos induzido pelo agonista de PAR-4, indicando que as Natterinas não interferem na ligação do peptídeo GYPGQV ao receptor PAR-4 e permitem assim a sinalização e ativação leucocitária.

Figura 4 - Padronização da concentração e do tempo de tratamento com as Natterinas.

Camundongos Swiss machos foram tratados por via intraescrotal com as Natterinas nas concentrações de 10 $\mu\text{g/mL}$, 1 $\mu\text{g/mL}$ e 0,1 $\mu\text{g/mL}$ por 2 horas (**A-C**) ou 0,02 $\mu\text{g/mL}$ por 6 horas (**D**). Após os diferentes períodos de tempo, os animais foram anestesiados e tiveram o músculo cremaster exposto para a análise da microcirculação por um período de 30 minutos. Nas figuras **A-C** observamos estase em vênulas pós-capilares e em **D** verificamos um fluxo normal nas vênulas pós-capilares com rolamento de leucócitos.

FONTE: Ferreira (2012)

Protocolo experimental: figura 5

Figura 5 - As Natterinas não revertem o rolamento de leucócitos induzido pelo agonista de PAR4.

Camundongos Swiss machos foram tratados por via intraescrotal com salina ou com 50 µL de Natterinas (0,02 µg/mL) e após 6 h foram anestesiados e tiveram o músculo cremaster exposto para a indução do rolamento de leucócitos pela aplicação tópica de 20 µL do agPAR4 (0,02 µg/mL). Animais previamente tratados com salina e topicamente aplicados com salina foram considerados controles negativos. Os animais foram mantidos por 30 min para observação do rolamento de leucócitos nas vênulas pós-capilares. As barras representam a média de 6 animais por grupo acrescida do desvio-padrão. * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle negativo.

FONTE: Ferreira (2012)

5.2 As Natterinas inibem o rolamento de leucócitos induzido pela quimiocina KC

Outro agente inflamatório utilizado para testar o efeito das Natterinas foi a quimiocina KC (CXCL1), homóloga da IL-8 humana (CXCL8) e integrante da família de quimiocinas CXC que atua como um importante quimioatrator de neutrófilos pela sua interação com os receptores CXCR1 e CXCR2 presentes na membrana plasmática das células. Desta forma fica possível a investigação de regulação negativa especificamente sobre o rolamento de neutrófilos.

Nossos resultados na Figura **6A** mostram que os animais tratados com salina e aplicados topicamente com KC apresentaram aumentado rolamento de neutrófilo por até 30 min em comparação com o grupo-controle. Podemos ainda observar que os animais previamente tratados com as Natterinas e aplicados topicamente com KC continuaram a apresentar intenso rolamento de leucócitos por até 20 min, porém aos 30 min observamos uma significativa diminuição no rolamento de leucócitos, indicando que eventos transcricionais podem estar envolvidos na inibição.

Paralelamente aos ensaios realizados com a aplicação isolada de KC, avaliamos se as Natterinas por apresentarem atividade proteolítica poderiam agir sobre esta quimiocina, degradando-a e impedindo a sua ação sobre neutrófilos. Para isso, as Natterinas foram incubadas com a KC por 1 h a 37 °C e, posteriormente, a mistura (Natterinas + KC) foi aplicada topicamente no músculo cremaster dos animais. Os resultados na Figura **6B** revelam que a aplicação tópica da mistura Natterinas + KC induz um aumentado rolamento de leucócitos em relação ao grupo-controle até 20 min de observação, seguido de significativa diminuição aos 30 min da aplicação, resultado semelhante ao anterior. Isto indica que a ação das Natterinas na inibição do rolamento não está associada à ação proteolítica sobre a KC, mas sim por outro mecanismo. Este resultado foi confirmado por espectrometria de massas que demonstra a presença na solução incubada de KC com as Natterinas de um componente com massa de 8251,833 Da no filtrado Y10, indicativo da quimiocina KC intacta (8 kDa). Este resultado demonstra que as Natterinas não degradaram proteoliticamente a quimiocina KC (Fig. **6C**).

Protocolo experimental: figura 6

Figura 6 - As Natterinas inibem tardiamente o rolamento de leucócitos induzido pela KC sem clivar a quimiocina.

Camundongos Swiss machos foram tratados por via intraescrotal com salina ou com 50 µL de Natterinas (0,02 µg/mL) e após 6 h foram anestesiados e tiveram o músculo cremaster exposto para a indução do rolamento de leucócitos pela aplicação tópica de 20 µL de KC (0,01 µg/mL) (**A**) ou de 20 µL da mistura de Natterinas (0,02 µg/mL) + KC (0,01 µg/mL), previamente incubada a 37 °C por 1 h (**B**). A mistura Natterinas+KC também foi analisada por espectrometria de massas (**C**). Animais previamente tratados com salina e topicamente aplicados com salina foram considerados controles negativos. Os animais foram mantidos por 30 min para observação do rolamento de leucócitos nas vênulas pós-capilares. As barras representam a média de 6 animais por grupo acrescida do desvio-padrão. * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle negativo, # $p < 0,05$ comparado ao grupo KC.

FONTE: Ferreira (2012)

5.3 A inibição pelas Natterinas do rolamento de leucócitos induzido pela KC é dependente da sinalização TLR2/TLR4

Poucos estudos na literatura investigam como os eventos de sinalização de superfície celular (como a ligação de KC aos receptores CXCR) são influenciados pela ativação de receptores TLR, uma circunstância provável de ocorrer durante uma infecção microbiana. De forma a confirmar o papel dos TLR no efeito inibitório das Natterinas no rolamento de leucócitos, animais TLR2 *KO* ou TLR4 mutantes e seus respectivos controles (C57BL/6 *WT* e C3H/Hepas) foram tratados por via intraescrotal com as Natterinas (0,02 µg/mL) e após 6 h, aplicados topicamente com KC a 0,01 µg/mL.

Conforme indicado na Figura 7, o aumentado número de leucócitos rolantes nos animais C57BL/6 *WT*, aplicados topicamente com KC, foi reduzido pelo tratamento prévio com as Natterinas durante os 30 min de observação. Quando os animais TLR2 *KO* foram tratados previamente com as Natterinas, a aplicação tópica de KC continuou gerando um aumento no número de leucócitos rolantes durante todo o período de observação, mostrando que o efeito inibitório das Natterinas é dependente da via de sinalização TLR2. Ademais, podemos observar neste resultado que o rolamento de leucócitos induzido por KC nos animais C57BL/6 *WT* foi quase 3 vezes maior que o rolamento induzido nos animais Swiss (Fig. 5) e também que a ausência de TLR2 prejudica a intensidade do rolamento de leucócitos induzido pela KC nos animais TLR2 *KO* em relação aos animais C57BL/6 *WT*.

Na Figura 8 observamos que o tratamento dos animais C3H/Hepas (*WT*) com as Natterinas inibiu totalmente o rolamento de leucócitos induzido pela KC, atingindo números de leucócitos rolantes iguais ao do grupo-controle. O aumentado número de leucócitos em rolamento induzido pela KC nos animais C3H/HeJ, mutantes de TLR4, foi intensificado nos animais previamente tratados com as Natterinas, indicando uma dependência de TLR4 no efeito inibitório. Ademais, podemos observar neste resultado que a ausência de TLR4 prejudica a intensidade do rolamento de leucócitos induzido pela KC nos animais C3H/HeJ em relação aos C3H/Hepas (*WT*).

Protocolo experimental: figura 7

Figura 7 - Dependência positiva da sinalização TLR2 na inibição pelas Natterinas do rolamento de leucócitos induzido pela KC.

Camundongos C57BL/6 (WT) ou TLR2 KO foram tratados por via intraescrotal com salina ou com 50 µL de Natterinas (0,02 µg/mL) e após 6 h foram anestesiados e tiveram o músculo cremaster exposto para aplicação tópica de 20 µL de KC (0,01 µg/mL). Animais previamente tratados com salina e topicamente aplicados com salina foram considerados controles negativos. Os animais foram mantidos por 30 min para observação do rolamento de leucócitos nas vênulas pós-capilares. As barras representam a média de 6 animais por grupo acrescida do desvio-padrão. * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle negativo, # $p < 0,05$ comparado ao grupo KC.

FONTE: Ferreira (2012)

Protocolo experimental: figura 8

Figura 8 - Dependência positiva da sinalização TLR4 na inibição pelas Natterinas do rolamento de leucócitos induzido pela KC.

Camundongos C3H/Hepas (WT) ou C3H/Hej (mutante de TLR4) foram tratados por via intraescrotal com salina ou com 50 µL de Natterinas (0,02 µg/mL) e após 6 h foram anestesiados e tiveram o músculo cremaster exposto para aplicação tópica de 20 µL de KC (0,01 µg/mL). Animais previamente tratados com salina e topicamente aplicados com salina foram considerados controles negativos. Os animais foram mantidos por 30 min para observação do rolamento de leucócitos nas vênulas pós-capilares. As barras representam a média de 6 animais por grupo acrescida do desvio-padrão. * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle negativo, # $p < 0,05$ comparado ao grupo KC.

FONTE: Ferreira (2012)

5.4 As Natterinas inibem também o extravasamento de neutrófilos de maneira dependente da sinalização TLR2/TLR4

Nossos resultados apresentados nas Figuras **5** a **8** demonstram que as Natterinas exercem efeito inibitório no rolamento de leucócitos induzido pela quimiocina KC que é positivamente regulado por sinais derivados da coativação dos receptores TLR2 e TLR4. Porém, resta investigarmos se as Natterinas conseguem igualmente inibir o recrutamento dos leucócitos para o sítio da lesão, ou seja, agindo não somente na etapa do rolamento, mas também na aderência e consequentemente no extravasamento dos neutrófilos pelas junções endoteliais.

Assim, avaliamos em um modelo *in vivo* de recrutamento celular a migração de neutrófilos induzida pela injeção i.p. de KC (0,01 µg/mL) para a cavidade peritoneal de animais deficientes em TLR2 e TLR4 tratados subcutaneamente com as Natterinas. Observamos que nos animais C57BL/6 (WT) (Fig. **9A**) e C3H/Hepas (WT) (Fig. **10A**) a KC aumentou o recrutamento total de células para o peritônio quando comparado com o grupo controle e, paralelamente, também aumentou significativamente o recrutamento de neutrófilos para a cavidade peritoneal (Fig. **9B** e **10B**). Por outro lado, o tratamento dos animais C57BL/6 (WT) e C3H/Hepas com as Natterinas inibiu significativamente o recrutamento de leucócitos totais, mas apenas os animais C57BL/6 (WT) tratados com as Natterinas apresentaram redução de neutrófilos (Fig. **9B**).

Ao utilizarmos animais deficientes em TLR2 (Fig. **9A** e **9B**) observamos que nos animais tratados com as Natterinas tanto o número total de células quanto o de neutrófilos continuou elevado em comparação ao grupo KC, demonstrando que o recrutamento de leucócitos induzido pela KC, particularmente de neutrófilos, para a cavidade peritoneal é dependente de TLR2. Já nos animais mutantes de TLR4 (Fig **10A** e **10B**) o recrutamento total de leucócitos e de neutrófilos permaneceu elevado nos 3 grupos avaliados, indicando também que a presença de TLR4 é importante para garantir o efeito inibitório das Natterinas. Em conjunto, conseguimos demonstrar que as Natterinas agem não somente na etapa do rolamento, mas também na aderência e na transmigração de neutrófilos pelas junções endoteliais limitando o recrutamento para o sítio da lesão. Ainda a inibição das Natterinas no rolamento e no extravasamento induzido pela KC também é dependente da expressão dos receptores TLR2 e TLR4.

Protocolo experimental: figura 9

Figura 9 - Dependência positiva da sinalização TLR2 na inibição pelas Natterinas do extravasamento de leucócitos induzido pela KC.

A)

B)

Camundongos C57BL/6 (WT) ou TLR2 KO foram tratados por via subcutânea com salina ou com 100 µL de Natterinas (0,02 µg/mL) e após 6 h foram injetados por via i.p. com 500 µL de KC (0,01 µg/mL). Animais previamente tratados com salina e injetados i.p. com salina foram considerados controles negativos. Após 2 h os animais foram mortos e tiveram a cavidade peritoneal lavada para coleta da suspensão celular que foi processada para contagem total das células (A) ou de neutrófilos (B). As barras representam a média de 6 animais por grupo acrescida do desvio-padrão. * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle negativo, # $p < 0,05$ comparado ao grupo KC.

FONTE: Ferreira (2012)

Protocolo experimental: figura 10

Figura 10 - Dependência positiva da sinalização TLR4 na inibição pelas Natterinas do extravasamento de leucócitos induzido pela KC.

A)

B)

Camundongos C3H/Hepas (WT) ou C3H/Hej (mutantes de TLR4) foram tratados por via subcutânea com salina ou com 100 µL de Natterinas (0,02 µg/mL) e após 6 h foram aplicados por via i.p. com 500 µL de KC (0,01 µg/mL). Animais previamente tratados com salina e injetados i.p. com salina foram considerados controles negativos. Após 2 h os animais foram mortos e tiveram a cavidade peritoneal lavada para coleta da suspensão celular que foi processada para contagem total de células (A) ou de neutrófilos (B). As barras representam a média de 6 animais por grupo acrescida do desvio-padrão. * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle negativo, # $p < 0,05$ comparado ao grupo KC.

FONTE: Ferreira (2012)

5.5 A inibição pelas Natterinas do rolamento de leucócitos induzido pelo LPS é independente da atividade proteolítica ou do tempo de aplicação

LPS é o maior componente da membrana de bactérias gram-negativas e apresenta a característica de ativar o sistema imune de forma complexa. A ativação de células pelo LPS é iniciada pela interação com TLR4 em complexo com CD14 e MD2 na superfície celular e a subsequente recrutamento de moléculas adaptadoras MyD88 e TRIF para o domínio intracelular de TLR4 (Akira e Takeda, 2004; Kawai e Akira, 2007). Para avaliar se as Natterinas também são capazes inibir o recrutamento de leucócitos induzido pelo LPS e, ainda, para saber o papel da atividade proteásica neste processo, os animais receberam tratamento intraescrotal com as Natterinas (0,02 µg/mL) ativas ou inativas (pelo calor).

Na Figura **11** observamos que a aplicação tópica de LPS nos animais tratados com salina induziu um aumentado rolamento de leucócitos a partir de 10 min em comparação ao grupo-controle, continuando assim até o final da observação. Já os animais tratados previamente com as Natterinas ativas ou mesmo com as inativas apresentaram imediatamente após a aplicação tópica do LPS uma diminuição até 30 min do número de leucócitos rolantes. Estes resultados demonstram que as Natterinas são capazes de agir na microcirculação inibindo o rolamento de leucócitos induzido por um agente inflamatório derivado de bactérias gram-negativas (LPS), efeito independente da sua atividade proteásica. Em seguida avaliamos se as Natterinas seriam capazes de inibir o rolamento de leucócitos induzido pelo LPS se aplicadas conjuntamente, sem a necessidade de aplicação prévia. Ainda na Figura **11** podemos observar que a aplicação tópica da mistura previamente incubada de Natterinas + LPS manteve inibido o rolamento de leucócitos em comparação ao grupo LPS e ao grupo tratado previamente com as Natterinas.

Protocolo experimental: figura 11

Figura 11.- A inibição pelas Natterinas do rolamento de leucócitos induzido pelo LPS independe da atividade proteolítica ou do tempo do tratamento

Camundongos Swiss machos foram tratados por via intraescrotal com salina ou com 50 µL de Natterinas (0,02 µg/mL) ativas ou inativas (98 °C, 5 min) e após 6 h foram anestesiados e tiveram o músculo cremaster exposto para aplicação tópica de 20 µL de LPS (*E coli* 055:B5, 0,02 µg/mL). Um grupo independente de animais tratados por via intraescrotal com salina foram aplicados topicamente com 20 µL da mistura de Natterinas (0,02 µg/mL) + LPS (0,02 µg/mL), previamente incubada a 37 °C por 1 h. Animais previamente tratados com salina e topicamente aplicados com salina foram considerados controles negativos. Os animais foram mantidos por 30 min para observação do rolamento de leucócitos nas vênulas pós-capilares. As barras representam a média de 6 animais por grupo acrescida do desvio-padrão. * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle negativo; # $p < 0,05$ comparado ao grupo LPS, & $p < 0,05$ comparado ao grupo Natterinas-LPS.

FONTE: Ferreira (2012)

5.6 A inibição pelas Natterinas do rolamento de leucócitos induzido pelo LPS é dependente de MyD88 e TLR2

Com a finalidade de estabelecer o mecanismo pelo qual as Natterinas exercem o seu efeito inibitório, avaliamos a contribuição dos receptores do tipo Toll (TLR) e da sua sinalização MyD88 no fenômeno. Na Figura **12** observamos que os animais C57BL/6 (*WT*) tratados com salina e aplicados topicamente com LPS apresentaram um aumentado número de leucócitos rolantes já aos 10 min de observação que embora tenha diminuído com o tempo de observação ainda se apresentou maior que os animais controle e em relação aos leucócitos rolantes induzidos nos animais Swiss (Fig. **10**). Nestes animais C57BL/6 (*WT*) o tratamento prévio com as Natterinas inibiu significativamente o rolamento de leucócitos induzido pelo LPS por todo o período. Já os animais MyD88 *KO* tratados com salina e aplicados topicamente com LPS também apresentaram aumento no rolamento de leucócitos durante todo o período de observação. Quando estes animais foram tratados previamente com as Natterinas a aplicação tópica de LPS continuou gerando um aumento de rolamento de leucócitos durante todo o período de observação, mostrando que o efeito inibitório das Natterinas é dependente da sinalização MyD88.

Na Figura **13** é possível notar que as Natterinas inibiram o rolamento de leucócitos induzido pelo LPS nos animais C57BL/6 (*WT*) e também parcialmente nos primeiros 10 min da aplicação nos animais TLR2 *KO*. Porém após 20 min da aplicação tópica de LPS nestes animais TLR2 *KO* tratados previamente com as Natterinas, observamos uma restauração do rolamento de leucócitos, mostrando que o efeito inibitório das Natterinas é dependente da sinalização via TLR2.

Estes resultados em conjunto além de indicarem uma regulação negativa imediata das Natterinas na ação inflamatória de LPS e tardia na ação inflamatória de KC mostram que o efeito inibitório das Natterinas é dependente da sinalização TLR2-TLR4/MyD88. Assim, podemos descartar a hipótese de que as Natterinas se comportem como moléculas neutralizadoras de LPS e sugerir a possibilidade de uma ação competitiva entre as Natterinas e os agonistas inflamatórios pela ligação ao receptor, indicando uma ação antagonista de TLR para as Natterinas.

Protocolo experimental: figuras 12 e 13

Figura 12 - Dependência positiva da sinalização MyD88 na inibição pelas Natterinas do rolamento de leucócitos induzido pela LPS

Camundongos C57BL/6 (WT) ou MyD88 KO foram tratados por via intraescrotal com salina ou com 50 µL de Natterinas (0,02 µg/mL) e após 6 h foram anestesiados e tiveram o músculo cremaster exposto para aplicação tópica de 20 µL de LPS (*E coli* 055:B5, 0,02 µg/mL). Animais previamente tratados com salina e topicamente aplicados com salina foram considerados controles negativos. Os animais foram mantidos por 30 min para observação do rolamento de leucócitos nas vênulas pós-capilares. As barras representam a média de 6 animais por grupo acrescida do desvio-padrão. * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle negativo; # $p < 0,05$ comparado ao grupo LPS.

FONTE: Ferreira (2012)

Figura 13.- Dependência positiva da sinalização TLR2 na inibição pelas Natterinas do rolamento de leucócitos induzido pela LPS

Camundongos C57BL/6 (WT) ou TLR2 KO foram tratados por via intraescrotal com salina ou com 50 µL de Natterinas (0,02 µg/mL) e após 6 h foram anestesiados e tiveram o músculo cremaster exposto para aplicação tópica de 20 µL de LPS (*E coli* 055:B5, 0,02 µg/mL). Animais previamente tratados com salina e topicamente aplicados com salina foram considerados controles negativos. Os animais foram mantidos por 30 min para observação do rolamento de leucócitos nas vênulas pós-capilares. As barras representam a média de 6 animais por grupo acrescida do desvio-padrão. * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle negativo; # $p < 0,05$ comparado ao grupo LPS.

FONTE: Ferreira (2012)

5.7 Análise da participação de reguladores endógenos da inflamação no efeito inibitório das Natterinas

Embora essencial para desencadear a resposta inflamatória, a expressão de genes pró-inflamatórios associados à ativação endotelial deve ser finamente regulada para se evitar ou prevenir o processo inflamatório deletério e, portanto, um dos mecanismos de regulação fina é a coexpressão de genes protetores (Bach et al., 1997). Com base nestas informações avaliamos o envolvimento de alguns reguladores endógenos no efeito inibitório das Natterinas. Os resultados apresentados na Figura **14** mostram que a inibição do rolamento de leucócitos promovida pelo tratamento com as Natterinas não foi revertida pelo tratamento prévio com Metirapone (inibidor da síntese de glicocorticoides) ou ZnPPiX (inibidor da enzima HO-1), o que demonstra que o efeito inibitório das Natterinas não ocorre por influência da liberação de corticoides ou pela ação da enzima HO-1.

Todos os receptores do tipo TLR (exceto por TLR3) e os membros da família de receptores IL-1 sinalizam via MyD88 que é o maior mediador da síntese de IL-1, uma potente citocina pró-inflamatória capaz de induzir múltiplas cascatas de sinalização que desencadeiam mecanismos de defesa para o organismo ou paradoxalmente contribuem para a injúria tecidual. Investigações recentes apontam uma possível contribuição do antagonista do receptor de IL-1 (IL-1Ra) no controle da inflamação induzida pela ativação de TLR4 (Zhao et al., 2010). Assim, avaliamos se o efeito inibitório das Natterinas poderia ocorrer devido à indução da produção do antagonista do receptor de IL-1 (IL-1Ra). Os resultados apresentados na Figura **15** mostram que a aplicação tópica de LPS nos animais tratados com salina aumentou o rolamento de leucócitos, permanecendo assim até o final da observação. Já os animais tratados previamente com as Natterinas tiveram o rolamento de leucócitos inibido após a aplicação tópica do LPS nos três tempos analisados, em relação ao grupo LPS. E por fim, animais tratados previamente com o anticorpo neutralizador da cadeia $\alpha 1$ do receptor de IL-1 (CD121a) que é capaz de bloquear a ligação de IL-1 α , IL-1 β , ou do antagonista do receptor tipo I de IL-1 (IL-1Ra), também continuaram a apresentar inibição do rolamento de leucócitos induzido pelo LPS nos três tempos analisados, demonstrando que o efeito inibitório das Natterinas não é decorrente da indução da produção ou ação do antagonista de IL-1R.

A contribuição da citocina reguladora IL-10 no efeito inibitório das Natteirnas também foi avaliada utilizando animais C57BL/6 IL-10 *KO* tratados com as Natterinas e aplicados topicamente com LPS. As análises mostraram que o rolamento de leucócitos induzido pelo LPS, nos animais C57BL/6 (*WT*), foi inibido após o tratamento desses animais com as Natteirnas (Fig. 16). Além disso, os animais C57BL/6 IL-10 *KO* tratados com as Natterinas também continuaram apresentando inibição do rolamento de leucócitos indicando que a citocina IL-10 não interfere no efeito inibitório das Natterinas.

Protocolo experimental: figura 14

Metirapone (0,5 mg/mL) – inibidor da síntese de glicocorticóides
2 x dia/ 3 dias antes do tratamento com as Natterinas

Zinco Protoporfirina IX (ZnPPIX, 1mg/ml) – Inibidor da enzima Heme-oxigenase-1
2 x dia/1 dia antes do tratamento com as Natterinas

Figura 14 - Ausência da interferência de corticoides ou da enzima HO-1 no efeito inibitório das Natterinas sobre o rolamento de leucócitos induzido pelo LPS

Camundongos Swiss machos foram previamente tratados por via i.p. com 200 µL de metirapone a 0,5 mg/mL (inibidor da síntese de glicocorticoides - 2x/dia por 3 dias) ou 200 µL de zinco protoporfirina IX a 1 mg/mL (ZnPP IX, inibidor da enzima heme oxigenase 1 - 2x/dia por 1 dia). Após este período, os animais foram tratados pela injeção intraescrotal de salina ou de Natterinas (0,02 µg/mL) e após 6 h foram anestesiados e tiveram o músculo cremaster exposto para aplicação tópica de 20 µL de LPS (*E coli* 055:B5, 0,02 µg/mL). Animais previamente tratados com salina e topicamente aplicados com salina foram considerados controles negativos. Os animais foram mantidos por 30 min para observação do rolamento de leucócitos nas vênulas pós-capilares. As barras representam a média de 6 animais por grupo acrescida do desvio-padrão. * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle negativo; # $p < 0,05$ comparado ao grupo LPS.

FONTE: Ferreira (2012)

Protocolo experimental: figura 15

Anticorpo neutralizador do antagonista do receptor de IL-1 (anti-IL-1Ra, 5 µg/ml)

Figura 15 - Ausência da participação do antagonista solúvel do receptor de IL-1 na inibição pelas Natterinas do rolamento de leucócitos induzido pelo LPS

Camundongos Swiss machos foram tratados por via i.p. com 500 µL de anticorpo neutralizador do antagonista do receptor de IL-1 (anti-IL-1Ra, 5 µg/mL) por 30 min. Após este período, os animais foram tratados pela injeção intraescrotal de salina ou de Natterinas (0,02 µg/mL) e após 6 h foram anestesiados e tiveram o músculo cremaster exposto para aplicação tópica de 20 µL de LPS (*E coli* 055:B5, 0,02 µg/mL). Animais previamente tratados com salina e topicamente aplicados com salina foram considerados controles negativos. Os animais foram mantidos por 30 min para observação do rolamento de leucócitos nas vênulas pós-capilares. As barras representam a média de 6 animais por grupo acrescida do desvio-padrão. * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle negativo; # $p < 0,05$ comparado ao grupo LPS.

FONTE: Ferreira (2012)

Protocolo experimental: figura 16

Figura 16 - A ação inibitória das Natterinas no rolamento de leucócitos é independente de IL-10

Camundongos C57BL/6 (*WT*) ou IL-10 *KO* foram tratados por via intraescrotal com salina ou com 50 µL de Natterinas (0,02 µg/mL) e após 6 h foram anestesiados e tiveram o músculo cremaster exposto para aplicação tópica de 20 µL de LPS (*E coli* 055:B5, 0,02 µg/mL). Animais previamente tratados com salina e topicamente aplicados com salina foram considerados controles negativos. Os animais foram mantidos por 30 min para observação do rolamento de leucócitos nas vênulas pós-capilares. As barras representam a média de 6 animais por grupo acrescida do desvio-padrão. * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle negativo; # $p < 0,05$ comparado ao grupo LPS.

FONTE: Ferreira (2012)

5.8 Análise da participação de reguladores intracelulares no efeito inibitório das Natterinas

A ativação de receptores do tipo TLR além de induzir a síntese de mediadores inflamatórios, também aciona uma alça reguladora negativa dependente da ativação de proteínas quinases fosfatases e PI3K que promovem a degradação proteassômica, impedindo assim a resposta inflamatória (Han et al., 2010; Horwood et al., 2003; Medvedev et al., 2007; Naiki et al., 2005; Stovall et al., 2004). Para investigar se o efeito inibitório das Natterinas está relacionado com a degradação proteassômica das moléculas da sinalização derivada de TLR ou devido à indução de proteino-quinases fosfatases tratamos os animais previamente com o inibidor de proteassoma 26S (MG132) ou com o inibidor de serino/treonino fosfatases (IPP-1) antes do tratamento com as Natterinas.

Os dados apresentados na Figura **17** mostram que a inibição pelas Natterinas do aumentado rolamento de leucócitos induzido pelo LPS não foi revertida pelo tratamento prévio com o inibidor do proteassoma 26S e ao contrário, os animais tratados com o inibidor IPP-1 tiveram a inibição revertida completamente, apresentando um rolamento maior que aquele induzido pelo LPS. Podemos sugerir que as Natterinas induzem aumento na ativação de fosfatases que desfosforilam resíduos de serina ou treonina sem, contudo, induzir aumento de degradação no proteassoma 26S contribuindo assim para a inibição do recrutamento de leucócitos.

PI3K são quinases lipídicas consistindo de 3 classes (IA, IB, II e III) e catalisam a fosforilação de várias espécies de fosfatidilinositol que são importantes no recrutamento de moléculas sinalizadoras como AKT/PKB para regiões específicas na membrana. Dados mostram também que esta sinalização PI3K/AKT participa de maneira importante na regulação negativa de respostas imunes excessivas mediadas por TLR (Guha e Mackman, 2002; Kim et al., 2005; Schabbauer et al., 2004; Williams et al., 2004;). Quando avaliamos a participação das quinases PI3K com o uso do inibidor específico Wortmannin notamos que os animais tratados previamente com este inibidor tiveram a inibição revertida completamente, apresentando um rolamento maior que aquele induzido pelo LPS (Fig. **18**), indicando, portanto que a via de sinalização PI3K/AKT participa do efeito inibitório das Natterinas.

Protocolo experimental: figuras 17 e 18

Inibidor de proteassomo 26S (MG132 a 10 μ M)

Inibidor de serina/treonina fosfatases (IPP-1 a 10 nM)

Wortmannin (inibidor de PI3K a 0,005 μ M)

Figura 17 - A ação inibitória das Natterinas no rolamento de leucócitos depende de serina/treonina fosfatases

Camundongos Swiss machos foram tratados por via i.p. com 500 µL do inibidor de proteassomo 26S (MG132 a 10 µM) ou com o inibidor de serina/treonina fosfatases (IPP-1 a 10 nM) 30 min antes do pré-tratamento com as Natterinas. Após este período, os animais foram tratados pela injeção i.p. de salina ou de Natterinas (0,02 µg/mL) e após 6 h foram anestesiados e tiveram o músculo cremaster exposto para aplicação tópica de 20 µL de LPS (*E coli* 055:B5, 0,02 µg/mL). Animais previamente tratados com salina e topicamente aplicados com salina foram considerados controles negativos. Os animais foram mantidos por 30 min para observação do rolamento de leucócitos nas vênulas pós-capilares. As barras representam a média de 6 animais por grupo acrescida do desvio-padrão. * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle negativo; # $p < 0,05$ comparado ao grupo LPS.

FONTE: Ferreira (2012)

Figura 18 - A ação inibitória das Natterinas no rolamento de leucócitos dependente de PI3K

Camundonos Swiss machos foram tratados por via i.p. com 500 µL do inibidor Wortmannin a 0,005 µM (*specifically inhibits phosphatidylinositol 3-kinase*) 30 min antes do pré-tratamento com as Natterinas. Após este período, os animais foram tratados pela injeção i.p. de salina ou de Natterinas (0,02 µg/mL) e após 6 h foram anestesiados e tiveram o músculo cremaster exposto para aplicação tópica de 20 µL de LPS (*E coli* 055:B5, 0,02 µg/mL). Animais previamente tratados com salina e topicamente aplicados com salina foram considerados controles negativos. Os animais foram mantidos por 30 min para observação do rolamento de leucócitos nas vênulas pós-capilares. As barras representam a média de 6 animais por grupo acrescida do desvio-padrão. * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle negativo; # $p < 0,05$ comparado ao grupo LPS.

FONTE: Ferreira (2012)

5.9 Efeito das Natterinas na endotoxemia induzida por baixa e alta dose LPS de *E. coli* e *S. abortus*

Neste trabalho avaliamos o efeito inibitório das Natterinas no rolamento induzido pela aplicação tópica de agentes inflamatórios como KC e LPS. Em seguida testamos a capacidade das Natterinas de inibirem um processo inflamatório sistêmico induzido pela administração de altas doses de LPS, mimetizando a endotoxemia (Han et al., 2010). Portanto, para avaliar o efeito das Natterinas na endotoxemia induzida pelo LPS, os animais foram injetados com uma dose única de diferentes fontes de LPS (*E. coli* ou *S. abortus*), em baixa dose (1,5 mg/Kg) ou alta dose (30 mg/Kg). Para conseguirmos avaliar a migração de células para a cavidade peritoneal, após 4 h da aplicação de LPS determinados grupos de animais foram mortos e tiveram a cavidade peritoneal lavada para a obtenção da suspensão celular. Outros grupos de animais foram observados quanto à sobrevivência por um período de 48 h.

Os resultados obtidos mostraram que a partir de 3 h da aplicação de alta ou baixa dose de LPS (*E. coli* ou *S. abortus*) os animais apresentaram sintomas clínicos característicos de sepse como mobilidade reduzida, lacrimejamento, diarreia intensa, hipotermia e eriçamento de pelo. Nos animais injetados com baixa dose (15 mg/kg) de LPS de *E. coli* ao avaliarmos a migração de células para a cavidade peritoneal, após 4 h da injeção do LPS, percebemos um drástico recrutamento de leucócitos totais (Fig. **19A**) e de neutrófilos (Fig. **19B**) na cavidade peritoneal que foram quase completamente abolidos nos animais tratados previamente com as Natterinas. Nos animais injetados com alta dose (30 mg/kg) de LPS de *E. coli* também não foi avaliada nenhuma morte até 48 h de observação, porém as Natterinas também bloquearam a neutrofilia induzida pelo LPS (Fig. **20**).

Nos animais injetados com alta dose de LPS de *S. abortus*, as Natterinas também bloquearam a migração de células (total e de neutrófilos) para a cavidade peritoneal após 4 h (Fig. **21**), mostrando o potencial das Natterinas em inibir o recrutamento de células inflamatórias por diferentes tipos de endotoxinas. Ao avaliarmos na Figura **22** a mortalidade observamos que ao contrário da grande sobrevivência dos animais injetados com LPS de *E. coli*, 50% dos animais injetados com *S. abortus* morreram com 42 h e somente 1 sobreviveu ao final de 48 h de observação. Nos animais tratados previamente com as Natterinas observamos um retardo na morte dos animais (46 h) e ao final do período de observação um

maior número de animais vivos. Estes dados em conjunto sustentam a capacidade inibitória das Natterinas na neutrofilia característica de processos inflamatórios agudos e sistêmicos.

Protocolo experimental: figuras 19 e 20

Figura 19. As Natterinas inibem o recrutamento de neutrófilos em camundongos com endotoxemia induzida por baixa dose de LPS de *E. coli*

Camundongos Swiss machos foram tratados por via subcutânea com salina ou com 100 μ L de Natterinas (0,06 mg/mL) e após 6 h foram injetados por via i.p. com 500 μ L de LPS (*E. coli* 055:B5, 1,5 mg/Kg). Após 4 h, os animais foram mortos e tiveram a cavidade peritoneal lavada para coleta da suspensão celular que foi processada para contagem total de células (**A**) ou de neutrófilos (**B**). Animais previamente tratados com salina e injetados i.p. com salina foram considerados controles negativos. As barras representam a média de 5 animais por grupo acrescida do desvio-padrão. * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle negativo; # $p < 0,05$ comparado ao grupo LPS.

FONTE: Ferreira (2012)

Figura 20 - As Natterinas inibem o recrutamento de neutrófilos em camundongos com endotoxemia induzida por alta dose de LPS de *E. coli*

Camundongos Swiss machos foram tratados por via subcutânea com salina ou com 100 μ L de Natterinas (0,06 mg/mL) e após 6 h foram injetados por via i.p. com 500 μ L de LPS (*E. coli* 055:B5, 30 mg/Kg). Após 48 h, os animais foram mortos e tiveram a cavidade peritoneal lavada para coleta da suspensão celular que foi processada para contagem total de células (A) ou de neutrófilos (B). Animais previamente tratados com salina e injetados i.p. com salina foram considerados controles negativos. As barras representam a média de 5 animais por grupo acrescida do desvio-padrão. * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle negativo; # $p < 0,05$ comparado ao grupo LPS.

FONTE: Ferreira (2012)

Protocolo experimental: figuras 21 e 22

Figura 21 - As Natterinas inibem o recrutamento de neutrófilos em camundongos com endotoxemia induzida por alta dose de LPS de *S. abortus equi*

Camundongos Swiss machos foram tratados por via subcutânea com salina ou com 100 μ L de Natterinas (0,06 mg/mL) e após 6 h foram injetados por via i.p. com 500 μ L de LPS (*S. abortus equi*, 30 mg/Kg) e após 4 h foram mortos e tiveram a cavidade peritoneal lavada para coleta da suspensão celular que foi processada para contagem total de células (**A**) ou de neutrófilos (**B**). Animais previamente tratados com salina e injetados i.p. com salina foram considerados controles negativos. As barras representam a média de 5 animais por grupo acrescida do desvio-padrão. * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle negativo; # $p < 0,05$ comparado ao grupo LPS.

FONTE: Ferreira (2012)

Figura 22 - As Natterinas retardam a morte de camundongos com endotoxemia induzida por alta dose de LPS de *S. abortus equi*

Camundongos Swiss machos foram tratados por via subcutânea com salina ou com 100 μ L de Natterinas (0,06 mg/mL) e após 6 h foram injetados por via i.p. com 500 μ L de LPS (*S. abortus equi*, 30 mg/Kg). Animais previamente tratados com salina e topicamente aplicados com salina foram considerados controles negativos. Após a injeção de LPS, os animais foram observados a cada 1 h por até 48 h para a verificação de morte. A porcentagem de animais sobreviventes foi avaliada em relação a 3 animais por grupo. Animais previamente tratados com salina e injetados i.p. com salina foram considerados controles negativos. As barras representam a média de 3 animais por grupo acrescida do desvio-padrão. * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle negativo; # $p < 0,05$ comparado ao grupo LPS.

FONTE: Ferreira (2012)

6 DISCUSSÃO

A reação inflamatória causada pelo veneno de *Thalassophryne nattereri* na pata de camundongos é caracterizada por um atraso na remoção do material necrosado (Lopes-Ferreira et al., 2001) e pelo reduzido número de leucócitos no tecido lesado (Lima et al., 2003). Este comportamento também é observado no músculo gastrocnêmio de camundongo onde a reação inflamatória induzida pelo veneno de *T. nattereri* revela um infiltrado pobre em macrófagos e neutrófilos (Lopes-Ferreira et al., 2001).

As Natterinas são toxinas majoritárias presentes no veneno de *T. nattereri* e não apresentam homologia com proteínas encontradas nos bancos de dados (Magalhães et al., 2006). Esta família de proteínas possui atividade cininogenásica (clivam o cininogênio humano e peptídeos sintéticos derivados de cininogênio e liberam a calidina - lys-BK), são responsáveis pelo edema e pela nocicepção induzidos pelo veneno (Lopes-Ferreira et al., 2004; Magalhães et al., 2005). Neste trabalho, investigamos se as Natterinas são também as toxinas responsáveis pelo deficiente infiltrado celular observado no envenenamento. Para isto, avaliamos a capacidade das Natterinas proteoliticamente ativas de inibirem o rolamento de leucócitos induzido por diferentes agonistas inflamatórios (agPAR-4, KC e LPS) por microscopia intravital e de inibirem o extravasamento celular em modelo de peritonite ou sepsis. Avaliamos a participação dos receptores TLR e a influência de reguladores negativos endógenos da inflamação no efeito inibitório das Natterinas.

Poucos estudos utilizando as Natterinas foram desenvolvidos até o momento, particularmente relacionados à sua ação inflamatória e principalmente inibitória. Neste contexto, a microscopia intravital é bastante útil para o estudo da ação dessas proteases, pois possibilita verificar imediatamente as interações leucócito-endotélio que ocorrem durante o processo inflamatório, observando os eventos de rolamento, adesão e migração celular para o tecido extravascular. As células endoteliais têm uma importância grandiosa no processo inflamatório, pois influenciam diretamente as funções leucocitárias pela capacidade de expressarem e produzirem vários fatores como citocinas e quimiocinas quimiotratoras, mediadores lipídicos, óxido nítrico e moléculas de adesão celular.

Inicialmente observamos que as Natterinas não interferem na ligação do peptídeo agonista GYPGQV ao receptor PAR4 e permitem assim a completa sinalização/ativação e o rolamento leucocitário. PAR4 é um receptor de trombina encontrado em plaquetas, em

neutrófilos e em células endoteliais. A trombina cliva a porção amino-terminal do exodomínio na posição Arg-47/Gly-48 e expõe o peptídeo ligante GYPGQV que induz o recrutamento de neutrófilos (Vergnolle et al., 2002).

No entanto, a ligação de KC ao seu receptor heptatransmembranoso nas células de camundongos previamente tratados com as Natterinas induz a princípio aumento no rolamento de leucócitos e só a partir de 20 min ocorre a inibição pelas Natterinas, indicando que eventos transcrpcionais podem estar envolvidos na inibição. A inibição do rolamento é dependente da expressão dos receptores TLR2 e TLR4. E ainda, demonstramos que as Natterinas também inibem de maneira dependente de TLR2/TLR4 a transmigração de leucócitos. Isto foi observado quando os animais TLR2 *KO* e mutantes de TLR4 (C3H/HeJ) foram tratados com as Natterinas por via subcutânea e a migração de leucócitos foi induzida pela aplicação intraperitoneal de KC.

Podemos também apreender de nossos resultados que a ausência funcional de TLR2 e TLR4 prejudica a intensidade do rolamento de leucócitos induzido pela KC, mostrando que a magnitude da ativação de neutrófilos pela quimiocina necessita de sinais adicionais derivados de TLR2 e TLR4. Poucos estudos na literatura investigam como os eventos de sinalização de superfície celular (como a ligação de KC aos receptores CXCR1 e CXCR2) são influenciados pela ativação de receptores TLR, uma circunstância provável de ocorrer durante uma infecção microbiana. Portanto fica claro a importância desta área de estudo que visa determinar se receptores CXCR1 e CXCR2 da quimiocina KC interagem com os receptores TLR2 ou TLR4 a nível intermolecular ou através de proteínas sinalizadoras intermediárias. Podemos citar o trabalho de Fan e Malik (2003) que mostra a comunicação entre os receptores TLR4 e CXCR2 previne a sua internalização e aumenta a migração de neutrófilos pela quimiocina MIP-2, uma vez que a sinalização TLR4 gera diminuição de GRK2 e GRK5, quinases responsáveis pela desensitização de receptores acoplados a proteína G.

Podemos sugerir, portanto, que a ação inibitória das Natterinas se dá pela capacidade de antagonizar os sinais derivados de TLR2/TLR4 e gerar aumento na atividade de enzimas serino-treonino quinases como GRK2 e GRK5 e levar a uma menor exposição dos receptores da quimiocina KC na superfície dos neutrófilos e diminuição do recrutamento celular, como mostra o trabalho realizado pelo grupo do Dr. Fernando Cunha (Alves-Filho et al., 2009) onde a ativação de TLR2 em neutrófilos pelo agonista ácido lipoteicoico (LTA) gera a diminuição da expressão de CXCR2 e impede a quimiotaxia celular. a ativação de TLR2 em

neutrófilos pelo agonista ácido lipoteicoico gera a diminuição da expressão de CXCR2 e impede a quimiotaxia celular. Ademais, este grupo ampliou os conhecimentos nesta área quando relataram que a tolerância a endotoxina vista na sepsis e a falha no recrutamento de neutrófilos dependentes da ativação de TLR4 são revertidos pelo tratamento com a citocina IL-33 que induz diminuição da quinase GRK2 e aumento na expressão dos receptores CXCR2 membranosos da quimiocina para neutrófilos (Alves-Filho et al., 2010).

O LPS ativa diversos mecanismos inflamatórios a partir da sua ligação ao receptor do tipo Toll (TLR) 4 (Poltorak et al., 1998) expresso em células sentinelas como macrófagos e mastócitos e principalmente expresso no endotélio (Andonegui et al., 2009). Esta ligação resulta na produção e liberação de citocinas como o TNF- α , quimiocinas e mediadores lipídicos necessários para a ativação do endotélio e o recrutamento de neutrófilos. Nossos resultados demonstram que as Natterinas regulam negativamente nas vênulas pós-capilares o rolamento de leucócitos induzido pelo LPS sendo que esta inibição é independente da sua atividade proteásica e dependente da expressão de TLR2/MyD88. Ainda, a aplicação tópica da mistura previamente incubada de Natterinas + LPS também inibiu o rolamento de leucócitos. Estes resultados além de indicarem uma regulação negativa e imediata das Natterinas na ação inflamatória de LPS poderiam sugerir uma ação competitiva entre eles pela ligação ao complexo do receptor de LPS, constituído pelos receptores CD14, TLR4 e a proteína associada MD2. A tolerância à endotoxina pode ser induzida por antagonistas do receptor TLR e por moléculas neutralizadoras de LPS que vêm sendo testados em humanos (Lynn et al., 2003, 2004). Na categoria antagonistas de receptor podemos citar: moléculas LPS-like derivadas de bactérias, LPS deacilado, lipídio IVA, análogos sintéticos do lipídio A e peptídeos catiônicos e entre os neutralizadores, incluem-se a polimixina B e peptídeos sintéticos (Erridge, 2010).

Ao avaliarmos conjuntamente os resultados da ação inibitória das Natterinas verificamos que as elas além de inibirem o recrutamento induzido por LPS (ligante de TLR4) também inibem o rolamento e a migração induzida por KC (ligante do receptor heptatransmembranoso CXCR2), o que nos leva a descartar a hipótese de que as Natterinas se comportem como moléculas ligantes de LPS; ainda verificamos que o efeito inibitório das Natterinas se dá sem a necessidade de tratamento prévio e dependente da expressão de TLR2, TLR4 e MyD88, sugerindo que as Natterinas podem agir como antagonistas de TLR.

Informações recentes apontam para existência de uma profunda reprogramação celular durante a exposição recorrente de células a endotoxinas, caracterizando o *estado de tolerância a endotoxina*. Estudos de transcrição gênica, *in vitro*, com macrófagos murinos e monócitos humanos revelaram que a reprogramação se faz em três níveis: i) alteração na expressão do complexo receptor de LPS (TLR4/MD2), ii) alteração na sinalização intracelular após a ligação e dimerização de TLR e, finalmente por iii) secreção de reguladores negativos. Esta reprogramação serve para controlar a exacerbação da resposta inflamatória, regulando negativamente, após a re-estimulação com o LPS a produção de citocinas inflamatórias (TNF- α , IL-6, IL-12, IL-1 β) de quimiocinas (CCL3, CCL4 e CXCL10) e do infiltrado neutrofílico (Biswas e Lopez-Collazo 2009; Foster et al., 2007; Mages et al., 2007).

Outros estudos revelam ainda que a tolerância a uma dada endotoxina pode ocorrer pela exposição prévia a uma endotoxina diferente. Por exemplo, a exposição prévia de macrófagos aos ligantes de TLR2 (LTA, Pam3Cysk4 ou MALP2) torna estas células tolerantes ao LPS (Dobrovolskaia et al., 2003; Sato et al., 2000) sendo que este mecanismo é conhecido como heterotolerância ou *crosstolerance*.

A ativação de TLR4 pelo LPS desencadeia a aproximação intracitoplasmática de domínios TIR criando uma plataforma que permite o recrutamento de moléculas adaptadoras como MyD88, TIRAP/Mal e IRAK-4 e a fosforilação de IRAK-1. Subseqüentemente ocorre a associação e fosforilação de várias proteínas que levam finalmente a ubiquitinação e degradação do inibidor NF κ B e a sua liberação e deslocamento para o núcleo para induzir a expressão de genes-alvo inflamatórios. Estas observações reforçam nossos dados que mostram as Natterinas com capacidade inibitória para diferentes agonistas inflamatórios sem, no entanto demonstrarem ação competitiva e, ao contrário, antagonizam a inflamação pela indução da produção de reguladores endógenos ou regulando moléculas envolvidas na sinalização de TLR.

Piao et al. (2009) demonstraram em monócitos humanos que a sinalização de LPS via TRIF ou MyD88 desencadeia além de estímulos inflamatórios a produção de reguladores negativos como Tollip, SOCS-1, SHIP-1, IRAK-M, SIKE, SARM, implicados no controle da exacerbação da inflamação (Biswas e Tergaonkar, 2007; Liew et al., 2005; Rauh et al., 2005; Van't Veer et al., 2007). SHIP é produzida em resposta a TGF- β , exercendo seu efeito inibitório principalmente através da hidrólise de PI3K. IRAK-M impede a dissociação do IRAK-1 e -4 de MyD88 comprometendo a formação do complexo IRAK1-TRAF6 (Akira e Takeda,

2004; Kobayashi et al., 2002). Em monócitos de pacientes com sepsis, IRAK-M é expressa mais rapidamente após a exposição ao LPS em comparação aos controles saudáveis. Já a proteína solúvel MyD88 (MyD88s), não se liga à IRAK-4 e, quando expressa em grande quantidade não induz a fosforilação da IRAK-1 e, dessa forma, inibe a ativação de NFκB induzido pelo LPS (Burns et al., 2003). Han et al. (2010) ampliaram os conhecimentos dos reguladores negativos endógenos derivados da sinalização TLR demonstrando que a ativação da integrina CD11b, dependente de PI3K, ativa as proteínas quinases Src-Syk que fosforilam os resíduos de tirosina 227 em MyD88 e 375 em TRIF e promovem a degradação proteossômica destas proteínas, impedindo assim a resposta inflamatória.

Nossos resultados indicam que as Natterinas atuam na reprogramação, característica da tolerância a endotoxina, uma vez que abolem o rolamento leucocitário em animais previamente tratados com as proteases e posteriormente estimulados com LPS ou KC, fenômeno dependente da sinalização via TLR2-TLR4/MyD88. Resta, portanto verificarmos se a sinalização via TLR2-TLR4/MyD88 envolvida na inibição pelas Natterinas gera a produção de reguladores negativos ou altera a sinalização intracelular.

Neste sentido, nossa próxima etapa foi avaliar se a inibição pelas Natterinas seria mediada por reguladores endógenos como os corticosteroides. Corticosteroides reduzem a transcrição de genes inflamatórios e aumentam a transcrição de genes antiinflamatórios (Barnes, 1993). Informações de longa data mostram que existe um aumento dos níveis plasmáticos de corticosteroides após a injeção de endotoxinas (Cronstein et al., 1992). No entanto, nossos resultados mostram que as Natterinas não exercem seu efeito inibitório pela indução da produção de corticóides, uma vez que os animais tratados com um potente inibidor da síntese de corticóides apresentam inibição do recrutamento de leucócitos pelas Natterinas. Do mesmo modo, o efeito inibitório das Natterinas não ocorre por influência da produção de HO-1. Quando expostas a agonistas proinflamatórios, as células endoteliais super-regulam a expressão de HO-1, que desempenha papel limitante no catabolismo do heme, uma reação que libera íons de ferro livres (Fe^{2+}) do core central do anel de protoporfirina do heme e gera biliverdina e também gás monóxido carbônico. A geração de íons de Fe^{2+} livres assim como da biliverdina produz novas moléculas com função antioxidante e imunomodulatória, como exemplo a bilirubina pode inibir a ativação de NFκB na célula endotelial (Soares et al., 2004) e HO-1 que controla a ativação de NFκB na célula endotelial via sua habilidade de modular negativamente os níveis intracelulares de Fe.

Assim, os mecanismos de controle de repressão de genes proinflamatórios induzidos por corticosteroides ou os associados ao aumento na expressão de moléculas antiinflamatórias, como HO-1, não estão associados ao efeito inibitório das Natterinas.

Estudos feitos em camundongos mostraram que a inflamação pulmonar induzida pelos fragmentos de baixo peso molecular do hialuronan é negativamente regulada pela sinalização TLR4 e que a ativação de TLR4 induz o controle da inflamação pulmonar pela indução da produção do antagonista do receptor de IL-1 (IL-1Ra) (Zhao et al., 2010). No entanto, nossos estudos mostraram claramente que o IL-1Ra, um inibidor natural de IL-1 β , não tem envolvimento nenhum no efeito inibitório das Natterinas, uma vez que o tratamento dos animais com anticorpo neutralizador da cadeia α 1 do receptor de IL-1 (CD121a) que é capaz de bloquear a ligação de IL-1 α , IL-1 β , ou do antagonista do receptor tipo I de IL-1 (IL-1Ra) não foi suficiente para reverter a inibição do rolamento de leucócitos provocada pelas Natterinas. Semelhantemente, a citocina antiinflamatória IL-10 também não possui qualquer influência na inibição do rolamento de leucócitos pelas Natterinas, pois os animais IL-10 *KO* tratados com as Natterinas continuaram a apresentar uma inibição gradual do rolamento de leucócitos após a aplicação do LPS sobre a microcirculação.

Em seguida verificarmos se o efeito inibitório das Natterinas dependente de sinais derivados de TLR2-TLR4/MyD88 seria mediado por alterações em moléculas intracelulares importantes. As vias de sinalização induzidas pelo LPS podem ser reguladas negativamente pela fosforilação ou a desfosforilação de resíduos de serina, treonina e/ou tirosina em importantes moléculas sinalizadoras por proteínas quinases ou fosfatases (Chi et al., 2006; Guha e Mackman 2002; Horwood et al., 2003; Medvedev et al., 2007; Stovall et al., 2004; Zhao et al., 2006).

Xu et al. (2008) demonstraram que macrófagos murinos ou humanos que super-expressam após estimulação com LPS a protease PTP 1B apresentam inibição da produção de citocinas inflamatórias. PTP 1B também inibe a ativação de TyK2 e STAT1, demonstrando a ação reguladora negativa desta fosfatase na sinalização dependente de MyD88 e TRIF. Já Naiki et al. (2005) demonstraram que a indução de ubiquitinação da proteína MyD88 por ação de TGF- β 1 facilita a sua degradação proteassômica e atenua a sinalização dependente de TLR4/MyD88.

Assim, para investigar se o efeito inibitório das Natterinas está relacionado com a degradação proteassômica de moléculas da sinalização derivadas de TLR ou devido à

indução de proteino-quinases fosfatases utilizamos o inibidor do proteassoma 26S (MG132) ou inibidor de serino/treonino fosfatases (IPP-1). Os dados mostram que a inibição pelas Natterinas do aumentado rolamento de leucócitos induzido pelo LPS não foi revertida pelo tratamento prévio com o inibidor do proteassoma 26S e ao contrário, os animais tratados com o inibidor IPP-1 tiveram a inibição revertida completamente, apresentando um rolamento maior que aquele induzido pelo LPS. Demonstramos que as Natterinas induzem aumento na ativação de fosfatases que desfosforilam resíduos de serina ou treonina sem, contudo induzir aumento de degradação no proteassoma 26S e contribuem assim para a inibição do recrutamento de leucócitos.

A sinalização PI3K/AKT participa de maneira importante na regulação negativa de respostas imunes excessivas mediadas por TLR (Guha e Mackman, 2002; Kim et al., 2005; Schabbauer et al., 2004; Williams et al., 2004). Além disso, a inibição da sinalização PI3K/AKT aumenta a ativação de NF κ B, AP-1 e Egr-1 e a expressão de TNF- α e IL-6 pelo LPS em cultura de monócitos humanos (Park et al., 2009). O trabalho de Li et al. (2011) também mostrou que a inibição da via PI3K/AKT, utilizando dois diferentes inibidores de PI3K (LY294002 ou Wortmannin), anula a proteção imune de camundongos após a ativação de TLR2 revelando que a sinalização PI3K/AKT é importante para proteger a célula do estresse crônico. Ainda, Han et al. (2010) demonstraram que a ativação da integrina CD11b, dependente de PI3K, gera a ativação de tirosinas quinases que fosforilam os resíduos de tirosina em MyD88 e em TRIF e promovem a degradação proteassômica, impedindo assim a resposta inflamatória. O papel de PI3K na regulação negativa da sinalização de TLR e na tolerância ao LPS foi evidenciado por Noubir et al. (2004). A degradação de IRAK-1 é relevante para a tolerância ao LPS. Estes autores demonstraram que a inibição específica de PI3K abole a degradação de IRAK-1 induzida por LPS e resulta na inibição da tolerância.

Em nosso estudo, os animais tratados com o inibidor de PI3K (wortmannin) também tiveram a inibição revertida completamente, apresentando um rolamento maior que aquele induzido pelo LPS, indicando, portanto que a inibição da sinalização PI3K/AKT pode aumentar a ativação de NF κ B. Em conjunto podemos dizer com estes resultados que as Natterinas agem como antagonistas de TLR impedindo o rolamento, a aderência e consequentemente a migração de leucócitos para sítios de inflamação pela sua capacidade de induzir a ativação e consequente interação de múltiplas proteínas que criam uma plataforma única de sinalização negativa. As Natterinas parecem aumentar a atividade de

serino/treonino fosfatases e consequentemente a desfosforilação de proteínas sinalizadoras, dependente de quinases PI3K, sem, no entanto induzir aumento de degradação proteassômica.

Conhecendo o potencial das Natterinas na inibição do recrutamento celular, testamos a sua capacidade na inibição de um processo inflamatório sistêmico induzido pela administração de altas doses de LPS, mimetizando a endotoxemia. Sabemos que a endotoxemia decorrente da injeção de LPS em camundongos reproduz de maneira bastante acentuada os sintomas clínicos da sepsis (Wintersteller et al., 2012). Portanto, avaliamos o efeito inibitório das Natterinas utilizando um modelo de sepsis através da injeção do LPS de dois tipos distintos de bactérias: *Escherichia coli* (*E. coli*) ou *Salmonella abortus* (*S. abortus*). No nosso modelo, os animais com endotoxemia apresentaram sintomas clínicos característicos como letargia, diarreia, piloereção, conjuntivite e hipotermia cerca de 3 horas após a injeção do LPS. No entanto, os sintomas como diarreia, letargia foram mais evidentes nos animais injetados com o LPS de *S. abortus*. Estudos mostram que a letalidade causada pelo LPS de duas distintas espécies difere quanto ao seu potencial inflamatório. Por exemplo, o LPS derivado de *Brucella abortus* parece ser menos potente que o LPS de *E. coli* na indução de choque endotóxico (Goldstein et al., 1992). Por outro lado, o LPS de *S. abortus* é mais potente que o LPS de *E. coli* para induzir um estado febril (Bodurka et al., 1997) mostrando as diferenças destas endotoxinas na indução da resposta inflamatória.

É importante ressaltar que a diferença de resposta inflamatória do LPS foi o motivo que nos levou a utilizar doses distintas para induzir a endotoxemia. A baixa dose de LPS (1,5 mg/Kg) não foi usada com a finalidade de provocar a morte dos animais, mas sim para avaliar o efeito das Natterinas na migração de células para a cavidade peritoneal. Do mesmo modo, a alta dose de LPS (30 mg/Kg) foi importante para avaliarmos a porcentagem de sobrevivência dos animais tratados com as Natterinas. Quando administramos o LPS de *E. coli* a 30 mg/Kg acreditamos que esta concentração seria suficiente para provocar a morte dos animais, no entanto, para nossa surpresa após 48 horas de observação não verificamos nenhuma morte. A mortalidade só aconteceu com a administração do LPS de *S. abortus* a 30 mg/Kg, mostrando que o LPS de *E. coli* é menos potente que o de *S. abortus* na indução do choque endotóxico, corroborando os achados de Bodurka et al. (1997).

A resposta inicial a sepsis, referida como a síndrome da resposta imune sistêmica - *SIRS* é caracterizada pela liberação de mediadores proinflamatórios incluindo citocinas (TNF- α ,

IL-1 β), quimiocinas atratoras de leucócitos, leucotrienos, moléculas de adesão, espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico (Dinarello 1997; van der Poll 1999). No entanto, esta resposta é contrabalanceada através da liberação de moléculas inibitórias incluindo citocinas antiinflamatórias (IL-10 e TGF- β), eicosanoides imunomodulatórios e hormônios, sendo que esta fase da regulação é denominada síndrome da resposta antiinflamatória compensatória - CARS (Bone et al., 1997; van der Poll 1999).

Evidências indicam que a incapacidade para manter o equilíbrio entre a inflamação excessiva e a regulação inflamatória é uma característica patológica da sepse (Cohen 2002; Dinarello 1997). Além disso, durante a sepse severa a migração de neutrófilos é prejudicada, provocando um recrutamento inadequado de leucócitos polimorfonucleados para o sítio de invasão microbiana (Alves-Filho et al., 2008; Muller et al., 2000; Pinheiro et al., 2009; Tavares-Murta et al., 2002;). Ao contrário dessas observações, nossos resultados mostraram uma intensa migração de leucócitos totais e de neutrófilos na cavidade peritoneal dos animais com endotoxemia de ambos os tipos de LPS. Esta migração foi significativamente reduzida quando os animais foram previamente tratados com as Natterinas, indicando que estas proteases podem controlar a neutrofilia típica da endotoxemia.

Quando avaliamos a sobrevivência dos animais tratados com as Natterinas e induzidos a sepse com o LPS de *S. abortus* verificamos um atraso no tempo de mortalidade dos animais. Além disso, a porcentagem de sobrevivência dos animais tratados com as Natterinas foi maior (40%) em relação aos animais que não receberam tratamento (20%). Isto demonstra que as Natterinas podem melhorar a sobrevivência dos animais com sepse.

Considerando que o LPS se liga especificamente ao complexo de receptores CD14/TLR4/MD2, algumas evidências mostram que vários inibidores intracelulares estão envolvidos na regulação da via TLR (Han e Ulevitch 2005; Liew et al., 2005). No entanto, apenas três inibidores intracelulares como IRAK-M, proteínas supressoras da sinalização de citocinas (SOCS) e A20 é que são induzidos pela ativação de TLR. Estes inibidores são de especial interesse na sepse porque elas fazem uma regulação negativa da via de sinalização TLR e a sua perda de função está associada com a desregulação da síntese de mediadores inflamatórios (Maslash-Hubbard et al., 2011). Talvez seja possível que as Natterinas atuem induzindo a produção de inibidores da via de sinalização TLR o que controla, em parte, a sobrevivência dos animais com endotoxemia, no entanto, isto somente poderá ser confirmado

através de análises específicas de proteínas intracelulares. Estes dados em conjunto confirmam a capacidade inibitória das Natterinas e expandem sua atuação na regulação da neutrofilia característica de processos inflamatórios agudos e sistêmicos como a endotoxemia.

7 CONCLUSÃO

Em conjunto, podemos dizer que proteases como as Natterinas podem agir como moléculas antagonistas da inflamação, pois promovem dependente da via de sinalização TLR2-TLR4/MyD88 a inibição do recrutamento celular mediado por agonistas como LPS ou KC. Esta ação inibitória pode ser decorrente da indução de alterações na sinalização intracitoplasmática ou mesmo pela produção de mediadores negativos como Tollip, SOCS-1, SHIP-1, IRAK-M, SIKE, SARM. Além disso, não existe qualquer influência dos reguladores endógenos no efeito inibitório das Natterinas tais como os corticosteroides, a enzima HO-1, o IL-1Ra ou a citocina IL-10 nem aumento na degradação proteassômica de moléculas de sinalização. O efeito inibitório parece ser dependente da sinalização TLR2-TLR4/MyD88 utilizando a via PI3K e a participação de serina/treonina fosfatases do tipo 1. Estudos de regulação do recrutamento celular com esta família de proteases presentes veneno do peixe *Thalassophryne nattereri* fornecerão *insights* que poderão ser úteis na construção e obtenção de antagonistas de LPS mais efetivos de potencial terapêutico.

REFERÊNCIAS[†]

- Akira A. TLR signaling. *Curr Top Microbiol immunol*. 2006;311:1-16.
- Akira S, Takeda K. Toll-Like receptor signaling. *Nature Rev*. 2004;4:499-511.
- Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*. 2006;124:783-801.
- Almeida VG, Rocha CM. Registro de acidentes com peixes peçonhentos e/ou venenosos. *Ver Soc Brás Toxinol*. 1989;2:49-51.
- Alves-Filho JC, de Freitas A, Spiller F, Souto FO, Cunha FQ. The role of neutrophils in severe sepsis. *Shock*. 2008;30:3-9.
- Alves-Filho JC, Freitas A, Souto FO, Spiller F, Paula-Neto H, Silva JS, Gazzinelli RT, Teixeira MM, Ferreira SH, Cunha FQ. Regulation of chemokine receptor by Toll-like receptor 2 is critical to neutrophil migration and resistance to polymicrobial sepsis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106:4018-23.
- Alves-Filho JC, Sônego F, Souto FO, Freitas A, Verri WA Jr, Auxiliadora-Martins M, Basile-Filho A, McKenzie AN, Xu D, Cunha FQ, Liew FY. Interleukin-33 attenuates sepsis by enhancing neutrophil influx to the site of infection. *Nat Med*. 2010;16:708-12.
- Andonegui G, Zhou H, Bullard D, Kelly MM, Mullaly SC, McDonald B, Long EM, Robbins SM, Kubes P. Mice that exclusively express TLR4 on endothelial cells can efficiently clear a lethal systemic Gram-negative bacterial infection. *J Clin Invest*. 2009;119:1921-30.
- Arbibe L, Mira JP, Teusch N, Kline L, Guha M, Mackman N, Godowski PJ, Ulevitch RJ, Knaus UG. Toll-like receptor 2-mediated NF-kappa B activation requires a Rac1-dependent pathway. *Nat Immunol*. 2000;1:533-40.
- Arend WP, Gabay C. Physiologic role of interleukin-1 receptor antagonist. *Arthritis Res*. 2000;2:245-8.
- Auto HF. Acidentes por peixes peçonhentos Thalassophyrne (Niquim), considerações em torno de 32 casos. *Revista da Escola de Ciências Médicas de Alagoas*. 1992;5:35-6.
- Bach FH, Hancock WW, Ferran C. Protective genes expressed in endothelial cells: a regulatory response to injury. *Immunol Today*. 1997;18:483-6.
- Barford D, Das AK, Egloff MP. The structure and mechanism of protein phosphatases: insights into catalysis and regulation. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*. 1998;27:133-64.

[†] De acordo com: International Committee of Medical Journal Editors. Inform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. C2003- Available from: <http://www.icmje.org> [2004 May 06].

Barford D. Molecular mechanisms of the protein serine/threonine phosphatases. *Trends Biochem Sci.* 1996;21:407-12.

Barnes PJ, Adcock IM. Anti-inflammatory actions of steroids: molecular mechanisms. *Trends Pharmacol Sci.* 1993;14:436-41.

Baumann H, Gauldie J. the acute phase response. *Immunol Today.* 1994;15:74-80.

Besedovsky AH, Del Ray A, Sorkin E, and Dinarello CA. Immunoregulatory feedback between interleukin1 and glucocorticoid hormones. *Science.* 1986;233:652-5.

Beutler B. Innate immunity: an overview. *Mol Immunol.* 2004;40:845-59.

Biswas S.K. and Tergaonkar V. Myeloid differentiation factor 88-independent toll-like receptor pathway: sustaining inflammation or promoting tolerance. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007;139:1582-92.

Biswas SK, Lopez-Collazo E. Endotoxin tolerance: new mechanisms, molecules and clinical significance. *Trends Immunol.* 2009;30:475-87.

Bochner BS, Luscinskas FW, Gimbrone MA Jr, Newman W, Sterbinsky SA, Derse-Anthony CP, Klunk D, Schleimer RP. Adhesion of human basophils, eosinophils, and neutrophils to interleukin 1-activated human vascular endothelial cells: contributions of endothelial cell adhesion molecules. *J Exp Med.* 1991;173:1553-7.

Bodurka M, Caputa M, Bodurka J. A comparison of febrile responses induced by LPS from *E. coli* and *S. abortus* in unrestrained rats placed in a thermal gradient. *J Physiol Pharmacol.* 1997;48:81-8.

Bone RC, Grodzin CJ, Balk RA. Sepsis: a new hypothesis for pathogenesis of the disease process. *Chest.* 1997;112:235-43.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248-54.

Brown J, Wang H, Hajishengallis GN, Martin M. TLR-signaling networks: an integration of adaptor molecules, kinases, and cross-talk. *J Dent Res.* 2011;90:417-27.

Burns K, Janssens S, Brissoni B, Olivos N, Beyaert R, Tschopp J. Inhibition of interleukin 1 receptor/Toll-like receptor signaling through the alternatively spliced, short form of MyD88 is due to its failure to recruit IRAK-4. *J Exp Med.* 2003;197:263-8.

Butcher EC. Leukocyte-endothelial cell recognition: three (or more) steps to specificity and diversity. *Cell.* 1991;67:1033-6.

Campbell BE, Hofmann A, McCluskey A, Gasser RB. Serine/threonine phosphatases in socioeconomically important parasitic nematodes--prospects as novel drug targets? *Biotechnol Adv.* 2011;29:28-39.

Charo IF, Taubman MB. Chemokines in the Pathogenesis of Vascular Disease. *Circ Res.* 2004;95:858-66.

Chi H, Barry SP, Roth RJ, Wu JJ, Jones EA, Bennett AM, Flavell RA. Dynamic regulation of pro and anti-inflammatory cytokines by MAPK phosphatase 1 (MKP-1) in innate immune responses. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006;103:2274–9.

Choi EY. Inhibition of leukocyte adhesion by developmental endothelial locus-1 (del-1). *Immune Netw.* 2009;5:153-7.

Cohen J. The immunopathogenesis of sepsis. *Nature* 2002;420:885–91.

Cook AD, Braine EL, Hamilton JA. The phenotype of inflammatory macrophages is stimulus dependent: implications for the nature of the inflammatory response. *J Immunol.* 2003;171:4816-23.

Cotran RS, Kumar V, Collins T. Robbins Pathologic basis of disease. 6 ed. Philadelphia, Pennsylvania, USA-Saunders Company, 1999, p.69-75.

Cronstein BN, Kimmel SC, Levin RI, Martiniuk F, Weissmann G. A mechanism for the anti-inflammatory effects of corticosteroids: the glucocorticoid receptor regulates leukocyte adhesion to endothelial cells and expression of endothelial-leukocyte adhesion molecule 1 and intercellular adhesion molecule 1. *PNAS.* 1992;89:9991-5.

Crowley SR. The pathogenesis of septic shock. *Heart Lung.* 1996;25:124-34 quiz 135-36.

Dale C, Vergnolle N. Protease signaling to G protein-coupled receptors: implications for inflammation and pain. *J Recept Signal Transduct Res.* 2008;28:29-37.

Damiani D, Setian N, Dichtchekian V. Corticosteroides – Conceitos Básicos e Aplicações Clínicas. *Revista Pediatria (São Paulo): Revisões e Ensaio.* 1984;6:160-6.

Darragh J, Ananieva O, Courtney A, Elcombe S, Arthur JS. MSK1 regulates the transcription of IL-1ra in response to TLR activation in macrophages. *Biochem J.* 2010;425:595-602.

Datta PK, Lianos EA. Nitric oxide induces heme oxygenase-1 gene expression in mesangial cells. *Kidney Int.* 1999;55:1734-9.

De Filippis D, D'Amico A, Iuvone T. Cannabinomimetic control of mast cell mediator release: new perspective in chronic inflammation. *J Neuroendocrinol.* 2008;1:20-5.

Dinareello CA. Proinflammatory and anti-inflammatory cytokines as mediators in the pathogenesis of septic shock. *Chest*. 1997;112:321S–329S.

Dobrovolskaia MA, Medvedev AE, Thomas KE, Cuesta N, Toshchakov V, Ren T, Cody MJ, Michalek SM, Rice NR, Vogel SN. Induction of in vitro reprogramming by Toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 agonists in murine macrophages: effects of TLR "homotolerance" versus "heterotolerance" on NF-kappa B signaling pathway components. *J Immunol*. 2003;170:508-19.

Donnelly S, O'Neill SM, Stack CM, Robinson MW, Turnbull L, Whitchurch C, Dalton JP. Helminth cysteine proteases inhibit TRIF-dependent activation of macrophages via degradation of TLR3. *J Biol Chem*. 2010;285:3383-92.

Durez P, Abramowicz D, Gérard C, Van Mechelen M, Amraoui Z, Dubois C, Leo O, Velu T, and Goldman M. In vivo induction of interleukin 10 by anti-CD3 monoclonal antibody or bacterial lipopolysaccharide: differential modulation by cyclosporin A. *J Exp Med*. 1993;177:551-5.

Erridge C. Endogenous ligands of TLR2 and TLR4: agonists or assistants? *J Leukoc Biol*. 2010;87:989-99.

Facó PE, Bezerra GP, Barbosa PS, Martins AM, Guimarães JA, Ferreira ML, Monteiro HS. Epidemiology of the injuries caused by *Thalassophryne nattereri* (niquim) in Ceará State (1992-2002). [Article in Portuguese] *Rev Soc Bras Med Trop*. 2005;38:479-82.

Fan J and Malik AB. Toll-like receptor-4 (TLR4) signaling augments chemokine-induced neutrophil migration by modulating cell surface expression of chemokine receptors. *Nat Med*. 2003;9:315-21.

Fonseca LA, Lopes- Ferreira M. Clinical and experimental studies regarding poisoning caused by a fish *Thalassophryne nattereri* (niquim). *Ann Bras Dermatol*. 2000;75:435-43.

Foster SL, Hargreaves DC, Medzhitov R. Specific control of inflammation by TLR-induced chromatin modifications. *Nature*. 2007;447:972-8.

Foster SL, Medzhitov R. Gene-specific control of the TLR-induced inflammatory response. *Clin Immunol*. 2009;130:7-15.

Freitas A, Alves-Filho JC, Secco DD, Neto AF, Ferreira SH, Barja-Fidalgo C, Cunha FQ. Heme oxygenase/carbon monoxide-biliverdin pathway down regulates neutrophil rolling, adhesion and migration in acute inflammation. *Br J Pharmacol*. 2006;149:345-54.

Fróes HP. - Studies on venomous fishes of tropical countries. *J trop Med Hyg*. 1933b;36:134-5.

Fróes HP. Estudo experimental sobre o veneno dos niquins (*Thalassophrynidae*). *Bahia Med*. 1933c;4:225-7.

Fróes HP. Peixes toxíforos do Brasil. *Bahia Med.* 1933a;4:69-75.

Gabay C, Smith MF Jr, Eidlen D, Arend WP. Interleukin 1 receptor antagonist (IL-1Ra) is an acute phase protein. *J Clin Invest* 1997;99:2930-40.

Garcia-Leme JMD. Cellular functions in inflammation In: Garcia-Leme JMD (Editor) *Hormones and Inflammation*. Florida: CRC Press; 1989. p. 165.

Gavins FNE, Chatterjee BE. Intravital microscopy for the study of mouse microcirculation in anti-inflammatory drug research: Focus on the mesentery and cremaster preparations. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2004;49:1-14.

Georén S, Ahnblad P, Stjarne P, Wikstrom AC, Stierna P. Significance of endogenous glucocorticoid sensitivity for airway eosinophilia in a murine model of allergy. *Acta Otolaryngol.* 2005;125:378-85.

Gerard C, Bruyins C, Marchant A, Abramowicz D, Vandenabeele P, Delvaux A, Fiers W, Goldman M, and Velu T. Interleukin 10 reduces the release of tumor necrosis factor and prevents lethality in experimental endotoxemia. *J Exp Med.* 1993;177:547-50.

Goldman M, Velu T: Interleukin-10 and its implications for immunopathology. *Adv Nephrol Necker Hosp.* 1995;24:79–90.

Goldstein J, Hoffman T, Frasch C, Lizzio EF, Beining PR, Hochstein D, Lee YL, Angus RD, Golding B. Lipopolysaccharide (LPS) from *Brucella abortus* is less toxic than that from *Escherichia coli*, suggesting the possible use of *B. abortus* or LPS from *B. abortus* as a carrier in vaccines. *Infect Immun.* 1992;60:1385-9.

Guha M, Mackman N. The phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway limits lipopolysaccharide activation of signaling pathways and expression of inflammatory mediators in human monocytic cells. *J Biol Chem.* 2002;277:32124–32.

Haddad Jr V, Pardal PPO, Cardoso JLC, Martins IA. 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 SP* 2003;45:221-3.

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.* 2010;11:734-42.

Han J, Ulevitch RJ. Limiting inflammatory responses during activation of innate immunity. *Nat Immunol.* 2005; 6:1198-205.

Hanks SK. Genomic analysis of the eukaryotic protein kinase superfamily: a perspective. *Genome Biol.* 2003;4:111.

Hayashi S, Takamiya R, Yamaguchi T, Matsumoto K, Tojo SJ, Tamatani T, Kitajima M, Makino N, Ishimura Y, Suematsu M. Induction of heme oxygenase-1 suppresses venular leukocyte adhesion elicited by oxidative stress: role of bilirubin generated by the enzyme. *Circ Res*. 1999;85:663-71.

Hickey MJ, Issekutz AC, Reinhardt PH, Fedorak RN, Kubes P. Endogenous interleukin-10 regulates hemodynamic parameters, leukocyte-endothelial cell interactions, and microvascular permeability during endotoxemia. *Circ Res*. 1998;83:1124-31.

Hollenberg MD, Saifeddine M, Sandhu S, Houle S, Vergnolle N. Proteinase-activated receptor-4: evaluation of tethered ligand-derived peptides as probes for receptor function and as inflammatory agonists in vivo. *Br J Pharmacol*. 2004;143:443-54.

Horwood NJ, Mahon T, McDaid JP, Campbell J, Mano H, Brennan FM, Webster D and Foxwell BM. Bruton's tyrosine kinase is required for lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor alpha production. *J Exp Med*. 2003;197:1603–11.

Houle S, Papez MD, Ferazzini M, Hollenberg MD, Vergnolle N. Neutrophils and the kallikrein-kinin system in proteinase-activated receptor 4-mediated inflammation in rodents. *Br J Pharmacol*. 2005;146:670-8.

Howard M, Muchamuel T, Andrade S, and Menon S. Interleukin 10 protects mice from lethal endotoxemia. *J Exp Med*. 1993;177:1205-8.

Imhof BA, Aurrand-Lions M. Adhesion mechanisms regulating the migration of monocytes. *Nat Rev Immunol*. 2004;4:432-44.

Jeong E, Lee JY. Intrinsic and extrinsic regulation of innate immune receptors. *Yonsei Med J*. 2011;52:379-92.

Kasama T, Miwa Y, Isozaki T, Odai T, Adachi M, Kunkel SL. Neutrophil-derived cytokines: potential therapeutic targets in inflammation. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*. 2005;4:273-9.

Kataoka H, Hamilton JR, Mckemy DD, Camerer E, Zheng YW, Cheng A, Griffin C, Coughlin SR. Protease-activated receptors 1 and 4 mediate thrombin signaling in endothelial cells. *Blood*. 2003;102:3224-31.

Kato H, Amersi F, Buelow R, Melinek J, Coito AJ, Ke B, Busuttil RW, Kupiec-Weglinski JW. Heme oxygenase-1 overexpression protects rat livers from ischemia/reperfusion injury with extended cold preservation. *Am J Transplant*. 2001;1:121–8.

Kawai T, Akira S. Signaling to NF-kappaB by Toll-like receptors. *Trends Mol Med*. 2007;11:460-9.

Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol*. 2010;11:373-84.

Kim YH, Choi KH, Park JW, Kwon TK. LY294002 inhibits LPS-induced NO production through a inhibition of NF-kappaB activation: independent mechanism of phosphatidylinositol 3-kinase. *Immunol Lett.* 2005;99:45-50.

Kobayashi K, Hernandez LD, Galán JE, Janeway CA Jr, Medzhitov R, Flavell RA. IRAK-M is a negative regulator of Toll-like receptor signaling. *Cell.* 2002;110:191-02.

Kobayashi Y. The role of chemokines in neutrophil biology. *Front Biosci.* 2008;13:2400-07.

Kok MR, Yamano S, Lodde BM, Wang J, Couwenhoven RI, Yakar S, Voutetakis A, Leroith D, Schmidt M, Afione S, Pillemer SR, Tsutsui MT, Tak PP, Chiorini JA, Baum BJ: Local adeno-associated virus-mediated interleukin 10 gene transfer has disease-modifying effects in a murine model of Sjogren's syndrome. *Hum Gene Ther.* 2003;14:1605-18.

Komegae EN, Ramos AD, Oliveira AK, Serrano SM, Lopes-Ferreira M, Lima C. Insights into the local pathogenesis induced by fish toxins: role of natterins and natterectin in the disruption of cell-cell and cell-extracellular matrix interactions and modulation of cell migration. *Toxicon.* 2011;58:509-17.

Komegae EN. Papel dos receptores inatos TLR na formação de memória humoral e linfócitos B de longa vida: Ação das proteases Natterinas, toxinas majoritárias do veneno de T. Nattereri. 2010. 76 f. Dissertação (Mestrado em Imunologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Kumar V, Abbas AK, Fausto N. Robbins e Contran: Patologia – bases patológicas das Doenças. 7 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005. P 49-79.

Kuschert GSV, Coulin F, Power CA, Proudfoot AEI, Hubbard RE, Hoogewerf AJ, Wells TNC. Glycosaminoglycans interact selectively with chemokines and modulate receptor binding and cellular responses. *Biochemistry.* 1999;38:12959-68.

Kwak J, Workman JL, Lee D. The proteasome and its regulatory roles in gene expression. *Biochim Biophys Acta.* 2011;1809:88-96.

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

Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol.* 2007;7:678-89.

Ley L. Integration of inflammatory signals by rolling neutrophils. *Immunol Rev.* 2002;186:8-18.

Li H, Chen L, Zhang Y, Lesage G, Zhang Y, Wu Y, Hanley G, Sun S, Yin D. Chronic stress promotes lymphocyte reduction through TLR2 mediated PI3K signaling in a β -arrestin 2 dependent manner. *J Neuroimmunol.* 2011;233:79.

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

Lima C, Clissa PB, Piran-Soares AA, Tanjoni I, Moura-da-Silva AM, Lopes-Ferreira M. Characterisation of local inflammatory response induced by *Thalassophryne nattereri* fish venom in a mouse model of tissue injury. *Toxicon*. 2003;42:499-07.

Lin YT, Chen YH, Yang YH, Jao HC, Abiko Y, Yokoyama K, Hsu C. Heme oxygenase-1 suppresses the infiltration of neutrophils in rat liver during sepsis through inactivation of p38 MAPK. *Shock*. 2010;34:615-21.

Lopes-Ferreira M, Bárbaro KC, Cardoso DF, Moura-da-silva AM, Mota I. *Thalassophryne nattereri* fish venom: biological and biochemical characterization and serum neutralization of its toxic activities. *Toxicon*. 1998;36:405-10.

Lopes-Ferreira M, Emim JA, Oliveira V, Puzer L, Cezari MH, Araujo Mda S, Juliano L, Lapa AJ, Souccar C, Moura-da-Silva AM. Kininogenase activity of *Thalassophryne nattereri* fish venom. *Biochem Pharmacol*. 2004;68:2151-7.

Lopes-Ferreira M, Nunez J, Rucavado A, Farsky SHP, Lomonte B, Angulo Y, Moura-da-Silva AM, Gutiérrez JM. Skeletal muscle necrosis and regeneration after injection of *Thalassophryne nattereri* (niquim) fish venom in mice. *J Exp Path*. 2001;82:55-64.

Lubbad A, Oriowo MA, Khan I. Curcumin attenuates inflammation through inhibition of TLR-4 receptor in experimental colitis. *Mol Cell Biochem*. 2009;322:127-35.

Luster AD, Alon R, Von Andrian HU. Immune cell migration in inflammation: present and future therapeutic targets. 2005;6:1182-90.

Lynn M, Wong YN, Wheeler JL, Kao RJ, Perdomo CA, Noveck R, Vargas R, D'Angelo T, Gotzkowsky S, McMahon FG, Wasan KM, Rossignol DP. Extended in vivo pharmacodynamic activity of E5564 in normal volunteers with experimental endotoxemia [corrected]. *J Pharmacol Exp Ther*. 2004;308:175-81.

Lynn M, Rossignol DP, Wheeler JL, Kao RJ, Perdomo CA, Noveck R, Vargas R, D'Angelo T, Gotzkowsky S, McMahon FG. Blocking of responses to endotoxin by E5564 in healthy volunteers with experimental endotoxemia. *J Infect Dis*. 2003;187:631-39.

Magalhães GS, Junqueira-de-Azevedo ILM, Lopes-Ferreira M, D.M. Lorenzini DM, Ho PL, Moura-da-Silva AM. Transcriptome analysis of expressed sequence tags from the venom glands of the fish *Thalassophryne nattereri*. *Biochimie*. 2006;88:693–99.

Magalhães GS, Lopes-Ferreira M, Junqueira-de-Azevedo ILM, Spencer PJ, Araújo MS, Portaro FCV, Ma L, Valente RH, Juliano L, Fox JW, Ho PL, Moura-da-Silva AM. Natterins, a new class of proteins with kininogenase activity characterized from *Thalassophryne nattereri* fish venom. *Biochimie*. 2005;87:687-99.

Mages J, Dietrich H, Lang R. A genome-wide analysis of LPS tolerance in macrophages. *Immunobiol.* 2007;212:723-37.

Manning G, Whyte DB, Martinez R, Hunter T, Sudarsanam S. "The protein kinase complement of the human genome". *Science.* 2002;298:1912-34.

Marchant A, Bruyns C, Vandenabeele P, Ducarme M, Gerard C, Delvaux A, De GD, Abramowicz D, Velu T, and Goldman M. Interleukin-10 controls interferon-gamma and tumor necrosis factor production during experimental endotoxemia. *Eur J Immunol.* 1994;24:1167-71.

Maslash-Hubbard A, El-wiher N, Shanley TP and Cornell TT. Negative Regulators of the Host Response in Sepsis. *The Open Inflammation J.* 2011;4:61-6.

Medvedev A.E., Piao W., Shoenfelt J., Rhee S.H., Chen H., Basu S., Wahl L.M., Fenton M.J. and Vogel S.N. Role of TLR4 tyrosine phosphorylation in signal transduction and endotoxin tolerance. *J. Biol. Chem.* 2007;282:16042–53.

Melby JC, Egdaahl RH, Spik WW. Secretion and metabolism of cortisol after injection of endotoxin. *J Lab Clin Med.* 1960;56:50-62.

Miggin SM, O'Neill LA. New insights into the regulation of TLR signaling. *J Leukoc Biol.* 2006;80:220-26.

Moberg GP. Site of action of endotoxins on hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Am J Physiol;* 1971;220:397-400.

Moser B, Loetscher P. Lymphocyte traffic control by chemokines. *Nat Immunol.* 2001;2:123-28.

Muller Kobold AC, Tulleken JE, Zijlstra JG, Sluiter W, Hermans J, Kallenberg CG, Tervaert JW. Leukocyte activation in sepsis: correlations with disease state and mortality. *Intensive Care Med.* 2000;26:883-92.

Murdoch C, Finn A. Chemokine receptors and their role in inflammation and infectious diseases. *Blood.* 2000;95:3032-43.

Naiki Y, Michelsen KS, Zhang W, Chen S, Doherty TM, Arditi M. Transforming growth factor-beta differentially inhibits MyD88-dependent, but not TRAM- and TRIF-dependent, lipopolysaccharide-induced TLR4 signaling. *J Biol Chem.* 2005;280:5491-5.

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

Noubir S, Hmama Z, Reiner NE. Dual receptors and distinct pathways mediate interleukin-1 receptor-associated kinase degradation in response to lipopolysaccharide. Involvement of CD14/TLR4, CR3, and phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem.* 2004;279:25189-95.

O'Farrell AM, Liu Y, Moore KW, Mui AL. IL-10 inhibits macrophage activation and proliferation by distinct signaling mechanisms: evidence for Stat3-dependent and -independent pathways. *EMBO J*. 1998;17:1006-18.

Pareja-Santos A, Saraiva TC, Costa EP, Santos MF, Zorn TT, Souza VMO, Lopes-Ferreira M, Lima C. Delayed local inflammatory response induced by *Thalassophryne nattereri* venom is related to extracellular matrix degradation. *Int J Exp Path*. 2009;90:34–43.

Parish CR. The role of heparan sulphate in inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2006;6:633-43.

Park SY, Park GY, Ko WS, Kim Y. Dichroa febrifuga Lour. inhibits the production of IL-1 β and IL-6 through blocking NF- κ B, MAPK and Akt activation in macrophages. *J Ethnopharmacol*. 2009;125:246-51.

Petri B, Bixel MG. Molecular events during leukocyte diapedesis. *FEBS J*. 2006;273:4399-07.

Piao W, Song C, Chen H, Diaz MA, Wahl LM, Fitzgerald KA, Li L, Medvedev AE. Endotoxin tolerance dysregulates MyD88- and Toll/IL-1R domain-containing adapter inducing IFN- β -dependent pathways and increases expression of negative regulators of TLR signaling. *J Leukoc Biol*. 2009;86:863-75.

Pinheiro da Silva F, Soriano FG. Neutrophils recruitment during sepsis: critical points and crossroads. *Front Biosci*. 2009;14:4464-76.

Pober JS, Sessa WC. Evolving functions of endothelial cells in inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2007;7:803-15.

Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, Van Huffel C, Du X, Birdwell D, Alejos E, Silva M, Galanos C, Freudenberg M, Ricciardi-Castagnoli P, Layton B, and Beutler B. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in *Tlr4* gene. *Science*. 1998;282:2085-8.

Rankin JA. Biological mediators of acute inflammation. *AACN clin issues*. 2004;15:3-17.

Rauh MJ, Ho V, Pereira C, Sham A, Sly LM, Lam V, Huxham L, Minchinton AI, Mui A, Krystal G. SHIP represses the generation of alternatively activated macrophages. *Immunity*. 2005;23:361-74.

Sarmiento M, Zhao Y, Gordon SJ, Zhang ZY. Molecular basis for substrate specificity of protein-tyrosine phosphatase 1B. *J Biol Chem*. 1998;273:26368-74.

Sato S, Nomura F, Kawai T, Takeuchi O, Mühlradt PF, Takeda K, Akira S. Synergy and cross-tolerance between toll-like receptor (TLR) 2- and TLR4-mediated signaling pathways. *J Immunol*. 2000;165:7096-01.

Schabbauer G, Tencati M, Pedersen B, Pawlinski R, and Mackman N. PI3K-Akt pathway suppresses coagulation and inflammation in endotoxemic mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24:1963-9.

Seldon MP, Silva G, Pejanovic N, Larsen R, Gregoire IP, Filipe J, Anrather J, Soares MP. Heme oxygenase-1 inhibits the expression of adhesion molecules associated with endothelial cell activation via inhibition of NF-kappaB RelA phosphorylation at serine 276. *J Immunol.* 2007;179:7840-51.

Serhan CN. Resolution phase of inflammation: novel endogenous anti-inflammatory and proresolving lipid mediators and pathways. *Annu Rev Immunol.* 2007;25:101-37.

Sladowski D, Kinsnerb A, Langezaala I, Kaya S, Coeckea S. Activation of the complement system as an indicator of pyrogenic reaction to lipopolysaccharide (LPS). *Toxicol in Vitro.* 2001;15:339-42.

Smith CW. 3. Adhesion molecules and receptors. *J Allergy Clin Immunol.* 2008;121:375-9.

Soares MP, Lin Y, Anrather J, Csizmadia E, Takigami K, Sato K, Grey ST, Colvin RB, Choi AM, Poss KD, Bach FH. Expression of heme oxygenase-1 can determine cardiac xenograft survival. *Nat Med.* 1998;4:1073-7.

Soares MP, Seldon MP, Gregoire IP, Vassilevskaia T, Berberat PO, Yu J, Tsui TY, Bach FH. Heme oxygenase-1 modulates the expression of adhesion molecules associated with endothelial cell activation. *J Immunol.* 2004;172:3553-63.

Springer TA. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell.* 1994;76:301-14.

Stovall SH, Yi AK, Meals EA, Talati AJ, Godambe SA and English BK. Role of vav1- and src-related tyrosine kinases in macrophage activation by CpG DNA. *J Biol Chem.* 2004;279:13809–16.

Takeda K, kaisho T, Akira S. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol.* 2003;21:335-76.

Tanaka Y, Adams DH, Shaw S. Proteoglycans on endothelial cells present adhesion-inducing cytokines to leukocytes. *Immunol Today.* 1993;14:111–5.

Tavares-Murta BM, Zapparoli M, Ferreira RB, Silva-Vergara ML, Oliveira CH, Murta EF, Ferreira SH, Cunha FQ. Failure of neutrophil chemotactic function in septic patients. *Crit Care Med.* 2002;30:1056-61.

van der Poll T, van Deventer SJ. Cytokines and anticytokines in the pathogenesis of sepsis. *Infect Dis Clin North Am.* 1999;13:413–26.

Van 't Veer C, Van den Pangaart PS, Van Zoelen MA, de Kruif M, Birjmohun RS, Stroes ES, de Vos AF, Van der Poll T. Induction of IRAK-M is associated with lipopolysaccharide tolerance in a human endotoxemia model. *J Immunol.* 2007;179:7110-20.

Vergnolle N, Derian CK, D'Andrea MR, Steinhoff M, Andrade-Gordon P. Characterization of thrombin-induced leukocyte rolling and adherence: a potential proinflammatory role for proteinase-activated receptor-4. *J Immunol.* 2002;169:1467-73.

Vergnolle N. Protease-activated receptors and inflammatory hyperalgesia. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2005;1:173-6.

Vergnolle N. Protease-activated receptors as drug targets in inflammation and pain. *Pharmacol Ther.* 2009;123:292-09.

Vicente AM, Guillén MI, Habib A, Alcaraz MJ. Beneficial effects of heme oxygenase-1 up-regulation in the development of experimental inflammation induced by zymosan. *J Pharmacol Exp Ther.* 2003;307:1030-37.

Wagener FA, da Silva JL, Farley T, de Witte T, Kappas A, Abraham NG. Differential effects of heme oxygenase isoforms on heme mediation of endothelial intracellular adhesion molecule 1 expression. *J Pharmacol Exp Ther.* 1999;291:416-23.

Wagener FA, Eggert A, Boerman OC, Oyen WJ, Verhofstad A, Abraham NG, Adema G, van Kooyk Y, de Witte T, Figdor CG. Heme is a potent inducer of inflammation in mice and is counteracted by heme oxygenase. *Blood.* 2001;98:1802-11.

Wagener FA, van Beurden HE, von den Hoff JW, Adema GJ, Figdor CG. The heme-heme oxygenase system: a molecular switch in wound healing. *Blood.* 2003;102:521-8.

Webb LM, Ehrenguber MU, Clark-Lewis I, Baggiolini M, Rot A. Binding to heparan sulfate or heparin enhances neutrophil responses to interleukin 8. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1993;90:7158-62.

Weber C, Line Fraemohs L, Dejana E. The role of junctional adhesion molecules in vascular inflammation. *Nat Rev Immunol.* 2007;7:467-77.

Williams DL, Li C, Ha T, Ozment-Skelton T, Kalbfleisch JH, Preiszner J, Brooks L, Breuel K, and Schweitzer JB. Modulation of the phosphoinositide 3-kinase pathway alters innate resistance to polymicrobial sepsis. *J Immunol.* 2004;172:449-56.

Willis D, Moore AR, Frederick R, Willoughby DA. Heme oxygenase: a novel target for the modulation of the inflammatory response. *Nat Med.* 1996;2: 87-90.

Wintersteller S, Hahnhaussen J, Kofler B, Emmanuel K. Molecular mediators of polymicrobial sepsis. *Front Biosci.* 2012;4:2584-04.

Wong MM, Fish EN. Chemokines: attractive mediators of the immune response. *Semin Immunol*. 2003;15:5-14.

Xu H, An H, Hou J, Han C, Wang P, Yu Y, Cao X. Phosphatase PTP1B negatively regulates MyD88- and TRIF-dependent proinflammatory cytokine and type I interferon production in TLR-triggered macrophages. *Mol Immunol*. 2008;45:3545-52.

Yoshidome H, Kato A, Edwards MJ, Lentsch AB: Interleukin-10 suppresses hepatic ischemia/reperfusion injury in mice: implications of a central role for nuclear factor kappaB. *Hepatology*. 1999;30:203–08.

Yuan TL, Cantley LC. PI3K pathway alterations in cancer: variations on a theme. *Oncogene*. 2008;27:5497- 10.

Zhao H, Leu SW, Shi L, Dedaj R, Zhao G, Garg HG, Shen L, Lien E, Fitzgerald KA, Shiedlin A, Shen H, Quinn DA, Hales CA. TLR4 is a negative regulator in noninfectious lung inflammation. *J Immunol*. 2010;184:5308-14.

Zhao Q, Wang X, Nelin LD, Yao Y, Matta R, Manson ME, Baliga RS, Meng X, Smith CV, Bauer JA, Chang CH, Liu Y. MAP kinase phosphatase 1 controls innate immune responses and suppresses endotoxic shock. *J Exp Med*. 2006;203:131-40.

Zimmerman MA, Reznikov LL, Raeburn CD, Selzman CH: Interleukin-10 attenuates the response to vascular injury. *J Surg Res*. 2004;121: 206-13.