RAFAEL SALIM NASSAR

**Potencial da Migalina (Acilpoliamina) como
agente imunomodulador das funções de
macrófagos murinos**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação
Interunidades em Biotecnologia
USP/Instituto Butantan/IPT, para
obtenção do Título de Mestre em
Biotecnologia.

São Paulo
2013

RAFAEL SALIM NASSAR

**Potencial da Migalina (Acilpoliamina) como
agente imunomodulador das funções de
macrófagos murinos**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

Área de Concentração: Biotecnologia

Orientadora: Dra. Monamaris Marques Borges

Versão original.

São Paulo
2013

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

Nassar, Rafael Salim.

Potencial da micalina (acilpoliamina) como agente imunomodulador das funções de macrófagos murinos / Rafael Salim Nassar. -- São Paulo, 2013.

Orientador: Profa. Dra. Monamaris Marques Borges.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de pesquisa: Atividade imunomoduladora de poliamina com potencial terapêutico.

Versão do título para o inglês: The potential of mygalin (acylpolyamine) as an immunomodulator agent of murine macrophage functions.

1. Micalina 2. Poliamina 3. Macrófagos 4. Citocinas 5. TLR
6. Nitrito I. Borges, Profa. Dra. Monamaris Marques II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan III. Título.

ICB/SBIB082/2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

---

Candidato(a):   Rafael Salim Nassar.

Título da   Potencial da migalina (acilpoliamina) como agente
imunomodulador das funções de macrófagos murinos.

Orientador(a):   Profa. Dra. Monamaris Marques Borges.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou

☐ **Aprovado(a)**

☐ **Reprovado(a)**

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

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

Presidente: Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO BUTANTAN

Av. Dr. Vital Brazil, 1500, CEP 05503-900, São Paulo, SP, Brazil
Telefone: (55) (011) 2627-9585 - Fax: (55) (011) 2627-9505
ceuaib@butantan.gov.br

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Potencial da migalina (Acilpoliamina) como agente imunomodulador das funções de macrófagos murinos", **protocolo nº 908/12**, sob a responsabilidade de Monamaris Marques Borges e Rafael Salim Nassar – que envolve a criação e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica – está de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto 6.899, de 15 de julho de 2009 e de normas complementares, bem como 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 20/02/2013.

Vigência do Projeto: 05/2012 - 05/2014	Nº de animais/espécie	Aditivo/Observação
Laboratório de Bacteriologia	15 camundongos C57BL/6 Knockout - inclusão 15 camundongos C57BL/6, 15 camundongos C3H/HeJ, 15 camundongos KO MyD88 (M);	Inclusão de linhagem Estes animais não serão retirados do Biotério Central do Instituto Butantan

São Paulo, 26 de fevereiro de 2013

Dra. Wafa H. K. Cabrera
Vice-Coordenadora da CEUAIB

À Deus, por tudo e por ser meu eterno orientador.

Aos meus pais, Elza e Antônio, pelo amor incondicional, estrutura e pelos exemplos
morais a mim transferidos.

Aos meus queridos irmãos, Márcia, Mara e Ricardo e suas famílias por estarem
sempre ao meu lado.

À minha querida e amada esposa Débora pelo amor, carinho, apoio,
companheirismo, paciência, incentivo e por compartilhar comigo sua vida.

AGRADECIMENTOS

À Dra. Monamaris Marques Borges, pela paciência, confiança e por como orientadora, não ter se limitado apenas a ensinar os conhecimentos intelectuais, foi muito além, foi uma amiga e conselheira, obrigado.

À Cynthia, por me ensinar a admirá-la, uma pessoa com um conjunto de qualidades singulares. Obrigado pela amizade, ensinamentos, e por ter dado estrutura a este e a tantos outros trabalhos, somos eternos devedores a sua contribuição.

À Daniela Mourão, por ser uma amiga e irmã, pela afinidade e companheirismo que a vida nos deu a possibilidade de compartilharmos.

À Priscila por ter se mostrado uma grande pessoal e profissional, embora não compartilharmos muitos momentos, mas lhe admirei pelos momentos que compartilharmos.

Ao Diego, por ter dado estrutura a este trabalho.

Ao Dr. Pedro Ismael, não apenas por fornecer a Migalina, mas também pela disposição em transmitir conhecimento.

Ao Dr. Waldir e a Dra Roxane, pelo apoio, em especial por dizerem que eu tinha perfil e capacidade para ser um bom pesquisador, palavras que me ajudaram a voltar à pesquisa em um momento em que a vida me fez velejar por outros mares.

As grandes amizades: Gabi, Keyde, Thyátira, Dani, Letícia, Naty, Cris, Caio, Dra. Denise, Ro, Hebert, Cris Mota, Afonso, Silvio, Andressa, Pri, Cláudia, Lucas, aos funcionários e a todos os outros que estiveram no laboratório durante a minha jornada, pois acompanharam importantes etapas da minha vida, tanto científica como pessoal.

Aos demais pesquisadores do Laboratório de Bacteriologia, pelo apoio moral e científico.

Aos funcionários do Instituto Butantan e da Universidade de São Paulo, pelo apoio e dedicação prestados.

Aos professores, pelos ensinamentos e sugestões durante o mestrado.

A Lilian e a equipe do Centro de Controle de Zoonoses, pelo apoio e compreensão.

Aos membros da banca, tanto da qualificação quanto da defesa, por corroborarem no meu desenvolvimento pessoal e profissional e por serem peças chaves no desenvolvimento deste trabalho.

Obrigado a todos.

“Não se pode ensinar nada a um homem; só é possível ajudá-lo a encontrar a resposta dentro de si”.

Galileu Galilei

RESUMO

NASSAR, R. S. **Potencial da Migalina (Acilpoliamina) como agente imunomodulador das funções de macrófagos murinos**. 2013. 77 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

As poliaminas naturais, putrecina, espermidina e espermina são elementos essenciais para as células de todos os seres vivos. Essas moléculas possuem baixo peso molecular e influenciam mecanismos celulares fundamentais, incluindo replicação de DNA, apoptose, transcrição e translocação e modulação de sinais intracelulares. A via biossintética das poliaminas tem sido alvo de pesquisas na tentativa de controlar células tumorais e agentes patogênicos, uma vez que a redução de seu conteúdo intracelular resulta em efeito anti-proliferativo. Recentemente foi isolada uma acilpoliamina na hemolinfa da aranha *Acanthoscurria gomesiana*, a qual foi sintetizada e identificada como uma bis-acilpoliamina análoga da espermidina e denominada Migalina. Este composto mostrou atividade microbicida contra *E. coli*, porém o seu efeito imunomodulador não foi explorado. Os mediadores imunes produzidos por macrófagos são críticos para a regulação da resposta imune e inflamatória uma vez que estas células são implicadas no processo de fagocitose, geração de mediadores imunes e expressão de moléculas co-estimulatórias. A natureza e o nível de ativação destas células definem a imunidade adaptativa a ser gerada no organismo. Neste trabalho investigamos o efeito *in vitro* da Migalina, sobre a atividade de macrófagos, analisando alguns mediadores imunes produzidos durante a ativação destas células associada ou não a moléculas sinalizadoras adicionais. Nossos resultados mostram que macrófagos murinos derivados da medula óssea (M ϕ DM) de camundongos da linhagem C57BL/6 estimulados com Migalina não induziu citotoxicidade, entretanto aumentou a síntese de nitrito devido a ativação da enzima iNOS independente da adição exógena de IFN- γ . A produção de TNF- α aumentou, mas não foram encontradas diferenças significativas na síntese de IL-12p40. Além disto, a presença de IL-1 β não foi detectada. Observamos que em concentrações mais elevadas a Migalina inibiu significativamente a produção de IL-12p40 e TNF- α induzida por LPS e a associação deste composto com Polimixina B não alterou a síntese de TNF- α . Verificamos também que M ϕ DM de camundongos MyD88 $^{-/-}$ ativados com Migalina não induziu a síntese de TNF- α , indicado que uma via TLR dependente de MyD88 é essencial para a síntese de citocinas mediada por Migalina. Nossos resultados mostraram que a Migalina é capaz de modular a atividade de macrófagos induzindo mediadores da resposta imune inata e pode ser explorada como estratégia no controle de infecções.

Palavras-chave: Migalina. Poliaminas. Macrófagos. Citocinas. TLR. Nitrito. Resposta imune inata.

ABSTRACT

NASSAR, R. S. **The potential of Mygalin (Acylpolyamine) as an immunomodulator agent of murine macrophage functions.** 2013. 77 p. Masters thesis (Biotechnology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Natural polyamines (putrescine, spermine and spermidine) are essential elements of cells from all species. They have low molecular weight and are implicated in many cellular processes, including DNA replication, apoptosis, transcription and translocation and modulation of intracellular signs. The biosynthetic pathway of polyamines has been target of research in attempt to control tumor cells and pathogenic agents, once the reduction of its intracellular content results in an anti-proliferative effect. Recently, an acylpolyamine was isolated from the hemocytes of the spider *Acanthoscurria gomesiana*, and identified as bis-acylpolyamine, a spermidine analogous denominated Mygalin. This compound showed microbicidal activity against *E. coli*, however, its immunomodulator effect has not yet been explored. Immune mediators produced by macrophages are essential for the regulation of immune and inflammatory responses, since these cells have been implicated in the phagocytosis process, generation of immune mediators and the expression of costimulatory molecules. The nature and level of activation of these cells will define the adaptive immunity to be generated in the body. We investigated the effect of the synthetic acylpolyamine Mygalin associated or not with additional signaling molecules as an immunomodulator of the innate immune response. Our results showed that, C57BL/6 bone marrow-derived macrophages (BDM ϕ) stimulated with Mygalin did not induce cytotoxicity, but increased NO $_2^-$ secretion through direct activation of iNOS-independent of macrophage activation by exogenous IFN- γ . The production of TNF- α was increased, however no significant differences was seen in the IL-12p40 synthesis. Furthermore, the presence of IL-1 β was not detected. We also saw that in higher concentrations, Mygalin inhibited significantly the production of IL-12p40 and TNF- α induced by LPS, and the association of Mygalin with Polymixine B did not change the TNF- α synthesis. We found that MyD88 $^{-/-}$ BDM ϕ activated with Mygalin did not release TNF- α , indicating that the MyD88-dependent pathway through TLR is essential for cytokine production during the Mygalin stimulatory activity. Our results suggest that Mygalin should be further explored as an immunomodulator of macrophages activity and can be investigated as a strategy in the control of infections.

Keywords: Mygalin. Polyamine. Macrophages. Cytokines. TLR. Nitrite. Innate immune response.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Vias de obtenção das poliaminas	19
Figura 2 – Via biossintética das poliaminas	20
Figura 3 – Estrutura das poliaminas em pH fisiológico	21
Figura 4 – Estrutura molecular da Migalina	25
Figura 5 – Processo de maturação de macrófagos	26
Figura 6 – Respostas ao reconhecimento de PAMPs pelos TLRs	29
Figura 7 – Participação de MyD88 nas possíveis vias de sinalização desencadeadas pelos TLRs	31
Figura 8 – Efeito da Migalina sobre a viabilidade de MφDM de camundongos C57BL/6	41
Figura 9 – Síntese de NO ₂ ⁻ por MφDM de camundongos C57BL/6 ativados com Migalina	42
Figura 10 – Efeito do tratamento das culturas de macrófagos com inibidor específico da iNOS (L-NIL) antes do estímulo com Migalina.....	43
Figura 11 – Produção de TNF-α por MφDM estimulados com Migalina	44
Figura 12 – Análise da produção de IL-12p40 em resposta ao estímulo com Migalina a MφDM.....	45
Figura 13 – Efeito da adição de Migalina na produção de TNF-α induzido pela ativação de MφDM por LPS.....	47
Figura 14 – Efeito da adição de Migalina na produção de IL-12p40 induzido pela ativação de MφDM por LPS.....	48
Figura 15 – Participação da molécula MyD88 na produção de TNF-α induzida por Migalina	49
Figura 16 – Influência da Polimixina B na produção de TNF-α durante a ativação dos MφDM por Migalina	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AdoMetDC - S-adenosilmetionina descarboxilase
AP - Proteína ativadora
ATP – Adenosina trifosfato
Az – Antienzima
AzI - Inibidor de antienzima
BAP - 1,4-bis (3-aminopropil)-piperazina
BNIP – bisnaftalimidopropil
CNS - Sistema nervoso central
Con A - concanavalina A
DAMPs - Padrões moleculares associados a danos
DNA – Ácido desoxirribonucleico
DO - Densidade óptica
ERNs - Espécies reativas de nitrogênio
EROs - Espécies reativas de oxigênio
GM-CFU - Granulocito/ Unidade formadora de colônia de macrófago
GM-CSF - Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos
HSC - Célula tronco hematopoiética
IFN- γ - Interferon gama
IKK - Complexo IKB quinase
IL – Interleucina
iNOS – Óxido nítrico sintase induzida
IRAK - Quinase associada ao receptor IL-1
IRF - Fator regulatório de interferon
LBP – Proteína ligadora de lipopolissacaridio
LFA-1 - Antígeno 1 associado à função leucocitária
L-NIL - Inibidor específico de iNOS
LPS – Lipopolissacaridio
LRR – Repetições ricas em leucina
M1 – Fenótipo clássico de macrófagos
M2 – Fenótipo alternativo de macrófagos
MAPK - Proteína quinase ativada por mitógeno
MAT - Metionina adenosiltransferase

M-CFU - Unidade formadora de colônia de macrófago
M-CSF – Fator estimulador de colônia de macrófago
MD2 - Proteína de diferenciação mielóide 2
MIC - Concentração mínima inibitória
MIP – Proteína inflamatória de macrófago
MS/MS - Espectrometria de massa em tandem
MyD 88 - Fator de diferenciação mielóide 88
MyD88^{-/-} - Deficiência para a molécula MyD 88
NaNO₂ – Nitrito de sódio
NF-κB - Fator de transcrição nuclear kappa B
NK – Células natura *killer*
NLR – Receptores do Tipo NOD
NMR - Ressonância nuclear magnética
NO - Óxido nítrico
NO₂⁻ - Nitrito
ODC -Ornitina Descarboxilase
PAMPs - Padrões moleculares associados a patógenos
PAO - Poliamina oxidase
PBMC – Células mononucleares do sangue periférico
PBS – Tampão fosfato salino
pH – Ponto hidrogenionico
PLMX B – Polimixina B
PRRs - Receptores de reconhecimento padrão
RNA - Ácido desoxirribonucléico
RNAm - Ácido desoxirribonucléico menssageiro
SAMDC - S-adenosilmetionina descarboxilase
SEM - Erro padrão da média
SFB - Soro fetal bovino
SMO – Espermina oxidase
SSAT - Espermidina/espermina N₁-acetiltransferase
TBK - *Quinase ligada a TANK*
TGF-β – Fator transformador de crescimento beta
TIR - Região homologa de receptores Toll/IL-1-receptor
TIRAP - Proteína associada à TIR

TLRs - Receptores do tipo Toll

TNF- α - Fator de Necrose Tumoral alfa

TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa

TRAF - Fator associado ao receptor de TNF

TRAM - Molécula adaptadora relacionada a TRIF

TRIF - Adaptador indutor de interferon- β que contém o domínio TIR

UV – Ultravioleta

LISTA DE SIMBOLOS

μg - Micrograma

μL – Microlitro

h - Horas

mg – Miligrama

mL - Mililitros

mM – Milimolar

M ϕ DM - Macrófagos derivados da medula óssea murina

N - Normal

ng – Nanogramas

nm - Nanômetros

$^{\circ}\text{C}$ – Graus Celsius

UI - Unidade internacional

x g - Força gravitacional

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
1.1 Poliaminas	18
1.2 Fontes de obtenção das poliaminas pelas células eucarióticas	18
1.2.1 <i>Obtenção da via biossintética</i>	19
1.2.2 <i>Captura de poliaminas do meio extracelular</i>	20
1.3 Estrutura, função e análogos	21
1.4 Migalina	23
1.5 Macrófagos e receptores do tipo Toll	25
1.5.1 <i>Ativação de macrófagos</i>	31
2 OBJETIVOS	34
3 MATERIAL E MÉTODOS	35
3.1 Obtenção da Migalina	35
3.2 Cultura de células	35
3.2.1 <i>Cultivo de células L929 para a obtenção do fator de crescimento (M-CSF) para diferenciação dos macrófagos derivados de medula óssea murina (MφDM)</i>	35
3.2.2 <i>Isolamento e diferenciação dos macrófagos</i>	36
3.2.3 <i>Ativação dos macrófagos</i>	37
3.2.4 <i>Ensaio de viabilidade celular</i>	37
3.2.5 <i>Efeito do tratamento com Polimixina B</i>	38
3.3 Dosagem de NO	38
3.4 Ensaio de Elisa para dosagem de citocinas	38
3.5 Análise estatística	39
4 RESULTADOS	40
4.1 Análise da viabilidade dos macrófagos derivados da medula óssea murina (MφDM) de camundongos C57BL/6 após estímulo com Migalina	40
4.2 Ação da Migalina sobre a produção de NO₂⁻ por MφDM de camundongos C57BL/6	41
4.2.1 <i>Produção de NO₂⁻</i>	41
4.2.2 <i>Efeito do tratamento das culturas de macrófagos com inibidor específico de iNOS (L-NIL) antes do estímulo com Migalina</i>	42
4.3 Efeitos da Migalina sobre a capacidade de ativar macrófagos a produzir citocinas	43

4.3.1 Produção de $TNF-\alpha$	43
4.3.2 Produção de IL-12p40	44
4.3.3 Produção de IL-1 β	45
4.4 Efeito da Migalina sobre a ativação de macrófagos induzida por LPS	45
4.4.1 Produção de $TNF-\alpha$	46
4.4.2 Produção de IL-12p40	47
4.5 Contribuição da molécula MyD88 para ativação de MϕDM por Migalina	48
4.6 Influência da PLMX na síntese de $TNF-\alpha$ produzido por MϕDM ativados com Migalina	49
5 DISCUSSÃO	51
6 CONCLUSÃO	59
REFERÊNCIAS	60
APÊNDICE - The spider acylpolyamine Mygalin is a potent modulator of innate immune responses	70

1 INTRODUÇÃO

1.1 Poliaminas

No século XVII Antonie Van Leeuwenhoek mencionou a presença de um agregado de estruturas cristais ao observar amostras de sêmen humano, que foram posteriormente relacionadas às poliaminas (VAN LEEUWENHOEK, 1678; WALLACE; FRASER; HUGHES, 2003). Na década de 30, Dudley, Rosenheim, M. e Rosenheim, O. (1924) deduziram sua fórmula empírica e em seguida a sintetizaram quimicamente (DUDLEY; ROSENHEIM; STARLING, 1926). As poliaminas naturais são denominadas putrescina, espermina e espermidina. A espermina e a espermidina foram inicialmente observadas em espermatozoides, dando origem a nomenclatura e embora a putrescina tenha sido descoberta no *Vibrio cholerae*, seu nome deriva da grande quantidade isolada em carnes no estado de putrefação (STADTHAGEN; BRIEGER, 1889).

As moléculas de poliaminas são altamente conservadas no processo evolutivo, sendo encontradas em todas as espécies vivas, exceto em duas ordens de Archaea, Methanobacteriales e Halobacteriales (HAMANA; MATSUZAKI, 1992).

Devido ao seu amplo espectro de ação, as poliaminas se tornaram alvos de vários estudos científicos, desde 1900 foram publicados mais de 75.000 trabalhos, destes, 54% foram divulgados após a década de 90. Embora haja uma considerável demanda de trabalhos publicados até o momento, existem poucas abordagens conclusivas quanto aos mecanismos celulares, bioquímicos e moleculares das poliaminas (WALLACE, 2009).

1.2 Fontes de obtenção das poliaminas pelas células eucarióticas

As poliaminas são encontradas no ambiente intracelular em concentrações que estão na razão de milimolar (CASERO; MARTON, 2007), possuem baixo peso molecular, havendo pequenas variações estruturais entre os grupos (WALLACE; FRASER; HUGHES, 2003). Estas moléculas não se enquadram nas classes de carboidratos, lipídios e proteínas, embora a ornitina seja um de seus precursores biossintéticos (HAYASHI; MURAKAMI; MATSUFUJI, 1996).

O conteúdo intracelular de poliaminas é obtido basicamente de três formas: biossíntese celular e captação a partir do meio extracelular, esta se divide em absorção proveniente da dieta e da microbiota intestinal. A principal fonte é fornecida pela biossíntese, seguida pela dieta e posteriormente pela microbiota intestinal, conforme pode ser visto na Figura 1 (WALLACE, 2009).

Figura 1 - Vias de obtenção das poliaminas.
Fonte: (WALLACE, 2009).

1.2.1 Obtenção da via biossintética

A forma mais clássica de obtenção das poliaminas é a via biossintética (ver Figura 2 de **a-i**). Resumidamente, esta via é iniciada pela descarboxilação da ornitina em putrescina através da ornitina descarboxilase (ODC) (**a**). Posteriormente dois grupos aminopropil são adicionados a putrescina. A adição do primeiro grupo dá origem a espermidina sendo esta reação catalisada pela espermidina sintase (**b**). A adição do segundo grupo amino se dá através da espermina sintase gerando a espermina (**c**) (WALLACE, 2009).

Os grupos aminopropil são originados a partir da S-adenosilmetionina descarboxilada, que é produto da S-adenosilmetionina a qual é descarboxilada pela S-adenosilmetionina descarboxilase (SAMDC ou AdoMetDC) (**d**) (CASERO; MARTON, 2007).

As poliaminas são recicladas através da acetilação catalisada pela espermidina/espermina N_1 -acetiltransferase (SSAT) (**e**), seguida pela oxidação catalisada pela N_1 -acetilpoliamina oxidase (PAO) (**f**). Este sistema parece estar envolvido na exportação das poliaminas para o meio extracelular (**g**) (WALLACE; NUTTALL; COLEMAN, 1988).

fração destas moléculas que são capturadas e absorvidas através do intestino e posteriormente usadas pelas células do organismo (WALLACE, 2009).

Vários estudos buscam elucidar o sistema de transporte das poliaminas (BELTING et al., 2003; BELTING; PERSSON; FRANSSON, 1999; SOULET et al., 2004). Welch e colaboradores (2008) acreditam que o mecanismo de captura envolva interações iônicas, entretanto a real relação de equilíbrio entre as concentrações endógenas e exógenas e os mecanismos e proteínas envolvidas no complexo de transporte ainda não estão bem definidos (LO PERSSON, 2009).

1.3 Estrutura, função e análogos

As poliaminas são protonadas em pH fisiológico (Figura 3). Devido a esta propriedade, interagem com uma série de moléculas essenciais, como ácidos nucleicos (DNA, RNA, ATP), proteínas carregadas negativamente e fosfolipídios (IGARASHI; KASHIWAGI, 2010).

Figura 3 - Estrutura das poliaminas em pH fisiológico.
 Fonte: (WALLACE, 2009).

Tais interações influenciam mecanismos celulares essenciais, dentre eles, síntese proteica, proliferação, diferenciação (TABOR, C. V.; TABOR, H., 1984; THOMAS; THOMAS, 2001) e sinalização (LIU et al., 2003; LIU et al., 2005), além da defesa celular que ocorre através de ação antioxidante e anti-inflamatória (HASKO et al., 2000; LOVAAS; CARLIN, 1991).

A via metabólica das poliaminas tem sido amplamente explorada como alvo de intervenções terapêuticas no campo da oncologia. Células e tecidos carcinogênicos

apresentam acentuado aumento intracelular na concentração de poliaminas e na atividade da ODC, que é a principal reguladora da via biossintética (ver 1.2.1). Intervenções nestas etapas resultam na contenção da proliferação celular (WALLACE, 2009).

As poliaminas são essenciais para o crescimento celular. Foi verificado que a redução nas concentrações intracelulares de poliaminas resultou na diminuição da síntese de ácidos nucleicos e proteínas, levando a inibição da proliferação celular (GERNER; MEYSKENS, 2004). Embora o crescimento celular equilibrado esteja associado ao aumento das concentrações de poliaminas, níveis muito elevados destas parecem ser tóxicos para as células, induzindo a morte e apoptose (LO PERSSON, 2009).

Outro aspecto relevante das poliaminas é sua capacidade de modular sinais intracelulares (LIU et al., 2003; LIU et al., 2005), interferir na regulação gênica (CARLSON et al., 2009) gerar atividade antioxidante na interação com espécies reativas de oxigênio (EROs) (LOVAAS; CARLIN, 1991) além de atuarem em processos inflamatórios e imunossupressivos na dependência do tipo de poliamina utilizada (HASKO et al., 2000; ZHANG et al., 1997).

Pequenas mudanças na estrutura das poliaminas refletem distintas funções efectoras, sendo assim, seus análogos podem apresentar diferentes efeitos no metabolismo celular (PIGNATTI et al., 2004).

Análogos sintéticos da putrecina, espermidina e espermina derivados do bisnaftalimidopropil (BNIP) inibiram a proliferação induzida por concanavalina A e lipopolissacarídeo (LPS) em esplenócitos murinos e células mononucleares de sangue periférico humano. A BNIP putrescina exerceu efeito inibitório mais pronunciado, sugerindo uma relação entre o grau da inibição e o tamanho da molécula (CORDEIRO-DA-SILVA et al., 2004).

Outra comprovação de que a natureza da poliamina pode interferir diferentemente na resposta imune foi constatada no tratamento de leucócitos polimorfonucleares (PBMC) com a espermina sintética derivada do tetra-hidrocloridrato, onde houve acentuada inibição na expressão da molécula de adesão LFA-1(CD11a/CD18). Esta inibição foi menor no tratamento com espermidina enquanto a putrecina não exerceu qualquer efeito inibitório (SODA et al., 2005).

Vários análogos das poliaminas foram capazes de inibir a resposta imune. Foi demonstrado inibição da síntese de (óxido nítrico sintase induzida) iNOS e TNF- α

em macrófagos da linhagem J774 ativados com espermina (SZABO et al., 1994a) e de citocinas pro-inflamatórias em células mononucleares humanas estimuladas com LPS (ZHANG et al., 1997).

Foi verificado que o LPS, potente ativador das funções efetoras de macrófagos, exerceu efeito na via biossintética das poliaminas ao induzir a síntese de RNA mensageiro (RNAm) da enzima ODC em monócitos humanos e macrófagos murinos (MESSINA et al., 1990). Outra espermina sintética BAP (1,4-bis (3-aminopropil)-piperazina) comprovadamente teve ação sobre atividade de monócitos uma vez que suprimiu a síntese de TNF- α em células ativados por LPS (ZHANG et al., 1999) enquanto a espermina sintética CNI-1493 inibiu a síntese de IL-1, IL-6, proteína inflamatória de macrófago (MIP)-1 α/β induzida por LPS (ZHANG et al., 1997), IFN- γ e IL-12p40 em macrófagos (HASKO et al., 2000).

Os Receptores Toll-like (TLRs) são fundamentais para o estabelecimento da imunidade inata através do reconhecimento de patógenos pelas células hospedeiras, além disto, auxilia no desenvolvimento da imunidade adaptativa.

Pouco se conhece sobre o efeito das poliaminas na expressão de TLRs. Foi demonstrado que a presença de poliaminas pode funcionar como um regulador biológico da expressão de TLR2, sendo essencial para estimular e modular a expressão destes receptores em células epiteliais intestinais podendo ter função na regulação da barreira epitelial. Este efeito foi específico, uma vez que a depleção de poliamina reduziu o nível de RNAm e proteína de TLR2 e minimizou ativação induzida por LPS (CHEN, J. et al., 2007).

Outra evidência da participação de poliaminas na imunidade inata é o fato de LPS sistêmico aumentar ODC em micróglia favorecendo a transcrição de genes para citocina e TLR2 (SOULET; RIVEST, 2003). Isto comprova a importância das poliaminas no controle da resposta inata e abre perspectivas para o estudo do papel imunomodulador da Migalina (acilpoliamina sintética), como imunomodulador da resposta imune inata.

1.4 Migalina

A alta resistência das bactérias aos antibióticos convencionais vem se tornando grave ameaça à saúde pública, visto que o desenvolvimento de novas drogas

mostrou-se insuficiente para promover uma cobertura terapêutica satisfatória nos últimos 20 anos (KUMARASAMY et al., 2010; TRAVIS, 1994).

Compostos endógenos de origem animal têm se mostrado potenciais para o desenvolvimento de fármacos como alternativa para conter a disseminação destes patógenos, seja no combate direto ao microrganismo (HEBY; PERSSON; RENTALA, 2007) ou na modulação do sistema imune do hospedeiro a fim de potencializá-lo no combate a infecções (FINLAY; HANCOCK, 2004; JENSSEN; HANCOCK, 2010).

Peptídeos e poliaminas são compostos endógenos capazes de influenciar a imunidade inata (CHEN, J. et al., 2007; CORDEIRO-DA-SILVA et al., 2004; JENSSEN; HANCOCK, 2010), e as aranhas possuem uma grande diversidade destes compostos (ESTRADA; VILLEGAS; CORZO, 2007).

As acilpoliaminas presentes nas aranhas têm como alvo principal receptores de células de insetos. Contudo, devido à similaridade entre os receptores de vertebrados e invertebrados para estas moléculas as acilpoliaminas de aranhas têm apresentado amplo potencial terapêutico em células de mamíferos (ESTRADA; VILLEGAS; CORZO, 2007).

Recentemente, foi isolada e caracterizada uma acilpoliamina de baixo peso molecular (417 Da) com capacidade antimicrobiana (PEREIRA et al., 2007). Esta acilpoliamina, denominada Migalina, atualmente vem sendo sintetizada no laboratório de toxilogia do Instituto Butantan e estudos sobre a potencial função deste composto estão sendo realizados.

A Migalina foi assim classificada por ter sido isolada da hemolinfa da aranha *Acanthoscurria gomesiana* a qual pertencente à subordem Mygalomorphae. A sua estrutura foi elucidada através de espectrometria de massa em tandem (MS/MS) e por duas técnicas de espectroscopia, ressonância nuclear magnética e (NMR) e ultravioleta (UV). A Migalina foi identificada como uma bis-acilpoliamina N1, N8-bis (2,5-dihydroxybenzoyl) espermidina, na qual o amino grupo primário da espermidina está acilado com o grupo carboxil do ácido 2,5 dihidroxibenzoico (Figura 5) (PEREIRA et al., 2007).

Figura 4 - Estrutura molecular da Migalina.
Fonte: (PEREIRA et al., 2007).

Foi investigada a ação antifúngica e antimicrobiana da Migalina contra três microrganismos, o fungo *C. albicans* e as bactérias *M. luteus* (gram-positiva) e *E. coli* (gram-negativa). No entanto, esta molécula foi ativa apenas contra a última, sendo a concentração mínima inibitória (MIC) definida como a menor concentração capaz de gerar 100% de inibição do crescimento de *E. coli* igual a 85 μM (35,5 $\mu\text{g/mL}$) de Migalina (PEREIRA et al., 2007).

Nas aranhas, após o rompimento da barreira físico química representada pelo exoesqueleto, um dos mais importantes componentes da defesa imunológica é composto pelos hemócitos que desencadeiam uma série de processos, dentre eles, a produção de moléculas efetoras (NAPPI; OTTAVIANI, 2000). Sendo a Migalina isolada de hemócitos da aranha *A. gomesiana* (PEREIRA et al., 2007) e o fato das acilpoliaminas de aranhas apresentarem potencial ação terapêutica sobre células de mamíferos (ESTRADA; VILLEGAS; CORZO, 2007), ficamos motivados a avaliar se esta molécula possui atividade imunomoduladora e sendo assim, nosso grupo de pesquisa tem demonstrado o potencial da Migalina em estimular esplenócitos e macrófagos através da indução de mediadores imunes sintetizados por essas células (MAFRA et al., 2012).

1.5 Macrófagos e receptores do tipo Toll

Nos vertebrados os mecanismos de resposta imune se dividem basicamente em inata e adquirida (TAKEDA; AKIRA, 2005). O sistema imune inato é composto por uma gama de moléculas e células, dentre estas, neutrófilos, células dendríticas e macrófagos que possuem função fagocítica e alto poder microbicida, além de eosinófilos, basófilos e outras (MOSSER; EDWARD, 2008).

Os macrófagos são células fundamentais na geração do processo inflamatório além de orientar a resposta imune adaptativa que será gerada posteriormente. Estas células são oriundas da medula óssea, surgem inicialmente como monoblastos, pro-monócitos e monócitos, que são liberados na corrente sanguínea e migram para sítios extravasculares. Durante este processo, ocorrem várias alterações fenotípicas e bioquímicas, como desenvolvimento do sistema lisossomal, aumento do conteúdo enzimático, mitocondrial, metabólico e consecutivamente o tamanho celular culminando com a formação de macrófagos residentes ou inflamatórios que posteriormente se estabelecem em diferentes tecidos, assumindo características fenotípicas específicas do tecido para onde migrou conforme pode ser visto na Figura 5 (GORDON; TAYLOR, 2005; MOSSER; EDWARD, 2008).

Dependendo do microambiente onde se localizam, os macrófagos podem sofrer distintos processos de ativação, resultando em populações capazes de desencadear diferentes respostas imunes (EDWARDS et al., 2006). Estudos indicam que diferentes estímulos podem mudar o fenótipo de uma determinada população (STOUT et al., 2005), fato que justifica sua plasticidade frente a distintos sinais ambientais (GEA-SORLÍ; CLOSA, 2010; MYLONAS et al., 2009).

Figura 5 - Processo de maturação de macrófagos.

Na medula óssea, a partir de uma célula tronco hematopoietica comum (HSC), ocorrem várias etapas de diferenciação em resposta ao fator estimulador de colônias de macrófago, divisão e diferenciação em monoblastos, pro-monócitos e monócitos, estes saem da medula óssea e entram na corrente sanguínea. Em camundongos há evidências de duas populações de monócitos distintas. GR1⁺ monócito inflamatório e GR1⁻ monócito residente. Os monócitos migram para diferentes tecidos formando macrófagos específicos. CNS, sistema nervoso central. GM-CFU, granulócito/ Unidade formadora de colônia de macrófago. M-CFU, Unidade formadora de colônia de macrófago.

Fonte: (MOSSER; EDWARD, 2008).

Os macrófagos atuam em processos de homeostase e de atividade imune no organismo (MARTINEZ; HELMING; GORDON, 2009). Quando ativados durante o processo inflamatório são capazes de fagocitar, apresentar antígenos, produzir citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento (FUJIWARA; KOBAYASHI, 2005). Portanto, seu grau de ativação pode determinar a natureza e o nível do processo inflamatório, culminando na resposta imune induzida posteriormente (GEA-SORLÍ; CLOSA, 2010).

Os macrófagos foram classificados em dois grandes grupos, os clássicos (M1) e os denominados macrófagos alternativamente ativados (M2). A população M1 produz citocinas pró-inflamatórias e atuam no controle de infecções. A população M2 foi recentemente dividida em duas subpopulação, a alternativa e a regulatória. A regulatória é composta por células produtoras de citocinas de perfil anti-inflamatório, capaz de mitigar possíveis ações deletérias contra o próprio organismo a respostas imunes exacerbadas. A população alternativa são células com ação direta na remodelação tecidual. O nível de ativação destas células é altamente regulado para evitar o aumento exagerado de condição que possam culminar em doenças autoimunes, reduzida capacidade de defesa do organismo a agentes infecciosos ou deficiência na capacidade de reparo a danos teciduais (FLEMING; MOSSER, 2011).

Em macrófagos murinos, o M-CSF promove diferenciação para o fenótipo M1 (clássico) e o GM-CSF promove diferenciação para o fenótipo M2 (WEISSER et al., 2013). Estudos comparativos entre essas subpopulações mostraram que os macrófagos clássicos são eficientes produtores de interleucina 12 (IL-12) e os regulatórios de IL-10. Ambos são competentes células apresentadoras de antígenos e expressão altos níveis da molécula coestimulatória CD86, diferente dos macrófagos alternativos (EDWARDS et al., 2006). Uma característica deste último é a indução de arginase, que converte arginina em poliamina e hidroxiprolina, contribuindo para a produção da matriz extracelular (FLEMING; MOSSER, 2011).

Os macrófagos, assim como outras células efetoras do sistema imune inato são geneticamente programados para detectar padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) que são moléculas exógenas evolutivamente conservadas entre diversos microrganismos, as quais são reconhecidas através de receptores de reconhecimento padrão (PRRs) presentes em vários tipos celulares. Este reconhecimento é de fundamental importância para o início da resposta imune inata (IWASAKI; MEDZHITOV, 2010).

Além dos PAMPs, existem outras formas de sinalizar possíveis ações deletérias ao organismo. As alarminas são equivalentes aos PAMPs, mas são moléculas de natureza endógena capazes de recrutar e ativar células do sistema imune inato e consecutivamente ativar de forma direta ou indireta a resposta imune adaptativa, além de restaurar a homeostase por promover a reconstrução de tecidos lesionados. Sendo assim, as alarminas e os PAMPs constituem uma grande família de Padrões Moleculares Associados a Danos (DAMPs) (BIANCHI, 2007).

O sistema de reconhecimento pode ocorrer de múltiplas formas, sendo uma delas através dos TLRs. O genoma humano codifica pelo menos onze TLRs (LIN et al., 2011) onde cada um reconhece determinado PAMP presente no microrganismo, por exemplo, peptidoglicanos da parede celular bacteriana são reconhecidos pelo TLR2, flagelina pelo TLR5 e sequências CpG não metiladas de DNA bacteriano pelo TLR9 (AKIRA; UEMATSU; TAKEUCHI, 2006; OSHIUMI et al., 2008), além de outras moléculas por seus respectivos receptores. Tal como os PAMPs, a literatura também descreve o acionamento dos TLRs através de sinalização por alarmina (PARK et al., 2004).

Um dos PAMPs mais bem estudados é o LPS que está presente na superfície de bactérias gram-negativas, cujo reconhecimento se dá através do TLR4. Este reconhecimento é de fundamental importância na resposta inflamatória local e sistêmica, uma vez que desencadeia uma cascata de sinalizações intracelulares que resulta na ativação de diversas vias e reguladores transcricionais capazes de induzir inflamação, reparo tecidual e ativação da resposta imune adaptativa (Figura 6) (BLASIUS; BEUTLER, 2010; IWASAKI; MEDZHITOV, 2004).

Figura 6 - Respostas ao reconhecimento de PAMPs pelos TLRs.
 Fonte: Modificado de Iwasaki e Medzhitov (2010).

Os TLR são expressos em células imunes e não imunes, sua expressão é regulada rapidamente em resposta a patógenos, citocinas e a estímulos de estresse (AKIRA; UEMATSU; TAKEUCHI, 2006), são moléculas transmembranas que contém um domínio externo à membrana, ricos em sequências de leucina (LRR), e uma ou duas regiões ricas em cisteína, específica para cada TLR. O reconhecimento de componentes microbianos pelos TLRs inicia a via de transdução de sinais através de um domínio intracelular designado região homologa de receptores Toll/IL-1 (TIR) (CRACK; BRAY, 2007). No compartimento citoplasmático, o domínio TIR dos TLR recrutam proteínas adaptadoras específicas, tais como: fator de diferenciação mielóide 88 (MyD88), proteína associada a TIR (TIRAP), adaptador indutor de interferon- β que contém o domínio TIR (TRIF) e molécula adaptadora relacionada a TRIF (TRAM) (AKIRA; TAKEDA, 2004; UNDERHILL, 2007). Os diferentes estímulos a serem reconhecidos pelos TLR induziram seletivos recrutamentos destas proteínas adaptadores, culminando em uma resposta específica da célula hospedeira (AKIRA; TAKEDA, 2004; CHEN, K. et al., 2007).

Após estímulo do ligante, ocorre dimerização dos TLR induzindo a transdução de sinal que envolve uma ou mais moléculas adaptadoras, incluindo quinase associada a receptor IL-1 (IRAK)-1, IRAK-4, fator associado ao receptor de TNF (TRAF)-6, quinase ligada a TANK (TBK)-1, proteína quinase ativada por mitógeno

(MAPK) e o complexo IKB quinase (Ikk) levando a ativação do fator de transcrição nuclear kappa B (NF- κ B) ou fator regulatório de interferon (IRF)-3 ou a proteína ativadora (AP)-1 (CHEN, K. et al., 2007; KAWAI; AKIRA, 2007) (Figura 7).

As vias de sinalização dos TLR apresentam uma via dependente de MyD88, comum a todos os TLR, exceto ao TLR3 envolvida na ativação de NF- κ B. O TIRAP é requerido especificamente em resposta a ativação de TLR2 e TLR4 e parece regular a transcrição de NF- κ B, e este a expressão de genes que codificam proteínas de perfil pró-inflamatório (FITZGERALD, 2001; TAKEDA; AKIRA, 2004).

Em contraste, a via de sinalização independente de MyD88 é seletiva apenas ao TLR3 e TLR4 (KAWAI; AKIRA, 2007), o qual desencadeia uma cascata de sinalização ativando IRF-3 levando a expressão de interferon beta IFN- β . TRIF é essencial para esta via, pois ativa IRF-3 via TBK-1 e IKK ϵ , levando a indução de IFN- β . O TRIF está associado diretamente ao TLR3, mas indiretamente ao TLR4, dependendo da intermediação de TRAM para desencadear a cascata de sinalização (AKIRA; UEMATSU; TAKEUCHI, 2006; O'NEILL, 2006). A ativação dos fatores de transcrição resulta na produção de citocinas pró-inflamatórias dependentes de NF- κ B e IFN- β dependente de IRF-3 (CHEN, K. et al., 2007; KAWAI; AKIRA, 2007). A ativação desses mecanismos pode auxiliar na resposta inflamatória, eliminação do agente infeccioso e reparo tecidual (IWASAKI; MEDZHITOV, 2010).

regular a imunidade adaptativa a ser desenvolvida posteriormente (RAMIREZ et al., 2005).

O TNF- α pode desencadear ação local ou sistêmica, sobre neutrófilos é capaz de aumentar a produção do ânion superóxido, do peróxido de hidrogênio, da atividade fagocítica e citotoxicidade, além de estimular a degranulação e a aderência dessas células ao endotélio (CAMPEBELL et al., 2007).

A Interleucina 12 é produzida principalmente por fagócitos, como macrófagos, células dendríticas e neutrófilos. Esta citocina é um heterodímero composto de duas subunidade denominada p40 e p35 sendo a secreção de IL-12 p40 superior a de IL-12 p70 (WYSOCKA et al., 1995). A regulação positiva desta citocina ocorre devido a presença de produtos derivados de microrganismos e citocinas como IFN- γ (YUN et al., 2002) e TNF- α (FLESCH et al., 1995) enquanto a presença do fator transformador de crescimento (TGF)- β e IL-10 dentre outras citocinas, regulam negativamente a produção de IL12 (D'ANDREA et al., 1995). Sua principal função é integrar imunidade inata (ativando células NK) e a adaptativa, pois regula a ativação de células T “naive” durante a diferenciação das subpopulações de linfócitos (PARK; SCOTT, 2001).

O aumento da produção de IL-12 favorece o aumento de IFN- γ que potencializa a ação microbida dos macrófagos através da produção de EROs e ERNs, como por exemplo, o óxido nítrico (NO) (SCHINDLER et al., 2001).

O TNF- α e a IL-12 são os dois principais mediadores pró-inflamatórios derivados de macrófagos que contribui para a resposta inflamatória desencadeada em mamíferos, além de exercerem funções proeminentes na ligação entre a resposta imune inata e adquirida (XIAOJING, 2001).

O NO é outra molécula de fundamental importância sintetizada por macrófagos na resposta imune inata frente à citocinas inflamatórias e a produtos bacterianos, desempenhando ação antitumorica e antibacteriana *in vitro* e *in vivo* (TRIPATHI et al., 2007).

Várias outras citocinas são produzidas após a ativação de macrófagos que corroboram para o processo inflamatório, podendo potencializar a destruição de microrganismos e a definição da imunidade adaptativa. A IL-6 é capaz de recrutar e ativar neutrófilos, além de induzir a produção de proteínas de fase aguda importantes para o controle da inflamação (FORTE, 2007). IL-1 β , juntamente com o TNF- α induzem a expressão de moléculas de adesão (CHEN et al., 2003; TOSI,

2005), enquanto a IL-10, de caráter anti-inflamatório, inibi a síntese de IL-12 (ZHOU; NAZARIAN; SMALE, 2004) e ativação de linfócitos T (RAMIREZ et al., 2005). O equilíbrio entre mediadores pró e antiinflamatórios é essencial para o organismo, onde os mediadores pró-inflamatórios atuam no combate ao patógeno enquanto os anti-inflamatórios controlam possíveis reações deletérias ao próprio organismo hospedeiro (GRÜTZ, 2005).

Considerando o potencial imunomodular das poliaminas e seus análogos (HASKO et al., 2000; HEBY; PERSSON; RENTALA, 2007; ZHANG et al., 1999) e o caráter microbicida da Migalina (PEREIRA et al., 2007), resolvemos verificar se este composto é capaz de modular a resposta imune inata através da ativação de macrófagos.

2 OBJETIVOS

Investigar *in vitro* o potencial imunomodulador da Migalina (acilpoliamina) sobre macrófagos, analisando seu efeito direto e induzido por LPS e a contribuição dos TLR na ativação destas células.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção da Migalina

A Migalina purificada foi gentilmente cedida pelo Dr. Pedro Ismael da Silva Junior do Laboratório Especial de Toxinologia Aplicada do Instituto Butantan. Esta molécula foi sintetizada de acordo com o método clássico da química de peptídeos (ATHERTON; SHEPPARD, 1989). Brevemente, a síntese foi realizada em solução utilizado HBTU (KNORR et al., 1989) para a esterificação do grupo carboxílico do ácido gentísico possibilitando assim a formação de uma carboxamida pela condensação formal de dois grupos amino primários da espermidina com os grupos carboxílicos de duas moléculas de ácido gentísico (ácido 2,5-dihydroxybenzoico) (SILVA; MELO, 2010).

O composto foi purificado, filtrado, aliquotado, protegido da luz e mantido congelado a -20 °C até a utilização nos experimentos.

3.2 Cultura de células

3.2.1 Cultivo de células L929 para a obtenção do fator de crescimento (M-CSF) para diferenciação dos macrófagos derivados de medula óssea murina (M ϕ DM)

A linhagem de células L929 são fibroblastos imortalizados originados de camundongo *Mus musculus*, possuindo a capacidade de secretar fator estimulador de colônias de macrófagos (M-CSF) em seu sobrenadante. Assim, o sobrenadante destas células foi utilizado como fonte de M-CSF para diferenciar macrófagos derivados da medula óssea murina de camundongos C57BL/6 (GERSUK; HIRAOKA; MARR, 2004). Para obtenção do sobrenadante as células (1×10^5 /mL) foram cultivadas em meio RPMI 1640 (Gibco Invitrogen Corporation, São Paulo, S.P., Brasil) contendo 10% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco Invitrogen Corporation, São Paulo, S.P., Brasil) e gentamicina (30 μ g/mL) por sete dias a 37 °C e 5% de CO₂. Após este período o sobrenadante contendo M-CSF foi centrifugado por 10 minutos a 185 x g, para separar possível contaminação celular, filtrado e conservado a -20 °C até o momento do uso para diferenciar as células obtidas da medula óssea.

3.2.2 Isolamento e diferenciação dos macrófagos

Foram utilizados camundongos isogênicos do tipo selvagem C57BL/6 e mutantes deficientes na molécula $MyD88^{-/-}$, com 6-8 semanas de idade, obtidos do biotério da Faculdade de Veterinária ou da Faculdade de Medicina da USP. Os camundongos foram sacrificados através da exposição ao CO_2 . A seguir foram extraídos o fêmur e a tíbia para obtenção das células medulares que deram origem aos macrófagos utilizados. Todos os procedimentos estão de acordo com os parâmetros estabelecidos pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan (CEUAIB).

As células obtidas foram centrifugadas por 10 minutos a $185 \times g$, o sobrenadante foi desprezado e sobre o sedimento foi adicionado o tampão ACK (NH_4Cl 0,15; $KHCO_3$ 1 mM e Na_2EDTA 0,1 mM) para lisar as hemácias. A suspensão celular foi mantida em temperatura ambiente por cinco minutos, sendo então as células lavadas com PBS pH 7.2. Finalmente as células obtidas foram diluídas na concentração adequada ($1,5 \times 10^6/ml$) em meio RPMI 1640 (Gibco Invitrogen Corporation) suplementado com 10% de SFB (Gibco Invitrogen Corporation), 0,2 mM de L-glutamina, 50 UI/mL de penicilina e 50 $\mu g/mL$ de estreptomicina, 1 mM de piruvato de sódio, 1 mM de aminoácidos não essenciais e 20% do sobrenadante de células L929 (v/v) (GERSUK; HIRAOKA; MARR, 2004). Em seguida foi plaqueado $7,5 \times 10^5$ células/poço em placas de 24 poços (Costar, Cambridge, M.A., U.S.A.). A cada 3 dias as culturas foram suplementadas com meio novo. No sétimo dia as células já diferenciadas, foram lavadas com PBS pH 7.2 para a remoção das células não aderentes e as aderentes foram mantidas em meio RPMI suplementado com 10% SFB e 50 UI/mL de penicilina e 50 $\mu g/mL$ de estreptomicina (RPMI completo), sendo então utilizadas nos ensaios. Inicialmente foi confirmados o fenótipo das células diferenciadas usando Citometria de Fluxo, sendo a população marcada com os anticorpos monoclonais específicos para macrófagos (anti-F4/80), linfócitos T (anticorpos anti-CD3) e linfócitos B (anti-B220) (Invitrogen, Carlsband, C.A., U.S.A.). A análise do fenótipo das células foi 97% positivas para F4/80+ sendo negativas para as outras marcações (dados não mostrados).

3.2.3 Ativação dos macrófagos

No sétimo dia de cultivo as células aderentes ($7,5 \times 10^5$ células/poço) foram ativadas com 5, 10, 20 e ocasionalmente com 40 $\mu\text{g/mL}$ de Migalina. Nos ensaios para quantificação de NO_2 algumas culturas foram tratadas com L-NIL (1 mM), inibidor específico de iNOS, antes da ativação com Migalina. Em outro grupo de ensaios as células foram pré-tratadas ou não com a Migalina por 1 h antes da adição do LPS (100 ng/mL). Após 20 h de estímulo com Migalina o sobrenadante das culturas foi colhido para a dosagem de $\text{TNF-}\alpha$ e IL-12p40 e 72 h para dosagem de nitrito (NO_2^-). Para o controle positivo de produtos de citocinas as células foram estimuladas com LPS de *E. coli* (100 ng/mL).

3.2.4 Ensaio de viabilidade celular

A viabilidade dos macrófagos após o tratamento com a Migalina (5, 10, 20 e 40 $\mu\text{g/mL}$) foi analisada pelo ensaio com MTT (brometo de 3-(4,5)-dimetiltiliazolil-2,5 difeniltetrazólio) (Sigma, St. Louis, M.O., U.S.A.) que determina a atividade da succinil desidrogenase, uma enzima mitocondrial presente somente em células vivas. As células vivas convertem o MTT em um cristal roxo insolúvel denominado formazan. Após solubilização a reação colorimétrica foi lida para determinação da densidade óptica (DO). Quanto maior a densidade óptica, mais intensa a coloração e maior a viabilidade celular (MOSMANN, 1983). Após obtenção do sobrenadante para dosagem de citocinas foi adicionado meio RPMI completo e o correspondente a 10% deste volume de MTT (5 mg/mL) às culturas. Em seguida as placas foram incubadas por 4 h a 37 °C e posteriormente os cristais de formazan foram solubilizados com solução HCl 0,1N em álcool isopropílico (v/v) e mantidas sob agitação por 15 minutos protegido da luz. Posteriormente foi lida a absorbância a 550 nm usando o leitor de ELISA (Multiskan EX, Primary EIA). A viabilidade celular foi analisada comparando-se a densidade óptica das culturas tratadas com Migalina e as células que não receberam tratamento. O grupo controle representando 100% de mortalidade consistiu de células tratadas com 0,1% de Triton X-100. As culturas de macrófagos não tratadas, foram consideradas 100% viáveis.

3.2.5 Efeito do tratamento com Polimixina B

A Polimixina B (PLMX B) é um lipopeptídeo cíclico catiônico que se liga ao lipídio A da molécula de LPS bloqueando seu efeito biológico (SANDRI et al., 2008). Para determinar o possível envolvimento do TLR4 ou a presença de endotoxina (LPS) na atividade imune analisada, realizamos alguns ensaios, pré incubando 20 µg/mL de Migalina com PLMX B (30 µg/mL) por 45 minutos com posterior ativação dos macrófagos. Após 20 h o sobrenadante foi colhido para análise de TNF- α . Os valores obtidos foram comparados com os das culturas ativadas na ausência de PLMX B. Como controle as células foram tratadas com 100 ng/mL de LPS de *E. coli* pré-incubado ou não com PLMX B.

3.3 Dosagem de NO

A produção de NO foi quantificada utilizando o método de Griess (DING; NATHAN; STUEHR, 1988) que avalia no sobrenadante das culturas de macrófagos a presença de NO₂⁻, sendo este um produto intermediário da reação (CHOI et al., 2007). Neste ensaio 50 µl do sobrenadante e 50 µl da solução de Sulfanilamida a 1% foi adicionado à placa de 96 poços e incubado por 10 minutos a temperatura ambiente protegido da luz. Em seguida foi adicionado 50 µl da solução de NED (α -naftiletilenodiamina) a 0,1% e posterior incubação na mesma condição anterior. A absorbância foi quantificada a 550 nm usando leitor de microplacas (Multiskan EX, Primary EIA). A concentração de NO₂⁻ nas amostras foi baseada na curva padrão de nitrito de sódio (NaNO₂) construída entre 1-100µM. Em alguns ensaios foi determinado a contribuição da enzima iNOS na síntese de NO. Para isto, as culturas de macrófagos foram pré-tratadas com inibidor específico de iNOS (L-NIL) à 1 mM por 30 minutos antes da ativação das células com diferentes concentrações de Migalina.

3.4 Ensaio de Elisa para dosagem de citocinas

Para quantificar a presença de TNF- α e IL-12p40 foi usado o ensaio imunoenzimático de ELISA e os kits da (BD PharMingen, Franklin Lakes, N.J., U.S.A.) e (eBioscience, San Diego, C.A., U.S.A.) respectivamente, seguindo

orientações do fabricante. Brevemente, as placas foram sensibilizadas com anticorpo de captura em tampão de sensibilização na diluição 1:250 com incubação por 18 h / 4 °C (overnight). Posteriormente as placas foram lavadas com PBS 0,05% Tween-20 e bloqueadas por 1 h com o tampão de bloqueio. Em seguida as placas foram lavadas e os recombinantes padrões e amostras foram adicionados. A reação foi novamente incubada 18 h / 4 °C (overnight). Em seguida foi adicionado o anticorpo de detecção, diluído 1:250 em tampão apropriado e as placas novamente incubadas por 1 h a temperatura ambiente. Após lavagem, foi adicionado avidina marcada com peroxidase com posterior incubação por 30 minutos a temperatura ambiente. Após lavagem foi adicionado o substrato TMB e a reação interrompida com H₂SO₄ (2 N). A reação foi lida a 450 nm em leitor de microplacas (Multiskan EX, Primary EIA). A quantidade de citocina presente nas amostras foi calculada baseado nas curvas padrões dos respectivos recombinantes utilizados.

3.5 Análise estatística

Os resultados representam à média e o erro padrão da média ($\pm$ SEM) de no mínimo três experimentos independentes analisados pelo programa GraphPad Prism 5® (Graph Pad, San Diego, C.A., U.S.A.). As análises estatísticas foram realizadas usando o teste *t* Student ou one-way ANOVA e a diferença entre grupos determinada pelo teste Tukey-Kramer para múltiplas comparações. As diferenças foram consideradas significativas quando o $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Análise da viabilidade dos macrófagos derivados da medula óssea murina (M ϕ DM) de camundongos C57BL/6 após estímulo com Migalina

Antes do início dos experimentos foi confirmado por FACS, o fenótipo das células aderentes utilizadas. Observou-se que 97% das células diferenciadas possuíam fenótipo F40/80+, CD3⁻ e B220⁻ tratando-se de uma população exclusiva de M ϕ DM (dados não mostrados).

Inicialmente foi avaliado se o tratamento com Migalina teria efeito citotóxico sobre as culturas de M ϕ DM. Para determinar a viabilidade celular utilizamos o ensaio colorimétrico por MTT, onde as células coram-se intensamente devido à precipitação de cristais de formazan em decorrência da atividade da enzima desidrogenase mitocondrial, presente apenas em células viáveis. Células com baixa atividade desta enzima são consideradas mortas sendo baixa a densidade óptica (MOSMANN, 1983).

Utilizamos concentrações entre 5 a 40 μ g/mL de Migalina o que corresponde à faixa de 11,99 a 95,92 μ M. Como controle de morte celular foi utilizado 0,1% de Triton X 100 capaz de gerar 100% de citotoxicidade.

A Figura 8 mostra que os grupos tratados ou não com Migalina, independente da concentração utilizada, apresentaram absorbância superior a 1,0 havendo homogeneidade entre os grupos, sugerindo que a Migalina não induziu citotoxicidade e as células de todos os grupos utilizados estavam viáveis. Células tratadas com Triton X 100 apresentaram absorbância próxima de zero sendo consideradas 100% mortas.

Figura 8 - Efeito da Migalina sobre a viabilidade de MφDM de camundongos C57BL/6.

MφDM ($7,5 \times 10^5$ células/poço) foram estimulados por 20 h com diversas concentrações de Migalina (5, 10, 20 e 40 µg/mL). A viabilidade celular foi determinada pelo ensaio de MTT. Para controle de citotoxicidade foi usado 0,1% de Triton X-100. Dados representam a média $\pm$ SEM de três experimentos independentes, realizados em duplicata. Os dados foram analisados pelo teste *t* de Student.

4.2 Ação da Migalina sobre a produção de NO_2^- por MφDM de camundongos C57BL/6

4.2.1 Produção de NO_2^-

A Figura 9 mostra a ação da Migalina sobre a produção de NO_2^- em cultura de MφDM após 72 h de estímulo. Observamos que houve aumento significativo da produção de NO_2^- em todas as concentrações utilizadas. O aumento foi dose dependente, variando em média entre 15 – 60 µM, o que correspondeu respectivamente de 150 a 566% de aumento em relação às células não estimuladas.

Figura 9 - Síntese de NO_2^- por MφDM de camundongos C57BL/6 ativados com Migalina. MφDM ($7,5 \times 10^5$ células/poço) foram estimulados com diversas concentrações de Migalina (5, 10, 20 e 40 µg/mL). Após 72 h o sobrenadante foi coletado para dosagem de NO_2^- pelo método de Griess. Dados representam a média $\pm$ SEM de três experimentos independentes, realizados em duplicata. Os dados foram analisados pelo teste *t* de Student. Estatísticas confrontaram os grupos estimulados com o não estimulado * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

4.2.2 Efeito do tratamento das culturas de macrófagos com inibidor específico de iNOS (L-NIL) antes do estímulo com Migalina

Para confirmar que a produção de NO neste sistema foi gerada pela ativação da enzima iNOS e devido a ação direta da Migalina sobre os macrófagos, pré-incubamos as culturas de macrófagos com 1 mM do inibidor específico da iNOS (L-NIL) e em seguida estimulamos as células com diversas concentrações de Migalina.

A Figura 10 mostra a comparação entre as culturas inibidas ou não por L-NIL. Observamos que houve redução de 100% da produção de NO_2^- em todas as concentrações de Migalina testadas na presença do inibidor. Estes dados sugerem que a Migalina pode ativar diretamente iNOS com consequente produção de NO_2^- .

Figura 10 - Efeito do tratamento das culturas de macrófagos com inibidor específico da iNOS (L-NIL) antes do estímulo com Migalina. MφDM ($7,5 \times 10^5$ células/poço) foram pré-tratados com L-NIL (1 mM) por 30 minutos e então estimulados com diversas concentrações de Migalina (0, 5, 10, 20 e 40 µg/mL). Após 72 h o sobrenadante foi coletado para dosagem de NO_2^- pelo método de Griess. Dados representam a média $\pm$ SEM de três experimentos independentes, realizados em duplicata.

4.3 Efeitos da Migalina sobre a capacidade de ativar macrófagos a produzir citocinas

4.3.1 Produção de $\text{TNF-}\alpha$

A Figura 11 mostra a produção de $\text{TNF-}\alpha$ induzida por diferentes concentrações de Migalina (5, 10 e 20 µg/mL). Observamos que a síntese desta citocina apresentou um perfil dose resposta, havendo diferenças estatisticamente significativas quando se comparou os grupos estimulados ou não. A concentração média de $\text{TNF-}\alpha$ no grupo basal foi 106,5 pg/mL enquanto nos grupos estimulados com Migalina variou entre 180,8 a 244,8 pg/mL correspondendo a um aumento de respectivamente 69% a 129% em relação às células não estimuladas.

Figura 11 - Produção de TNF- α por M ϕ DM estimulados com Migalina

M ϕ DM ($7,5 \times 10^5$ células/ poço) foram estimulados por 20 h com 5, 10 e 20 μ g/mL de Migalina. A síntese de TNF- α foi analisada no sobrenadante das culturas usando ensaio de ELISA. Dados representam a média $\pm$ SEM de três experimentos independentes, realizados em duplicata. Os dados foram analisados pelo one-way ANOVA e a diferença entre grupos determinada pelo teste Tukey-Kramer para múltiplas comparações * $p < 0,05$ e *** $p < 0,0001$. LPS representa o controle positivo.

4.3.2 Produção de IL-12p40

A presença de TNF- α após a ativação dos macrófagos com a Migalina motivou-nos a pesquisar a síntese de IL-12 no sobrenadante das culturas. Sabendo que a presença das subunidades p40 e p70 têm sido correlacionadas (GOODRIDGE et al., 2003), decidimos avaliar a subunidade p40 devido a maior facilidade de detecção (WYSOCKA et al., 1995). Nossos dados mostraram que a adição da Migalina (5, 10 e 20 μ g/mL) às culturas de M ϕ DM não estimulou produção de IL-12p40 (Figura 12), não havendo diferenças estatísticas significativas entre os grupos estimulados ou não com Migalina. O estímulo dos macrófagos com 10 μ g/mL de Migalina produziu em média 149,7 pg/mL de IL-12p40, enquanto o grupo não estimulado produziu 103 pg/mL.

Figura 12 – Análise da produção de IL-12p40 em resposta ao estímulo com Migalina a MφDM.

MφDM ($7,5 \times 10^5$ células/ poço) foram estimulados por 20 h com 5, 10 e 20 µg/mL de Migalina. A síntese de IL-12p40 foi analisada no sobrenadante das culturas pelo ensaio de ELISA. Dados representam a média $\pm$ SEM de quatro experimentos independentes, realizados em duplicata. Os dados foram analisados pelo one-way ANOVA e a diferença entre grupos determinada pelo teste Tukey-Kramer para múltiplas comparações, as diferenças foram consideradas significativas quando o $p < 0,05$. LPS (100 ng/ml) representa o controle positivo. *** $p < 0,0001$.

4.3.3 Produção de IL-1 β

Outra citocina produzida por macrófagos que participa da imunidade inata é a IL-1 β . Investigamos também a capacidade da Migalina estimular a produção de IL-1 β . Observamos que não houve síntese desta citocina com nenhuma das concentrações de Migalina utilizadas. Os valores obtidos foram inferiores ao limite de detecção da curva padrão que foi de 7 pg/mL. Culturas de macrófagos ativadas com LPS de *E. coli* (1 – 5 µg/mL) produziram este mediador sugerindo que não houve problemas com a reação (dados não mostrados).

4.4 Efeito da Migalina sobre a ativação de macrófagos induzida por LPS

O Lipopolissacarídeo é o principal componente estrutural da membrana externa de bactérias Gram-negativas. Por ser um PAMP é um potente ativador da imunidade inata, sendo reconhecido pelo TLR 4. Este reconhecimento desencadeia

uma cascata de sinais que levam a resposta inflamatória local e a produção de vários mediadores imunes como citocinas, quimiocinas, peptídeos vasoativos e espécies reativas do oxigênio e nitrogênio (TAKEDA; AKIRA, 2005). Esses mediadores imunes controlam a disseminação dos patógenos. No entanto, excessiva produção de citocinas em resposta ao LPS pode causar shock séptico, enquanto baixas concentrações podem ativar vias de sinais moleculares que potenciam a resposta imune inata e controlam a imunidade adaptativa (AKIRA; TAKEDA; KAISHO, 2001; COHEN, 2002). Esta ativação se dá principalmente por vias que envolvem a participação de quatro componentes: Proteína ligadora de lipopolissacarídeo (LBP), CD14, proteína de diferenciação mielóide 2 (MD2) e TLR-4. Uma vez que a ativação das células apresentadoras de antígenos por TLR gera inflamação e também controla a resposta imune adaptativa (AKIRA; UEMATSU; TAKEUCHI, 2006) decidimos avaliar o efeito da Migalina sobre a ativação induzida por baixa concentração de LPS (100 ng/ml). Investigamos a síntese de duas citocinas, TNF- α e IL-12p40, que podem ser moduladas pela ativação via TLR-4 por LPS.

4.4.1 Produção de TNF- α

A Figura 13 mostra que a adição de Migalina nas concentrações de 10 e 20 μ g/ml sobre as culturas de macrófagos ativados com LPS reduziu a produção de TNF- α de modo significativo. O efeito mais pronunciado ocorreu quando usamos 20 μ g/mL. Observamos uma redução de 35% quando comparamos o grupo controle, apenas estimulado com 100 ng/mL de LPS, que produziu em média 790 pg/mL, enquanto o grupo onde associamos 20 μ g/mL de Migalina ao LPS produziu em média entre 716 – 516 pg/mL, sendo a redução dose dependente.

Figura 13 - Efeito da adição de Migalina na produção de TNF- α induzido pela ativação de M ϕ DM por LPS.

M ϕ DM ($7,5 \times 10^5$ células/ poço) foram estimulados por 20 h com 5, 10 e 20 μ g/mL de Migalina associados ao LPS (100 ng/mL). A síntese de TNF- α foi analisada no sobrenadante das culturas pelo ensaio de ELISA. Dados representam a média $\pm$ SEM de três experimentos independentes, realizados em duplicata. As diferenças estatísticas representam a comparação entre o grupo tratado apenas com LPS versus o obtido com LPS associado às diferentes concentrações de Migalina, sendo utilizado o teste *t* de Student para comparação entre os grupos. * $p < 0,05$ e *** $p < 0,0001$.

4.4.2 Produção de IL-12p40

Investigamos também a interferência da adição exógena de Migalina às culturas de macrófagos tratadas com LPS quanto à produção de IL-12p40. A Figura 14 mostra o mesmo efeito observado para TNF- α . A adição exógena de Migalina às culturas tratadas com LPS reduziu significativamente e de modo dose dependente a produção de IL-12p40. A redução obtida foi entre 71 - 81%, sendo mais acentuada nos grupos tratados com 20 μ g/mL de Migalina associada ao LPS.

Figura 14 - Efeito da adição de Migalina na produção de IL-12p40 induzido pela ativação de M ϕ DM por LPS.

M ϕ DM ($7,5 \times 10^5$ células/ poço) foram estimulados por 20 h com 5, 10 e 20 μ g/mL de Migalina associados ao LPS (100 ng/mL). A síntese de IL-12p40 foi analisada no sobrenadante das culturas pelo ensaio de ELISA. Dados representam a média $\pm$ SEM de quatro experimentos independentes, realizados em duplicata. As diferenças estatísticas representam a comparação entre o grupo tratado apenas com LPS versus o obtido com LPS associado às diferentes concentrações de Migalina, sendo utilizado o teste *t* de Student para comparação entre os grupos. * $p < 0,05$.

4.5 Contribuição da molécula MyD88 para ativação de M ϕ DM por Migalina

Nossos resultados da Figura 11 mostraram que a Migalina ativou M ϕ DM de camundongos C57BL/6 (selvagens) induzindo a produção de TNF- α . Conforme citado anteriormente, a ativação mediada via TLR está intimamente associada a algumas moléculas acessórias dentre elas MyD88, comum a todos estes receptores, exceto TLR 3 (LIN et al., 2011). Em função disto, investigamos se a ativação de macrófagos com Migalina envolvia a participação da molécula MyD88.

A Figura 15 mostra que M ϕ DM de camundongos deficientes na expressão de MyD88 (KO MyD88) ativados por Migalina (5, 10 e 20 μ g/mL) não produziram níveis significantes de TNF- α , sendo os valores próximos aos obtidos com as células não estimuladas, ao contrário do obtido com os animais selvagens (Figura 11). Controles usando LPS confirmaram que estas células não estavam competentes para responder via a estimulação do TLR4, nos M ϕ DM de camundongos MyD88 $^{-/-}$ (dados não mostrados).

Figura 15 - Participação da molécula MyD88 na produção de TNF- α induzida por Migalina. M ϕ DM de camundongos MyD88^{-/-} ($7,5 \times 10^5$ células/ poço) foram estimulados por 20 h com 5, 10 e 20 μ g/mL de Migalina. A síntese de TNF- α foi analisada no sobrenadante das culturas pelo ensaio de ELISA. Dados representam $\pm$ SEM de três experimentos independentes, realizados em duplicata. Diferenças estatísticas pelo one-way ANOVA apenas no C57BL/6. *p<0,05 e ***p<0,0001.

4.6 Influência da PLMX na síntese de TNF- α produzido por M ϕ DM ativados com Migalina

Os dados anteriores mostraram que a presença de MyD88 foi fundamental para a síntese de TNF- α induzida por Migalina. Além disto, notamos que houve redução da atividade induzida por LPS após a adição desta poliamina (Figuras 13 e 14). Sendo assim, para melhor investigar a contribuição do TLR4 na ativação da imunidade inata induzida por Migalina, verificamos se haveria influência da pré-incubação desta poliamina com PLMX B antes da ativação dos macrófagos. Para estabelecer o modelo utilizamos 20 μ g/mL de Migalina ou 100 ng/mL de LPS associado ou não a 30 μ g/mL de PLMX B.

Observamos que a ativação dos macrófagos com Migalina estimulou a produção de TNF- α (596 pg/mL), sendo o aumento significativamente superior ao observado nas células não ativadas (252 pg/mL), conforme demonstrado anteriormente (Figura 11). O grupo onde pré-incubamos a Migalina com PLMX B apresentou resultados similares ao estimulado apenas com Migalina, não havendo diferenças significativas entre eles.

No grupo controle, a adição de 100 ng/mL de LPS às culturas estimulou acentuada produção de TNF- α (2077 pg/mL), enquanto a pré-incubação do LPS com 30 μ g/mL de PLMX B reduziu significativamente o nível de TNF- α (315 pg/mL) para valores próximos aos obtidos com as células não estimuladas (252 pg/mL) confirmando o bloqueio da atividade induzida por LPS mediada pela PLMX B.

Figura 16 - Influência da PLMX B na produção de TNF- α durante a ativação dos M ϕ DM por Migalina. M ϕ DM ($7,5 \times 10^5$ células/ poço) foram estimulados com 20 μ g/mL de Migalina ou 100 ng/mL de LPS de *E.coli*. Pré-incubados ou não com 30 μ g/mL de PLMX B por 45 min. e com posterior ativamos os macrófagos por 20 h. A síntese de TNF- α foi analisada no sobrenadante das culturas pelo ensaio de ELISA. Dados representam a média $\pm$ SEM de três experimentos independentes, realizados em duplicata. As diferenças foram analisadas pelo teste *t* de Student para comparação entre os grupos. **p < 0,001; ***p < 0,0001; N.S, Não Significativo.

5 DISCUSSÃO

As poliaminas são uma família de pequenas moléculas que exercem várias funções fisiológicas em células procarióticas e eucarióticas. Estas moléculas influenciam diversos estágios da síntese de proteína, crescimento e diferenciação celular, conforme discutido inicialmente. Na década de 70, surgiram as primeiras evidências indicativas do potencial imunossupressor das poliaminas naturais (BYRD et al., 1977). Atualmente, sabe-se que estas moléculas apresentam níveis e funções efetoras distintas. Espermina é considerada reguladora negativa da imunidade, enquanto a putrescina parece não alterar a ativação de macrófagos e a espermidina se comparada a espermina, é capaz de inibir fracamente a síntese de citocinas em monócitos (ZHANG; WANG; TRACEY, 2000). O fato de estas moléculas ligarem-se ao DNA e RNA e modular sinais intracelulares faz com que suas funções imunes possam divergir, podendo atuar diferentemente durante a resposta inflamatória, dependendo da natureza da poliamina (IGARASHI; KASHIWAGI, 2010). Essa diferença pode dar a cada poliamina características próprias quanto a sua atividade (PIGNATTI et al., 2004).

Dentre as poliaminas a espermina é a molécula mais estudada por ser predominante em células tumorais. Seus análogos são capazes de induzir efeitos distintos em diferentes células, indicando que há especificidade dos análogos para cada tipo celular (CASERO et al., 1990). Estes efeitos vêm despertando interesse na indústria farmacológica e as vias de captação e internalização das poliaminas exógenas pelas células vem sendo alvo de estudos para o desenvolvimento de novos fármacos com potencial terapêutico (ESTRADA; VILLEGAS; CORZO, 2007; WALLACE, 2009).

Como pioneiros no estudo da modulação da resposta imune induzida por Migalina, avaliamos o efeito de diferentes concentrações deste composto a serem utilizados nos experimentos. A concentração intracelular total de poliaminas é na razão de milimolar, no entanto, seu conteúdo livre é consideravelmente menor, devido a sua alta capacidade de interagir iônica com outras moléculas (CASERO; MARTON, 2007). Sendo assim, optamos por usar nos ensaios *in vitro* entre 11,95 a 95,6 μM de Migalina (5 a 40 $\mu\text{g/mL}$). Esta concentração mostrou-se suficiente para estimular a produção de mediadores imunes, além de não induzir citotoxicidade em macrófagos e esplenócitos, nem alterar a cinética de proliferação

de esplenócitos na presença ou na ausência do mitógeno Concanavalina A (ConA) (MAFRA et al., 2012).

Em corroboração aos nossos dados, Pavlov e colaboradores (2001) demonstraram que a adição de 100 μ M de espermina ou de espermidina, concentrações próximas das utilizadas em nossos ensaios com Migalina, não exerceu qualquer efeito citotóxico sobre células de câncer de mama humano. Entretanto, foi observado que em baixas concentrações (1,38 a 8,45 μ M), diferentes análogos de poliamina derivados de bis-naphthalimidopropil, foram tóxicos para estas células, comprovando as diferentes funções efectoras entre as poliaminas naturais e seus análogos. O efeito destes análogos ocorreu devido ao bloqueio da via biossintética das poliaminas nas células tumorais, que possuem altas concentrações deste composto (PAVLOV et al., 2001; WALLACE, 2009).

Apesar de alguns ensaios correlacionarem a importância das concentrações de soro fetal nas culturas, tempo de tratamento das células com poliaminas e ativação com LPS a citotoxicidade, nossos dados mostraram que a pré-ativação dos macrófagos com Migalina por 1 h e posterior tratamento com LPS ou a adição simultânea destes compostos não provocou citotoxicidade mesmo após 24 horas de cultura (dados não mostrados).

Os macrófagos estão presentes em diversos órgãos, sendo considerado uma das principais populações de células fagocíticas e produtoras de NO. Estas células expressam grande diversidade de receptores, dentre eles destacam-se os receptores Toll-Like. O reconhecimento dos TLRs pelos seus ligantes pode induzir uma resposta inflamatória, estimulando mecanismos antimicrobianos gerados nos macrófagos, incluindo a ativação de iNOS e produção de NO (MYERS; TSANG; SWANSON, 2003; NISH; MEDZHITOV, 2011).

Três isoformas de óxido nítrico sintase (NOS) foram identificadas em células de mamíferos. Duas são constitutivas: cNOS (ou NOS1) e eNOS (ou NOS3), dependentes de íons cálcio e calmodulina, sintetizadas por vários tipos celulares e uma terceira induzível a iNOS (ou NOS2), produzidas principalmente por macrófagos, neutrófilos e células dendríticas ativadas (BOGDAN, 2001). A iNOS é expressa sob condições especiais, sendo regulada positiva ou negativamente pelo contato célula-célula, citocinas ou produtos microbianos. Embora IFN- γ e LPS sejam seus ativadores clássicos, outros reguladores continuam a serem descritos (KOBZIK, 2009).

Sabendo que este mediador imune tem múltiplas funções tanto no sistema imune como em outros sistemas, incluindo atividade tumoricida e antimicrobiana (BOGDAN, 2001; COLE et al., 2012), investigamos se a Migalina teria ação direta sobre a capacidade dos M ϕ DM produzirem NO $_2^-$, que é um produto intermediário da geração de óxido nítrico (NO).

Os dados apresentados mostram que a Migalina ativou diretamente os macrófagos aumentando a produção de NO $_2^-$, independente da pré-ativação das células com outras moléculas (Figura 9). Isto foi confirmado uma vez que a inibição de iNOS por inibidor específico reduziu a síntese de nitrito (Figura 10). Szabó e colaboradores (1994a) ao avaliar o efeito de espermina sobre a ação induzida por LPS em cultura de macrófagos da linhagem J774, verificou que a espermina [1-100 μ M] inibiu a atividade de iNOS reduzindo a síntese de NO. A inibição da enzima ocorreu a nível transcricional.

Existem divergências quanto ao papel do soro fetal no efeito inibitório induzido por poliaminas. Szabo e colaboradores (1994a; 1994b) sugerem que a presença de soro é importante para a espermina exercer seu efeito inibitório sobre a síntese de NO induzida por LPS. Porém, Zhang e colaboradores (1997) mostraram que o efeito inibitório da espermina sobre a síntese de mediadores pró-inflamatórios pode ocorrer na ausência de soro. Acredita-se que o produto gerado pela oxidação das poliaminas por poliamina oxidase na presença de LPS tenha atividade inibitória sobre a atividade de iNOS bloqueando sua síntese (SZABO et al., 1994b). Estes dados diferem dos apresentados por nós, uma vez que não utilizamos espermina (ação supressora), mas a Migalina, análoga de spermidina. Além disso, em nossos ensaios para NO, as células não receberam estímulo adicional por LPS. Entretanto, tal diferença sugere que dependendo da natureza das poliaminas estas podem assumir funções efectoras distintas.

Uma vez que a indução de iNOS é influenciada pela presença de citocinas, (KOBAYASHI, 2010), avaliamos o efeito da ação direta da Migalina sobre a síntese de TNF- α , IL-12p40 e IL-1 β . Os resultados apresentados mostraram que a ativação dos macrófagos com Migalina aumentou a síntese de TNF- α (Figura 11). A presença desta citocina foi também comprovada em células do sistema nervoso central de camundongos mediada pelo aumento da atividade de ODC (primeira enzima da via biossintética das poliaminas) (SOULET; RIVEST, 2003).

A IL-12 é outra citocina pró-inflamatória importante no estabelecimento da resposta imune. Esta molécula faz a ponte entre a imunidade inata e adaptativa (WENDY et al., 2003). Ao investigamos o efeito da ativação de macrófagos com Migalina na síntese de IL-12p40 verificamos que não houve alterações significativas na síntese desta citocina, independente das concentrações de Migalina utilizadas nos ensaios (Figura 12).

Em outro ensaio, analisamos a ação da Migalina sobre a síntese de IL-1 β . Nossos resultados mostraram que os valores obtidos foram inferiores ao limite de detecção da curva padrão. Culturas de macrófagos ativadas com LPS (1 – 5 μ g/mL) produziram esta citocina, sugerindo que não houve problemas com a reação (dados não mostrados). A IL-1 β é inicialmente secretada na forma de pro-IL-1 β , um precursor inativo. Para ser ativada é necessário que o precursor seja clivado, tornando a molécula ativa. Uma das principais enzimas envolvidas neste processo é a caspase-1, esta enzima é mantida em seu estado inativo, tornando-se ativa dentro dos inflamossomas, mediado pelos receptores do tipo NOD (NLR) (NETEA et al., 2010). Apesar de não termos analisado a influência direta da Migalina na ativação dos NLRs, os dados obtidos sugerem que a Migalina não ativou diretamente o complexo do inflamossoma, pois não houve produção de IL-1 β , nem efeito citotóxico nas células ativadas, sugerindo que esta molécula pode não utilizar esta via de sinalização.

O LPS está presente na parede de todas as bactérias Gram negativas, sendo uma molécula importante na ativação dos TLR4 induzindo a resposta imune inata (AKIRA, 2009). A maioria dos efeitos atribuídos às poliaminas são testados em células ativadas por esta molécula. Em outro grupo de experimentos analisamos o efeito da Migalina na ação induzida por LPS, para conhecermos a influência desta acilpoliamina sobre a resposta inflamatória.

Nestes ensaios as células foram pré-incubadas com Migalina por 1 h e posteriormente adicionado o LPS, no entanto, em alguns ensaios preliminares as duas moléculas foram adicionadas simultaneamente às culturas de macrófagos e obtivemos os mesmos resultados.

Pérez-Cano e colaboradores (2003) analisaram a ação imunomodulatória de espermina e espermidina sobre linhagens de macrófagos estimulados por LPS em diversas condições de cultura. Diferentes concentrações de SFB (0-15%), assim como a adição das poliaminas em tempos distintos foram analisadas. A melhor

condição de imunomodulação foi observada na adição simultânea de poliaminas com LPS a cultura. As células apresentaram maior viabilidade na mesma condição de cultivo independente das concentrações de SFB.

Para analisar o efeito da Migalina na ação induzida por LPS, investigamos a síntese de TNF- α e IL-12p40, que podem ser modulados pela ativação via TLR4 (TAKEDA; AKIRA, 2005). Neste sistema, os dados obtidos diferiram do encontrado no efeito sobre ação direta da Migalina na síntese de TNF- α (Figura 11) e IL-12p40 (Figura 14), houve redução significativa da atividade de LPS quanto a produção de TNF- α quando usamos 10 ou 20 $\mu\text{g/mL}$ de Migalina (Figura 13) e de IL-12p40 com todas as concentrações utilizadas (Figura 14).

Estes achados são similares aos descrito na literatura, onde a espermina inibiu a síntese de TNF- α (HASKO et al., 2000; PÉREZ-CANO et al., 2003; SZABO et al., 1994b), além de outras citocinas de caráter pró-inflamatório como IL-6 e MIP-1 α/β em monócitos do sangue periférico humano ativado por LPS. A inibição de TNF- α foi reversível, após a lavagem das células com PBS, restabelecendo á níveis normais após 4 h. Acredita-se que a interferência das poliaminas sobre a síntese de TNF- α seja a nível pós-transcricional, uma vez que não houve alteração no conteúdo de RNAm desta citocina (ZHANG et al., 1997).

Em outro ensaio *in vivo* a espermina foi capaz de inibir o processo inflamatório induzido por carragenina nas patas de camundongo sendo, portanto, considerada um agente anti-inflamatório (ZHANG et al., 1997).

Soulet e Rivest (2003) demonstraram que a via biossintética das poliaminas está envolvida na ativação de genes que codificam TNF- α em células do sistema nervoso central de camundongos. A administração sistêmica de LPS aumentou os níveis de mRNA e proteína de ODC (primeira enzima da via biossintética das poliaminas). O tratamento dos animais com um inibidor desta enzima comprovou que o aumento da transcrição gênica de TNF- α se deu pela atividade de ODC, uma vez que com sua inibição o LPS foi incapaz de induzir a transcrição desse gene.

Quanto á produção de IL-12p40, Haskó e colaboradores (2000) demonstraram que a ativação de macrófagos com putrecina na presença de LPS não alterou sigificativamente a produção de IL-12p40, ao contrário da ativação com espermina que suprimiu a síntese desta citocina de modo dose dependente. Além disso, a presença de IL-10 comprovou o perfil anti-inflamatório da espermina. Em outros ensaios, usando camundongos deficientes de IL-10, foi verificado que a

espermina manteve sua capacidade inibitória sobre a síntese de IL-12p40, sugerindo que tal inibição foi independente de IL-10 (HASKO et al., 2000).

Em nossos ensaios, também verificamos redução na síntese de IL-12p40 quando os macrófagos foram pré-incubados com Migalina (5, 10 e 20 $\mu\text{g/mL}$) e posteriormente tratados com LPS, no entanto, não analisamos a presença de IL10, o que será realizado no futuro. É possível que a Migalina, por ser uma acilpoliamina análoga da espermidina, que normalmente é a menos explorada dentre as poliaminas, tenha também capacidade de controlar o excesso de ativação nos macrófagos gerado durante o estímulo com LPS, na tentativa de proteger estas células.

Apesar de não termos detectado IL-1 β nas ativações direta de macrófagos com Migalina, outros trabalhos usando uma poliamina primária, sintetizada a partir da L-arginina, denominada agmatina, associada a LPS, mostrou redução nos níveis de IL-1 β em linhagens de células microgлияis murinas (AHN et al., 2012).

A regulação de citocinas inflamatórias pela espermina parece diferir. Foi observado 100% de inibição de MIP- α/β e IL-6, enquanto a inibição de TNF- α não excedeu 75%, não havendo modificação da síntese de TGF- β , uma importante citocina de perfil anti-inflamatório (ZHANG; WANG; TRACEY, 2000). Isto pode explicar em parte os nossos resultados, onde a ativação dos M ϕ DM com Migalina respondeu em níveis diferentes para IL-12p40 e TNF- α . Acredita-se que esta poliamina faria o controle do processo inflamatório impedindo que altos níveis de citocinas pró-inflamatórias sejam produzidos durante condições patológicas. Além disso, altas concentrações de espermina pode causar doenças auto-imunes (ZHANG; WANG; TRACEY, 2000). Níveis elevados de espermina foram observados durante o processos inflamatórios e de regeneração tecidual, seja por infecção, injúria ou morte celular, refletindo a gravidade da inflamação. Em função disto, a supressão de macrófagos por espermina seria uma forma de proteger o hospedeiro de excessiva resposta inflamatória (ZHANG; WANG; TRACEY, 2000).

Em outra abordagem, avaliamos a contribuição dos TLRs, analisando a importância da molécula MyD88 no processo de ativação promovido pela Migalina, durante a resposta imune inata desencadeada em macrófagos.

A molécula adaptadora MyD88 faz parte da cascata de sinalização de todos os TLRs, exceto o TLR3 (LIN et al., 2011). Assim sendo, a cascata de sinais mediada

por MyD88 está associada com a ativação induzida por estes receptores durante a resposta inata. Esta molécula controla a produção de citocinas e ativação de vias de sinalização importantes durante a resposta imune inata (AKIRA, 2009). Foi comprovado que células de camundongos MyD88^{-/-} pode apresentar redução no nível de citocinas produzidas, mas aumento da expressão de moléculas coestimulatórias (CD40, CD80 e CD86) e indução da proliferação de linfócitos em resposta ao LPS (ADACHI et al., 1998). Isto sugere que, há vias de ativação independentes de MyD88 envolvidas na resposta ao LPS. Além disso, camundongos MyD88^{-/-} podem desenvolver inflamação gástrica severa, sugerindo que há outras vias independentes de MyD88 capazes de induzir resposta inflamatória (RAD et al., 2007). Camundongos MyD88^{-/-} se mostraram resistentes ao choque endotóxico, mas preservaram a resposta mediada por NFkB e MAPkinase. Apenas a ativação mediada por TLR4 usa via dependente ou independente de MyD88 (KAWAI et al., 1999). Ambas as vias geram uma cascata de ativação de sinais moleculares que regulam os fatores de transcrição responsáveis pela síntese de citocinas inflamatórias.

Ao analisamos a contribuição desta molécula utilizando MφDM de camundongos MyD88^{-/-} (Figura 15), observamos que os níveis basais de TNF-α nas células não ativadas, foi similar entre as populações de macrófagos selvagens e MyD88^{-/-}. Contudo, a produção de citocina induzida pela Migalina nas células dos animais deficientes foi inferior ao encontrado nos animais selvagens. Isto está de acordo como o observado na literatura quando se usa outros ativadores da resposta imune (BJORKBACKA et al., 2004; RAD et al., 2007). Nossos resultados comprovaram que a via dependente de MyD88 está envolvida com a síntese de TNF-α induzida por Migalina, uma vez que a ausência desta molécula reduziu a produção desta citocina. Assim, sugerimos que a cascata de sinalização mediada por MyD88 é importante para a síntese TNF-α durante a ativação com Migalina, estando correlacionada com a ativação induzida pelos TLRs.

Outros trabalhos mostraram envolvimento de poliaminas com a via de sinalização desencadeada pelos TLRs. Foi verificado que a administração de LPS no sistema nervoso central de camundongos aumentou a transcrição de genes de TLR2, citocinas pró-inflamatórias e ODC. A redução nos níveis de putrecina impediu que a ativação com LPS induzisse a transcrição gênica de TLR2 e TNF-α. Em

contraste, a transcrição de ambos foi aumentada com a perfusão intracerebral de espermina. A inibição da síntese de poliaminas aboliu o aparecimento de neurodegeneração e aumentou a sobrevivência dos animais (SOULET; RIVEST, 2003).

Outros trabalhos mostraram correlação entre TLRs, poliaminas e PAMPs em células do epitélio intestinal. A diminuição do conteúdo intracelular de poliaminas, através da inibição de ODC, reduziu a expressão do mRNA e proteína de TLR2, enquanto a superexpressão de ODC aumentou a expressão do gene TLR2, mas não alterou o níveis basais de TLR4. Além disso, células do epitélio intestinal estimuladas com LPS aumentaram a atividade de ODC, e a expressão de TLR2, mas não de TLR4 (CHEN, J. et al., 2007).

Há poucas informações sobre os efeitos de análogos de poliaminas na regulação de vias mediadas por TLR. Nossos resultados indicam que a Migalina requer a presença de MyD88 e sinais moleculares emitidos via esta molécula para a síntese de TNF- α .

Para complementar as informações relacionadas à contribuição do TLRs nos mecanismos de ativação dos macrófagos pela Migalina, analisamos o efeito da pré-incubação deste composto com PLMX B na síntese de TNF- α . O fato deste antibiótico não modificar a resposta induzida por Migalina sugere que o TLR4 não é a principal via de sinalização envolvida na regulação de síntese desta citocina uma vez que a PLMX B adere à porção do lipídeo A no LPS inibindo sua atividade (SANDRI et al., 2008) e a ação desta molécula se dá preferencialmente via TLR4.

A Migalina é um produto sintético não sendo obtida a partir da inserção de um vetor em bactéria, onde o produto poderia ter contaminação com LPS. A não redução no nível TNF- α após incubação da Migalina com PLMX B (Figura 16) mostra que a resposta obtida é em função da presença deste composto e não de LPS.

Portanto, nossos resultados mostraram que a Migalina é capaz de modular a atividade de macrófagos induzindo mediadores da resposta imune inata. A sinalização mediada por TLR parece estar envolvida nestes mecanismos de ativação. Sendo assim, as funções efetoras mediadas pela Migalina devem ser melhor exploradas como estratégia no controle da resposta imune e de infecções.

6 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no presente trabalho nos permite concluir que a Migalina:

- ✓ Ativa diretamente a resposta imune inata através da indução NO e TNF- α , mas não de IL-12p40 e IL-1 β , onde esta, não foi detectada.
- ✓ Controla a resposta inflamatória induzida por LPS, reduzindo a síntese de TNF- α e IL-12p40, podendo ser explorada como molécula reguladora da homeostase celular, frente a respostas imunológicas exacerbadas.
- ✓ Requer sinalizações mediadas por TLRs via a molécula MyD88 durante a ativação dos macrófagos para a produção de TNF- α .
- ✓ Não altera o perfil de síntese de TNF- α na presença de PLMX, sugerindo que sua ação efetora independe de LPS.

Estudos adicionais são necessários para melhor elucidar os mecanismos de transporte, moléculas e vias de sinalizações envolvidas na ativação dos macrófagos por Migalina. Contudo, podemos concluir que esta poliamina modula a atividade de M ϕ DM através de mediadores da resposta imune inata e pode ser explorada como estratégia no controle de infecções.

REFERÊNCIAS *

- ADACHI, O.; KAWAI, T.; TAKEDA, K.; MATSUMOTO, M.; TSUTSUI, H.; SAKAGAMI, M.; NAKANISHI, K.; AKIRA, S. Targeted disruption of the MyD88 gene results in loss of IL-1- and IL-18-mediated function. **Immunity**, v. 9, p. 143-150, 1998.
- AHN, S. K.; HONG, S.; PARK, Y. M.; CHOI, J. Y.; LEE, W. T.; PARK, K. A.; LEE, J. E. Protective effects of agmatine on lipopolysaccharide-injured microglia and inducible. **Life Sciences**, v. 91, p. 1345-1350, 2012.
- AKIRA, S. Pathogen recognition by innate immunity and its signaling. **Proceedings of the Japan Academy**, v. 85, p. 143 – 156, 2009.
- AKIRA, S.; TAKEDA, K.; KAISHO, T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. **Nat. Immunol.**, v. 2, n. 8, p. 675-680, 2001.
- AKIRA, S.; TAKEDA, K. Toll-like receptor signalling. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 4, p. 499–511, 2004.
- AKIRA, S.; UEMATSU, S.; TAKEUCHI, O. Pathogen recognition and innate immunity. **Cell**, v. 124, n. 4, p. 783-801, 2006.
- ATHERTON, E.; SHEPPARD, R. C. **Solid phase peptide synthesis: a practical approach**. IRL Press at Oxford University Press, 1989. 116 p.
- BELTING, M.; MANI, K.; JÖNSSON, M.; CHENG, F.; SANDGREN, S.; JONSSON, S. DING, K.; DELCROS, J. G.; FRANSSON, L. A. Glypican-1 is a vehicle for polyamine uptake in mammalian cells: a pivotal role for nitrosothiol-derived nitric oxide. **J. Biol. Chem.**, v. 278, p. 47181–47189, 2003.
- BELTING, M.; PERSSON, S.; FRANSSON, L. A. Proteoglycan involvement in polyamine uptake. **Biochem. J.**, v. 338, p. 317–323, 1999.
- BIANCHI, M. E. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. **Journal of Leukocyte Biology.**, v. 81, p. 1-5, 2007.
- BJORKBACKA, H.; FITZGERALD, K. A.; HUET, F.; LI, X.; GREGORY, J. A.; LEE, M. A.; ORDIA, C. M.; DOWLEY, N. E.; GOLENBOCK, D. T.; FREEMAN, M. W. The induction of macrophage gene expression by LPS predominantly utilizes Myd88-independent signaling cascades. **Physiol Genomics**, v. 19, p. 319–330, 2004.
- BLASIUS, A. L.; BEUTLER, B. Intracellular toll-like receptors. **Immunity**, v. 26, p. 305-315, 2010.

---

* De acordo com:

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

BOGDAN, C. Nitric oxide and the immune response. **Nature Immunology**, v. 2, n. 10, p. 907-914, 2001.

BYRD, W. J.; JACOBS, D. M.; AMOSS, M. S. Synthetic polyamines added to cultures containing bovine sera reversibly inhibit in vitro parameters of immunity. **Nature**, v. 267, p. 621-623, 1977.

CAMPEBELL, R. C.; PEIRÓ, J. R.; ROSA, P. C. S.; VALADÃO, C. A. A.; BECHARA, G. H. *Escherichia coli* lipopolysaccharide (LPS) induced endotoxemia in horses: effects of anti-inflammatory drugs on seric and peritoneal tumor necrosis factor alpha (TNF- α) concentrations. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, n. 4, p. 837-843, 2007.

CARLSON JR, P. E.; HORZEMPA, J.; O'DEE, D. M.; ROBINSON, C. M.; NEOPHYTOU, P.; LABRINIDIS, A.; NAU, G. J. Global Transcriptional Response to Spermine, a Component of the Intramacrophage Environment, Reveals Regulation of *Francisella* Gene Expression through Insertion Sequence Elements. **Journal of Bacteriology**, p. 6855-6864, 2009.

CASERO JR, R. A.; CELANO, P.; ERVIN S. J.; WIEST, L.; PEGG, A. E. High specific induction of spermidine/ spermine N1-acetyltransferase in a human large cell lung carcinoma. **Biochem. J.**, v. 270, p. 615-620, 1990.

CASERO JR, R. A.; MARTON, L. J. Targeting polyamine metabolism and function in cancer and other hyperproliferative diseases. **Nature Reviews, Drug Discovery**, v. 6, p. 373-390, 2007.

CHEN, J.; RAO, J. N.; ZOU, T.; LIU, L.; MARASA, B. S.; XIAO, L.; ZENG, X.; TURNER, D. J.; WANG, J. Y. Polyamines are required for expression of Toll-like receptor 2 modulating intestinal epithelial barrier integrity. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.**, v. 293, p. 568-576, 2007.

CHEN, K.; HUANG, J.; GONG, W.; IRIBARREN, P.; DUNLOP, N. M.; WANG, J. M. Toll-like receptors in inflammation, infection and cancer. **Int. Immunopharmacol.**, v. 7, p. 1271-1285, 2007.

CHEN, X. L.; ZHANG, Q.; ZHAO, R.; DING, X.; TUMMALA, P. E.; MEDFORD, R. M. Rac1 and superoxide are required for the expression of cell adhesion molecules induced by tumor necrosis factor-alpha in endothelial cells. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 305, p. 573-580, 2003.

CHOI, C. Y.; PARK, K. R.; LEE, J. H.; JEON, Y. J.; LIU, K. H.; OH, S.; KIM, D. E.; YEA, S. S. Isoeugenol suppression of inducible nitric oxide synthase expression is mediated by down-regulation of NF-kappaB, ERK1/2, and p38 kinase. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 576, n. 1-3, p. 151-159, 2007.

COHEN, J. The immunopathogenesis of sepsis. **Nature**, v. 19-26, p. 885-891, 2002.

COLE, C.; THOMAS, S.; FILAK, H.; HENSON, P. M.; LENZ, L. L. Nitric Oxide Increases Susceptibility of Toll-like Receptor-Activated Macrophages to Spreading *Listeria monocytogenes*. **Immunity**, v. 36, p. 807–820, 2012.

CORDEIRO-DA-SILVA, A.; TAVARES, J.; ARAÚJO, N.; CERQUEIRA, F.; TOMAS, A.; LIN, P. K. T.; OUAISSI, A. Immunological alterations induced by polyamine derivatives on murine splenocytes and human mononuclear cells. **International Immunopharmacology**, v. 4, p. 547–556, 2004.

CRACK, P. J.; BRAY, P. J. Toll-like receptors in the brain and their potential roles in neuropathology. **Immunol. Cell Biol.**, v. 85, p. 476–480, 2007.

D'ANDREA, A.; MA, X.; ASTE-AMEZAGA, M.; PAGANIN, C.; TRINCHIERI, G. Stimulatory and inhibitory effects of interleukin (IL)-4 and IL-13 on the production of cytokines by human peripheral blood mononuclear cells: priming for IL-12 and tumor necrosis factor alpha production. **J. Exp. Med.**, v. 181, n. 2, p. 537-546, 1995.

DING, A. H.; NATHAN, C. F.; STUEHR, D. J. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. **J. Immunol.**, v. 120, n. 4, p. 2407-2412. 1988.

DUDLEY, H. W.; ROSENHEIM, M. C.; ROSENHEIM, O. The chemical constitution of spermine. 1. The isolation of spermine from animal tissues and the preparation of its salts. **Biochem. J.**, v. 18, p. 1263–1272, 1924.

DUDLEY, H. W.; ROSENHEIM, O.; STARLING, W. W. The chemical constitution of spermine: Structure and synthesis. **Biochem. J.**, v. 20, p. 1082–1094, 1926.

EDWARDS, J. P.; ZHANG, X.; FRAUWIRTH, K. A.; MOSSER, D. M. Biochemical and functional characterization of three activated macrophage populations. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 80, n. 6, p. 1298-1307, 2006.

ESTRADA, G.; VILLEGAS, E.; CORZO, G. Spider venoms: a rich source of acylpolyamines and peptides as new leads for CNS drugs. **Nat. Prod. Rep.**, v. 24, p. 145–161, 2007.

FINLAY, B. B.; HANCOCK, R. E. W. Opinion – can innate immunity be enhanced to treat microbial infections? **Nature Rev. Microbiol.**, v. 2, p. 497–504, 2004.

FITZGERALD, K. A.; PALSSON-MCDERMOTT, E. M.; BOWIE, A. G.; JEFFERIES C. A; MANSELL A. S; BRADY G, et al. Mal (MyD88-adaptor-like) is required for Toll-like receptor-4 signal transduction. **Nature**, v. 413, p. 78–83, 2001.

FLEMING, B. D.; MOSSER, D. M. Regulatory macrophages: Setting the Threshold for Therapy. **Eur. J. Immunol.**, v. 41, p. 2470–2525, 2011.

FLESCH, I. E.; HESS, J. H.; HUANG, S.; AGUET, M.; ROTHE, J.; BLUETHMANN, H.; KAUFMANN, S. H. Early interleukin 12 production by macrophages in response to mycobacterial infection depends on interferon gamma and tumor necrosis factor alpha. **J. Exp. Med.**, v. 181, n. 5, p. 1615-1621, 1995.

FORTE, W. C. N. **Imunologia**: do básico ao aplicado. 2. ed. Porto Alegre: Artmed; 2007. 162 p.

FUJIWARA, N.; KOBAYASHI, K. Macrophages in inflammation. **Current Drug Targets: Inflammation & Allergy**, v. 4, p. 281-286, 2005.

GEA-SORLÍ, S.; CLOSA, D. Role of macrophages in the progression of acute pancreatitis. **World Journal of Gastrointestinal Pharmacology and Therapeutics**, v. 1, n. 5, p. 107-111, 2010.

GERNER, E. W.; MEYSKENS JR, F. L. Polyamines and cancer: old molecules, new understanding. **Nat. Rev. Cancer**, v. 4, p. 781-792, 2004.

GERSUK, G.; HIRAOKA, A.; MARR, K. A. Human monocytes differentiate into macrophages under the influence of human KPB-M15 conditioned medium. **Journal of Immunology Methods**, v. 299, p. 99-106, 2004.

GOODRIDGE, H. S.; HARNETT, W.; LIEW, F. Y.; HARNETT, M. M. Differential regulation of interleukin-12 p40 and p35 induction via Erk mitogen-activated protein kinase-dependent and -independent mechanisms and the implications for bioactive IL-12 and IL-23 responses. **Immunology**, v. 109, n. 3, p. 415-425, 2003.

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

GORDON, S. Alternative activation of macrophage. **Nature Reviews Immunology**, v. 3, p. 23-35, 2003.

GRÜTZ, G. New insights into the molecular mechanism of interleukin-10-mediated immunosuppression. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 77, p. 3-15, 2005.

HAMANA, K.; MATSUZAKI, S. Polyamines as a chemotaxonomic marker in bacterial systematics. **Crit. Rev. Microbiol.**, v. 18, p. 261-283, 1992.

HASKO, G.; KUHEL, D. G.; MARTON, A.; NEMETH, Z. H.; DEITCH, E. A.; SZABO, C. Spermine differentially regulates the production of interleukin-12p40 and interleukin-10 and suppresses the release of the T helper 1 cytokine interferon-gamma. **Shock**, v. 14, p. 144-149, 2000.

HAYASHI, S.; MURAKAMI, Y.; MATSUFUJI, S. Ornithine decarboxylase antizyme: a novel type of regulatory protein. **Trends Biochem. Sci.**, v. 21, p. 27-30, 1996.

HEBY, O.; PERSSON, L.; RENTALA, M. Targeting the polyamine biosynthetic enzymes: a promising approach to therapy of African sleeping sickness, Chagas' disease, and leishmaniasis, **Amino Acids**, v. 33, p. 359-366, 2007.

IGARASHI, K.; KASHIWAGI, K. Modulation of cellular functions by polyamines. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v. 42, p. 39-51, 2010.

IWASAKI, A.; MEDZHITOV, R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. **Nat. Immunol.**, v. 5, n. 10, p. 987-995, 2004.

IWASAKI, A.; MEDZHITOV, R. Review: regulation of adaptive immunity by the innate immune system. **Science**, v. 327, p. 291-295, 2010.

JENSSEN, H.; HANCOCK, R. E. Therapeutic potential of HDPs as immunomodulatory agents. **Methods Mol. Biol.**, v. 618, p. 329–347, 2010.

KAWAI, T.; ADACHI, O.; OGAWA, T.; TAKEDA, K.; AKIRA, S. Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. **Immunity**, v. 11, n. 1, p. 115-122, 1999.

KAWAI, T.; AKIRA S. TLR signaling. **Semin. Immunol.**, v. 19, p. 24–32, 2007.

KNORR, R.; TRZECIAK, A.; BANNWARTH, W.; GILLESSEN, D. New coupling reagents in peptide chemistry. **Tetrahedron Letters**, v. 30, n. 15, p.1927-1930, 1989.

KOBAYASHI, Y. The regulatory role of nitric oxide in proinflammatory cytokine expression during the induction and resolution of inflammation. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 88, p. 1157 – 1162, 2010.

KOBZIK, L. Translating NO biology into clinical advances. **Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.**, v. 41, p. 9–13, 2009.

KUMARASAMY, K. K.; TOLEMAN, M. A.; WALSH, T. R.; BUTT, F. A.; BALAKRISHNAN, R.; CHAUDHARY, U.; DOUMITH, M.; GISKE, C. G.; IRFAN, S.; KRISHNAN, P.; KUMAR, A. V.; MAHARIAN, S.; MUSHTAQ, S.; NOORIE, T.; PATERSON, D. L.; PEARSON, A.; PERRY, C.; PIKE, R.; RAO, B.; RAY, U.; SARMA, J. B.; SHARMA, M.; SHERIDAN, E.; THIRUNARAYAN, M. A.; TURTON, J.; UPADHYAY, S.; WARNER, M., WELFARE, W.; LIVERMORE, D. M.; WOODFORD, N. Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 10, p. 1-6, 2010.

LIN, Q.; LI, M.; FANG, D.; FANG, J.; SU, S. B. The essential roles of Toll-like receptor signaling pathways in sterile inflammatory diseases. **International Immunopharmacology**, v. 11, p. 1422–1432, 2011.

LIU, L.; LI, L.; RAO, J. N.; ZOU, T. T.; ZHANG, H. F. M.; BONEVA, D.; BERNARD, M. S. WANG, J. Y. Polyamine-modulated expression of c-myc plays a critical role in stimulation of normal intestinal epithelial cell proliferation. **Am. J. Physiol. Cell Physiol.**, v. 288, p. 89–99, 2005.

LIU, L.; SANTORA, R.; RAO, J. N.; GUO, X.; ZOU, T. T.; ZHANG, H. F. M.; TURNER, D. J.; WANG, J. Y. Activation of TGF-beta-Smad signaling pathway following polyamine depletion in intestinal epithelial cells, **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.**, v. 285, p. 1056–1067, 2003.

LO PERSSON. Polyamine homoeostasis. **Biochemical Society. Essays Biochem.**, v. 46, p. 11–24, 2009.

LOVAAS, E.; CARLIN, G. Spermine: an anti-oxidant and anti-inflammatory agent. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 11, n. 5, p. 455-461, 1991.

MAFRA, D. G.; SILVA Jr, P. I.; GALHARDO, C. S.; NASSAR, R.; DAFFRE, S.; SATO, M. N.; BORGES, M. M. The spider acylpolyamine Mygalin is a potent modulator of innate immune responses. **Cell Immunol.**, v. 275, n. 1-2, p. 5-11, 2012.

MAHIDA, Y. R. The key role of macrophage in immunopathogenesis of IBD. **Inflammatory Bowel Diseases**, v. 6, n. 1, p. 21-23, 2000.

MANTOVANI, A.; SICA, A.; LOCATI, M. New vistas on macrophage differentiation and activation. **European Journal of Immunology**, v. 37, p. 14-16, 2007.

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

MESSINA, L.; ARCIDIACONOL, A.; SPAMPINATO, G.; MALAGUAMERAL, L.; BERTON, G.; KACZMAREK, L.; MESSINA, A. Accumulation of ornithine decarboxylase mRNA accompanies activation of human and mouse monocytes/macrophages, **FEBS**, v. 268, n. 1, p. 32-34, 1990.

MITCHELL, J. L.; THANE, T. K.; SEQUEIRA, J. M.; THOKALA, R. Unusual aspects of the polyamine transport system affect the design of strategies for use of polyamine analogues in chemotherapy. **Biochem. Soc. Trans.**, v. 35, p. 318–321, 2007.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunology Methods**, v. 65, p. 55-65, 1983.

MOSSER, D. M.; EDWARD, J. P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. **Nature Reviews Immunology**, v. 8, p. 958–969, 2008.

MYERS, J. T.; TSANG, A. W.; SWANSON, J. A. Localized reactive oxygen and nitrogen intermediates inhibit escape of *Listeria monocytogenes* from vacuoles in activated macrophages. **J. Immunol.**, v. 171, p. 5447–5453, 2003.

MYLONAS, K. J.; NAIR, M. G.; PRIETO-LAFUENTE, L.; PAAPE, D.; ALLEN, J. E. Alternatively activated macrophages elicited by helminth infection can be reprogrammed to enable microbial killing. **Journal of Immunology**, v. 182, p. 3084-3094, 2009.

NAPPI, A. J.; OTTAVIANI, E. Cytotoxicity and cytotoxic molecules in invertebrates, **Bioessays**, v. 22, p. 469–480, 2000.

NETEA, M. G.; SIMON, A.; VEERDONK, F. V.; KULLBERG, B.; DER MEER, J. W. M. V.; JOOSTEN, L. A. B. IL-1 β Processing in Host Defense: Beyond the Inflammasomes, **PLoS Pathogens**, v. 6, p. 1-9, 2010.

NISH, S.; MEDZHITOV, R. Host defense pathways: role of redundancy and compensation in infectious disease phenotypes. **Immunity**, v. 34, p. 629–636, 2011.

OSHIUMI, H.; MATSUO, A.; MATSUMOTO, M.; SEYA, T. Pan-vertebrate toll-like receptors during evolution. **Current Genomics**, v. 9, p. 488-493, 2008.

O'NEILL, L. A. How Toll-like receptors signal: what we know and what we don't know. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 18, p. 3–9, 2006.

PARK, A. Y.; SCOTT, P. IL-12: keeping cell-mediated immunity alive. **Scand. J. Immunol.**, v. 53, n. 6, p. 529-532, 2001.

PARK, J. S.; SVETKAUSKAITE, D.; HE, Q.; KIM, J.; STRASSHEIM, D.; ISHIZAKA, A.; ABRAHAM, E. Involvement of Toll-like Receptors 2 and 4 in Cellular Activation by High Mobility Group Box 1 Protein. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 9, p. 7370–7377, 2004.

PAVLOV, V.; LIN, P. K. T.; RODILLA, V. Cytotoxicity, DNA binding and localisation of novel bis-naphthalimidopropyl polyamine derivatives. **Chemico-Biological Interactions**, v. 137, p. 15–24, 2001.

PEREIRA, L. S.; SILVA JR., P. I.; MIRANDA, M. T. M.; ALMEIDA, I. C.; NAOKI, H.; KANNO, K.; DAFFRE, S. Structural and biological characterization of one antibacterial acylpolyamine isolated from the hemocytes of the spider *Acanthocurria gomesiana*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 352, p. 953–959, 2007.

PÉREZ-CANO, F. J.; FRANCH, A.; CASTELLOTE, C.; CASTELL, M. Immunomodulatory action of spermine and spermidine on NR8383 macrophage line in various culture conditions. **Cellular Immunology**, v. 226, p. 86–94, 2003.

PIGNATTI, C.; TANTINI, B.; STEFANELLI, C.; FLAMIGNI, F. Signal transduction pathways linking polyamines to apoptosis. **Amino Acids**, v. 27, p. 359–365, 2004.

RAD, R.; BRENNER, L.; KRUG, A.; VOLAND, P.; MAGES, J.; LANG, R.; SCHWENDY, S.; REINDL, W.; DOSSUMBEKOVA, A.; BALLHORN, W.; WAGNER, H.; SCHMID, R. M.; BAUER, S.; PRINZ, C. Toll-Like Receptor–Dependent Activation of Antigen-Presenting Cells Affects Adaptive Immunity to *Helicobacter pylori*. **Gastroenterology**, v. 133, p. 150-163, 2007.

RAMIREZ, K.; HUERTA, R.; OSWALD, E.; GARCIA-TOVAR, C.; HERNANDEZ, J. M.; NAVARRO-GARCIA, F. Role of EspA and Intimin in expression of proinflammatory cytokines from enterocytes and lymphocytes by rabbit Enteropathogenic *Escherichia coli*-infected rabbits. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 1, p. 103-113, 2005.

SANDRI, S.; RODRIGUEZ, D.; GOMES, E.; MONTEIRO, H. P.; RUSSO, M.; CAMPA, A. Is sérum amyloid A an endogenous TLR4 agonist? **Journal of Leukocyte Biology**, v. 83, p. 1174-1180, 2008.

SCHINDLER, H.; LUTZ, M. B.; RÖLLINGHOFF, M.; BOGDAN, C. The production of IFN-gamma by IL-12/IL-18-activated macrophages requires STAT4 signaling and is inhibited by IL-4. **Journal of Immunology**, v. 166, p. 3075-3082, 2001.

SILVA JR, P. I.; MELO, R. L. Antimicrobial Activity of Synthetic Mygalin and Analogues. In: ANNUAL MEETING OF SBBq, 39., 2010, Foz do Iguaçu, PR, Brasil. **Abstracts...** Foz do Iguaçu: Annual Meeting of SBBq, 2010.

SODA, K.; KANO, Y.; NAKAMURA, T.; KASONO, K.; KAWAKAMI, M.; KONISHI, F. Spermine, a natural polyamine, suppresses LFA-1 expression on human lymphocyte, **J. Immunol.**, v. 175, p. 237–245, 2005.

SOULET, D.; GAGNON, B.; RIVEST, S.; AUDETTE, M.; POULIN, R. A fluorescent probe of polyamine transport accumulates into intracellular acidic vesicles via a two step mechanism. **J. Biol. Chem.**, v. 279, p. 49355–49366, 2004.

SOULET, D.; RIVEST, S. Polyamines play a critical role in the control of the innate immune response in the mouse central nervous system. **J. Cell Biol.**, v. 162, n. 2, p. 257-268, 2003.

STADTHAGEN, M.; BRIEGER, L. **Berl. Klin. Wochenschr.**, v. 26, p. 344–346, 1889.

SZABO, C.; SOUTHAN, G. J.; WOOD, E.; THIEMERMANN, C.; VANE, J. R. Inhibition by spermine of the induction of nitric-oxide synthase in J774.2 macrophages – requirement of a serum factor. **Br. J. Pharmacol.**, v. 112, p. 355–356, 1994a.

SZABO, C.; SOUTHAN, G. J.; THIEMERMANN, C.; VANE, J. R. The mechanism of the inhibitory effect of polyamines on the induction of nitric oxide synthase: role of aldehyde metabolites. **Br. J. Pharmacol.**, v. 113, p. 757–766, 1994b.

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

TABOR, C. V.; TABOR, H. Polyamines. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 53, p. 749–790, 1984.

TAKEDA, K.; AKIRA, S. TLR signaling pathways. **Semin. Immunol.**, v. 16, p. 3–9, 2004.

TAKEDA, K.; AKIRA, S. Toll-like receptors in innate immunity. **Int. Immunol.**, v. 17, n.1, p. 1-14, 2005.

THOMAS, T.; THOMAS, T. J. Polyamine metabolism and cancer. **Cell Mol. Life Sci.**, v. 58, p. 244–258, 2001.

TOSI, M. F. Innate immune responses to infection. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**. v. 116, p. 241-249, 2005.

TRAVIS, J. Reviving the Antibiotic Miracle? **Science**, v. 264, p. 360-362, 1994.

TRIPATHI, P.; TRIPATHI, P.; KASHYAP, L.; SINGH V. The role of nitricoxide in inflammatory reactions. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, v. 51, p. 443–452, 2007.

UNDERHILL, D. M. Collaboration between the innate immune receptors dectin-1, TLRs, and Nods. **Immunol. Rev.**, v. 219, p. 75–87, 2007.

VAN LEEUWENHOEK, A. Observationes D. Anthonii Leeuwenhoek, de Natis e semine genitali Animalculis. **Philos. Trans. R. Soc. London.**, v. 12, p. 1040–1043, 1678.

WALLACE, H. M.; FRASER, A. V.; HUGHES A. A perspective of polyamine metabolism. **Biochem. J.**, v. 376, p. 1–14, 2003.

WALLACE, H. M. The polyamines: past, present and future. **Biochemical Society. Essays Biochem.**, v. 46, p. 1–9, 2009.

WALLACE, H. M.; NUTTALL, M. E.; COLEMAN, C. S. Polyamine recycling enzymes in human cancer cells. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 250, p. 331–344, 1988.

WEISSER, S. B.; MCLARREN, K. W.; KURODA, E.; SLY, L. M. Generation and Characterization of Murine Alternatively Activated Macrophages. **Methods Mol. Biol.**, v. 946, p. 225-239, 2013.

WENDY, T. W.; MORIGUCHI, M.; MORINOBU, A.; O'SHEA, J. The biology of IL-12: coordinating innate and adaptive immune responses. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 14 p. 361–368, 2003.

WELCH, J. E.; BENGTSON, P.; SVENSSON, K.; WITTRUP, A.; JENNISKENS, G. J.; TEN DAM, G. B.; VAN KUPPEVELT, T. H.; BELTING, M. Single chain fragment anti-heparan sulfate antibody targets the polyamine transport system and attenuates polyamine-dependent cell proliferation. **Int. J. Oncol.**, v. 32, p. 749–756, 2008.

WYSOCKA, M.; KUBIN, M.; VIEIRA, L. Q.; OZMEN, L.; GAROTTA, G.; SCOTT, P.; TRINCHIERI, G. Interleukin-12 is required for interferon-gamma production and lethality in lipopolysaccharide-induced shock in mice. **Eur. J. Immunol.**, v. 3, p. 672-676, 1995.

YUN, P. L.; DECARLO, A. A.; COLLYER, C.; HUNTER, N. Modulation of an interleukin-12 and gamma interferon synergistic feedback regulatory cycle of T-cell and monocyte cocultures by *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide in the absence or presence of cysteine proteinases. **Infect. Immun.**, v. 70, n. 10, p. 5695-5705, 2002.

XIAOJING, M. A. TNF- α and IL-12: a balancing act in macrophage functioning. **Microbes and Infection.**, v. 3, p. 121-129, 2001.

ZHANG, M. H.; BOROVIKOVA, L. V.; WANG, H. C.; METZ, C.; TRACEY, K. J. Spermine inhibition of monocyte activation and inflammation. **Mol. Med.**, v. 5, p. 595-605, 1999.

ZHANG, M. H.; CARAGINE, T.; WANG, H. C.; COHEN, P. S.; BOTCHKINA, G.; SODA, K.; BIANCHI, M.; ULRICH, P.; CERAMI, A.; SHERRY, B.; TRACEY, K. J. Spermine inhibits proinflammatory cytokine synthesis in human mononuclear cells: a counterregulatory mechanism that restrains the immune response, **J. Exp. Med.**, v. 185, p. 1759-1768, 1997.

ZHANG, M. H.; WANG, H. C.; TRACEY, K. J. Regulation of macrophage activation and inflammation by spermine: a new chapter in an old story. **Critical Care Medicine**, v. 28, p. 60-66, 2000.

ZHOU, L.; NAZARIAN, A. A.; SMALE, S. T. Interleukin-10 inhibits interleukin-12 p40 gene transcription by targeting a late event in the activation pathway. **Mol. Cell Biol.**, v. 24, n. 6, p. 2385-2396, 2004.

APÊNDICE – Artigo de Periódico

MAFRA, D. G.; SILVA JR, P. I.; GALHARDO, C. S.; NASSAR, R.; DAFFRE, S.; SATO, M. N.; BORGES, M. M. The spider acylpolyamine Mygalin is a potent modulator of innate immune responses. **Cell Immunol.**, v. 275, n. 1-2, p. 5-11, 2012.

The spider acylpolyamine Mygalin is a potent modulator of innate immune responses

Diego Gabriel Mafra^a, Pedro Ismael da Silva Jr.^b, Cynthia Soares Galhardo^a, Rafael Nassar^a, Sirlei Daffre^c, Maria N. Sato^d, Monamaris M. Borges^{a,*}

^aLaboratório de Bacteriologia, Instituto Butantan, São Paulo, Brazil

^bLaboratório Especial de Toxinologia Aplicada CAT/ Cepid, Instituto Butantan, São Paulo, Brazil

^cDepartamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

^dLaboratório de Investigação em Dermatologia e Imunodeficiência, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Instituto de Medicina Tropical, São Paulo, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 8 September 2011

Accepted 1 April 2012

Available online 7 April 2012

Keywords:

Acylpolyamine

Mygalin

Lymphocyte

Macrophage

Nitric oxide

Cytokine

Innate immunity

ABSTRACT

Mygalin is an antibacterial molecule isolated from the hemocytes of the spider *Acanthoscurria gomesiana*. It was identified as bis-acylpolyamine spermidine. We evaluated the modulator effects of synthetic Mygalin in the innate immune response. We demonstrate that Mygalin induces IFN- γ synthesis by splenocytes increasing the nitrite secretion by splenocytes and macrophages. A specific inhibitor of iNOS abrogated Mygalin-induced nitrite production in macrophages independent of IFN- γ activation. In addition, Mygalin-activated macrophages produced TNF- α but not IL-1 β , demonstrating that Mygalin does not act directly on the inflammasome. Furthermore, this compound did not affect spontaneous or Concanavalin A-induced proliferative responses by murine splenocytes and did not induce IL-5 or apoptosis of splenocytes or bone marrow-derived macrophages. These data provide evidence that Mygalin modulates the innate immune response by inducing IFN- γ and NO synthesis. The combined immune regulatory and antibacterial qualities of Mygalin should be explored as a strategy to enhance immune responses in infection.

© 2012 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Spider acylpolyamines constitute a complex class of substances. Their principal targets are insect and mammalian receptors [1]. These compounds have been explored for the design of a new therapeutic class of drugs for neurological disorders [2]; however, their roles as effector molecules in the immune system have not been characterized.

Mygalin was isolated from the hemocytes of the spider *Acanthoscurria gomesiana* and identified as bis-acylpolyamine N1,N8-bis(2,5-dihydroxybenzoyl) spermidine. Mygalin has a molecular mass of 417 Da and bactericidal activity [3].

Polyamines (putrescine, spermine, and spermidine) are structured aliphatic amines that are present in all eukaryotes. These molecules interfere with protein biosynthesis due to their positively charged groups that bind to molecules, such as RNA, DNA and negatively charged membrane proteins, thereby affecting protein synthesis, cell differentiation and growth [4,5]. These compounds also modulate intracellular signals [6,7], exert antioxidant activity through their role as scavengers of reactive oxygen species

[8] and play inflammatory or immunosuppressive roles [9,10]. The uptake and catabolism of polyamines are regulated by enzymes, while the internalization of exogenous polyamines occurs through polyamine transport systems present in the cell membrane [11]. These systems are targets for the development of new pharmacological agents [12].

Due to its anti-proliferative and anti-inflammatory effects on lymphocytes and macrophages, spermine is the best-studied polyamine [9,13]. Synthetic spermine derived from tetrahydrochloride inhibits the expression of LAF-1 (CD11a/CD18) on human lymphocytes, thereby compromising the inflammatory response, but it has no effect on monocytes [14]. The synthetic spermine BAP (1,4-bis(3-aminopropyl)-piperazine) suppresses TNF- α synthesis in LPS-activated monocytes [13] and another class of spermine derivatives (CNI-1493) inhibits LPS-induced production of IL-1, IL-6, MIP-1 α/β [9], IFN- γ and IL-12p40 in macrophages [10]. Putrescine has also been demonstrated to contribute to innate immunity by modulating the expression and activation of Toll-Like receptor 2 in intestinal epithelial cells [15]. Spermine contributes to immunity against infections by inhibiting the uptake of arginine, a substrate of iNOS, thereby suppressing the production of NO during infection with *Helicobacter pylori* [16].

The increasing number of pathogens that are becoming resistant to antibiotics has stimulated the development of new

* Corresponding author. Address: Instituto Butantan, Laboratório de Bacteriologia, Av. Vital Brazil, 1500 São Paulo, SP, Brazil. Fax: +55 1137261505.

E-mail address: monaborges@butantan.gov.br (M.M. Borges).

compounds that are used alone or with existing drugs to combat microorganisms directly [17,18] or activate the innate immune system [19].

Host defense peptides play a role in innate immune responses [20]. As both polyamine and host defense peptides are endogenous compounds with anti-infective activity [17,20], it would be interesting to determine whether Mygalin has immunomodulatory effects that could be used therapeutically.

In this study, we investigated the effect of the synthetic acyl-polyamine Mygalin as an immunomodulator of immune responses. Our results demonstrate an important proinflammatory role for Mygalin in enhancing IFN- γ , TNF- α and NO synthesis during the innate immune response, suggesting that Mygalin could serve as an immunomodulator in the control of pathogen infections.

2. Materials and methods

2.1. Synthetic Mygalin

The compound was synthesized by Dr. Pedro Ismael da Silva, Junior from the Laboratório de Toxinologia Aplicada, Instituto Butantan. The synthetic Mygalin was characterized by tandem mass spectrometry and is identical to native one [3].

2.2. Animals

Six- to eight-week-old female C57BL/6 mice were euthanized in a CO₂ chamber, and spleens, femurs and tibiae were harvested for differentiation of bone marrow-derived macrophages. The Ethical Committee of the Butantan Institute (CEUAIB) approved all animal studies.

2.3. Lymphocyte proliferation assay and cell culture

Splenocytes were prepared under aseptic conditions. Spleens were disrupted to obtain single-cell suspensions. Cell suspensions were treated with ACK lysis buffer (0.15 M NH₄Cl, 1 mM KHCO₃, 0.1 mM Na₂EDTA) to eliminate erythrocytes. After two washes, the final cell pellet was diluted in RPMI 1640 medium (Invitrogen Life Technology, Carlsbad, CA) containing 10% fetal calf serum (Invitrogen), 50 μ M 2-mercaptoethanol, 50 U/mL penicillin and 50 g/mL streptomycin. Viability was greater than 95%. To examine the effect of Mygalin on splenocytes proliferation, splenocytes at density of 2.5×10^6 cells/mL were seeded in triplicate in 96-well plates (2.5×10^5 /well, 100 μ L) (Costar, Cambridge, MA). Cells were cultured with or without Mygalin (5, 10 or 20 μ g/mL) for 2 h at 37 °C in 5% CO₂ and treated or not with 2 μ g/mL Concanavalin A, Con A (Sigma, St. Louis, MO) for 72 h. Thymidine incorporation was measured 18 h after cells were pulsed with 1 μ Ci [³H]-thymidine (GE Healthcare, Little Chalfont, UK) on day 3 of the culture. The amount of [³H]-thymidine incorporated into cells was determined using a direct beta plate scintillation counter (Wallac Oi, Turku, Finland).

To measure cytokine secretion or nitrite (NO₂⁻) production, splenocytes were seeded in 24-well plates at a density of 2.5×10^6 cells/well and cultured with or without Mygalin. Alternatively, 2 μ g/mL, Con A was added to Mygalin-stimulated cells. The supernatants of IL-2 and IL-5 were assessed after 24 or 72 h for IFN- γ and nitrite, respectively.

2.4. Macrophage cultures

Bone marrow was isolated from mouse femurs or tibiae as previously described [21]. After treatment with ACK lysis buffer, cells (7.5×10^5 cells/well) were cultivated in 24-well plates (Costar) in

RPMI-1640 containing 20% L929 cell supernatant plus non-essential amino acids (1 mM, Sigma) and 20 μ M 2-Mercaptoethanol for 7 days at 37 °C and 5% CO₂. Adherent cells were used after washing with PBS. Flow cytometry analysis demonstrated that on day 7, higher than 98% of the cells were F4/80⁺ (Invitrogen, Carlsbad, CA). For macrophage activation, cultures were incubated with Mygalin (5–40 μ g/mL) for 20 or 72 h, and secretion of cytokines or nitrite (NO₂⁻) was evaluated, respectively. Lipopolysaccharide LPS from *Escherichia coli* (100 ng/mL) was used as a positive control for stimulation.

2.5. Cytotoxicity assay

The cytotoxicity of Mygalin was assessed by MTT assay (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, Sigma) as previously described [22]. Splenocytes (2.5×10^5 cells/well) or macrophages (7.5×10^5 cells/well) were cultivated with or without Mygalin (5–40 μ g/mL) for 24 h at 37 °C in 5% CO₂. Triton X-100 (0.01%) was used as a control for cellular death, and unstimulated cells were used as a negative control. Absorbance was measured at 550 nm.

2.6. Measurement of nitric oxide

Nitric oxide (NO) production was estimated by measuring nitrite (NO₂⁻) accumulation in the culture supernatants using the Griess reaction [23]. Nitrite levels were calculated from a standard curve prepared with sodium nitrite. The absorbance of each well was determined using an ELISA microplate reader (Multiskan EX, Primary EIA) with a 550-nm filter. All reagents for the NO assay were obtained from Sigma. To determine the contribution of iNOS to NO production, cultures were pretreated with the selective iNOS inhibitor L-NIL (L-N⁶-(1-iminoethyl)-lysine) for 30 min before the addition of Mygalin (10, 20 and 40 μ g/mL).

2.7. Determination of cytokine secretion

The supernatants of splenocytes (2.5×10^6 /well) cultures were assessed by ELISA for IL-2, IFN- γ and IL-5 (BD PharMingen, Franklin Lakes NJ) secretion, and the supernatants of macrophage (7.5×10^5 /well) cultures were assessed for TNF- α and IL-1 β (eBioscience, San Diego, CA) secretion following the manufacturer's recommendations. The limits of detection of TNF- α , IFN- γ and IL-5 were 15 pg/mL and the limits of detection for IL-2 and IL-1 β were 7.5 pg/mL.

2.8. Statistics

The data were analyzed using one-way ANOVA and statistic difference between groups was identified by Tukey–Kramer multiple comparison test from Graph Pad Prism 5.0 (Graph Pad, San Diego, California). $P < 0.05$ value was considered significant. All measurements are expressed as means $\pm$ SEM.

3. Results

3.1. Effect of Mygalin on cellular viability and on the T cell proliferative response

Some polyamine analogs have strong cytotoxic effects through apoptosis induction in cancer cells [24]. We thus assessed the effect of Mygalin on the viability of murine splenocytes and macrophages using the MTT assay. Fig. 1 A and B shows that treatment with 5–40 μ g/mL (11.9–95.9 μ M) Mygalin does not interfere with the viability of splenocytes or macrophages. As expected,

treatment with the nonionic surfactant Triton X-100 resulted in 100% cellular toxicity.

As the most common effect of polyamines is inhibiting cell division [4], we investigated the effect of this acylpolyamine on the proliferation of unstimulated or Con A-treated splenocytes. We found that treatment with Mygalin in the absence of stimulation (Fig. 2A) or in the presence of Con A (Fig. 2B) did not affect cell proliferation. However, splenocytes treated only with Con A exhibited a high rate of proliferation (Fig. 2B).

These results show that Mygalin does not have cytotoxic effects or negatively regulates the polyclonal T cell proliferative response.

3.2. Mygalin stimulates IFN- γ secretion

Since Mygalin was not able to suppress the T cell proliferative response, we evaluated its effect on the secretion of type 1 (IFN- γ) and type 2 (IL-5) cytokines as well as IL-2.

The addition of Mygalin to splenocytes cultures significantly increased IFN- γ levels regardless of the polyamine concentration (Fig. 3A). Fig. 3B shows that Con A-treated cells produced high levels of IFN- γ . The addition of 10 and 20 $\mu\text{g/mL}$ of Mygalin to Con A-treated cells increased the IFN- γ secretion by 2.6-fold; however, there was no statistical significance between these groups and Con A-treated cells.

Despite the fact that splenocytes treated with Mygalin have increased IFN- γ secretion, Mygalin did not change the levels of IL-2 (Fig. 3C) or IL-5 secretion (data not shown).

This finding demonstrates that Mygalin directly stimulates splenocytes to secrete Th1, but not Th2 cytokines, and does not alter Con A-induced IFN- γ secretion.

3.3. Nitrite secretion by splenocytes upon Mygalin stimulation

Mygalin significantly enhanced IFN- γ production in splenocytes. To determine whether this compound also enhances the production of nitric oxide, a crucial mediator of microorganism killing, we assessed the presence of nitrite (NO_2^-) in splenocytes cultures stimulated with Mygalin.

Fig. 4A shows that the addition of 10 or 20 $\mu\text{g/mL}$ of Mygalin significantly increased nitrite production by splenocytes. The greatest enhancement in nitrite production was achieved with 20 $\mu\text{g/mL}$ of Mygalin, displaying a 3-fold increase in nitrite levels when compared to unstimulated cultures. Furthermore our results demonstrate that IFN- γ and nitrite levels were simultaneously increased by splenocytes upon treatment with 10 or 20 $\mu\text{g/mL}$ of Mygalin (Fig. 4B).

3.4. Mygalin stimulates NO generation by activating iNOS and induces TNF- α production by macrophages

Macrophages are the main source of nitric oxide due to their ability to activate the enzyme inducible nitric oxide synthase (iNOS). We thus investigated whether Mygalin could activate this pathway in bone marrow-derived macrophage cultures by measuring nitrite production in the presence or absence of a specific inhibitor of iNOS activity (L-NIL).

Fig. 5A shows a pronounced and significant increase in nitrite production by macrophages upon 10 or 20 $\mu\text{g/mL}$ of Mygalin stimulation for 72 h. Nitrite levels after treatment were up to 3- or 6-fold higher in acylpolyamine-stimulated cultures than in unstimulated cultures. In addition, we observed that nitrite secretion levels were higher in macrophage cultures than in splenocytes cultures (Fig. 4A).

The generation of nitric oxide depends on the activation of the enzyme iNOS, which is regulated by microbial products or cytokines. To evaluate the role of iNOS in the generation of NO, we pre-treated macrophage cultures with a specific competitive inhibitor of iNOS (L-NIL) before activating the cells with Mygalin (5–40 $\mu\text{g/mL}$). As shown in Fig. 5B, nitrite levels were reduced 100% when macrophages were pre-treated with L-NIL .

This result demonstrates the ability of Mygalin to induce NO_2^- secretion through direct activation of iNOS-independent of macrophage activation by IFN- γ .

We next investigated the synthesis of TNF- α and IL-1 β by macrophages after Mygalin stimulation, using 100 ng/mL LPS from as a positive control.

Fig. 5C shows a significant increase in TNF- α production when was used 10 or 20 $\mu\text{g/mL}$ of Mygalin. Similar to treatment with LPS, treatment with 20 $\mu\text{g/mL}$ Mygalin resulted in a 2-fold increase in TNF- α production when compared to the levels observed in unstimulated cells. In contrast, Mygalin did not induce IL-1 β secretion by macrophages.

These findings demonstrate that Mygalin is able to activate macrophages by inducing pro-inflammatory mediators including TNF- α and nitric oxide.

4. Discussion

We demonstrated in splenocyte cultures that Mygalin stimulated the synthesis of IFN- γ , a prototypical Th1 cytokine, but it did not induce production of Th2 cytokines such as IL-5, suggesting that Mygalin targets T cells. However, Mygalin did not increase IFN- γ production upon polyclonal T cell stimulation by Con A. In splenocyte cultures, Mygalin-induced IFN- γ could be produced

Fig. 1. Effect of Mygalin on cellular toxicity. Splenocytes (A) and bone marrow-derived macrophages (B) were incubated with for 72 h with Mygalin (5, 10, 20 and 40 $\mu\text{g/mL}$). Cellular viability was assessed by MTT assay. Triton X-100 detergent (0.1%) was used as a positive control for cellular death. Data are presented as mean values $\pm$ SEM from three experiments performed in triplicate.

Fig. 2. Effect of Mygalin on mitogen-induced T cell proliferation. Splenocytes (2.5×10^5 /well/100µL) were untreated or treated with Mygalin (5, 10 and 20 µg/mL) (A) or pre incubated for 2 h with Mygalin and then stimulated or not with Con A (2 µg/mL) (B), for 72 h. [³H]-TdR was added 18 h before the end of the culture period, and [³H]-TdR incorporation was measured as counts per minute (cpm). Data are expressed as mean values $\pm$ SEM of three experiments with two animals per experiment ($n = 6$).

Fig. 3. Effect of Mygalin on Th1 and Th2 cytokine secretion upon Con A stimulation. Splenocytes (2.5×10^6 /well) were untreated or treated with Mygalin (5, 10 and 20 µg/mL) (A) or pre incubated for 2 h with Mygalin and then stimulated or not with Con A (2 µg/mL) for 72 h for detection of IFN- γ (B). For IL-2 detection (C) the splenocytes were cultivated for 24 h with Mygalin (5, 10 and 20 µg/mL). Data are expressed as mean values $\pm$ SEM of three experiments with two animals per experiment ($n = 6$). *** $P < 0.001$ when compared to unstimulated cultures.

by several types of cells, including Th1 cells, CD8⁺ T cells, NKT cells, NK cells or macrophages. Furthermore, Mygalin exhibited a pronounced effect on splenocyte and macrophage NO production, implying a potential role in the defense against microorganisms. IFN- γ may enhance the innate immune response by increasing the microbicidal effect of phagocytes, in part by inducing iNOS-mediated generation of NO derived from L-arginine [25].

The production of NO is regulated by cytokines and microbial products [25,26]. Therefore, we assessed the ability of Mygalin to

activate iNOS. Inhibition of iNOS completely abrogated nitrite secretion by macrophages stimulated with Mygalin. This result demonstrates that macrophages are an important source of Mygalin-induced NO and indicates that the generation of nitrite was independent of exogenous IFN- γ , as the cells were not pre-activated with this cytokine. Nevertheless, the IFN- γ synthesis induced by Mygalin may contribute to iNOS activation.

Although Mygalin-activated macrophages produced NO and TNF- α , Mygalin did not induce the release of IL-1 β . This finding

Fig. 4. Effect of Mygalin on nitric oxide production by splenocytes. Splenocytes ($2.5 \times 10^6/\text{well}$) were cultivated with Mygalin (5, 10 and 20 $\mu\text{g/ml}$). The supernatant were collected at 72 h for the measurement of nitrite (NO_2^-) by the Griess reaction (A), and IFN- γ production (B) by ELISA. Data are expressed as mean values $\pm$ SEM of four experiments with two animals per experiment ($n = 8$) * $P < 0.05$; *** $P < 0.001$ when compared to unstimulated cultures.

Fig. 5. Contribution of iNOS activity to Mygalin-induced nitric oxide production in macrophages and TNF- α secretion. Bone marrow-derived macrophages ($7.5 \times 10^5/\text{well}$) were incubated with Mygalin (5, 10, 20 and 40 $\mu\text{g/ml}$) for 72 h (A) or treated (+) or not (-) with a specific iNOS inhibitor (L-NIL, 1 mM) for 30 min prior to Mygalin treatment (B). For TNF- α detection (C) macrophages were incubated with Mygalin (5, 10, 20 $\mu\text{g/ml}$) or LPS (100 ng/ml) from *E. coli*. The supernatants were assayed after 20 h for nitrite (NO_2^-) and TNF- α secretion. Data are expressed as mean values $\pm$ SEM of 3–4 experiments performed in duplicate. * $P < 0.05$ or ** $P < 0.01$ or *** $P < 0.001$ when compared to unstimulated cultures.

suggests that Mygalin does not directly activate inflammasome complexes, which would result in caspase-1 activation and IL-1 β secretion. The induction of IL-1 β and IL-18 seems to require two pathways. The first signal is transduced through pattern recognition receptors (e.g., TLRs) to activate the transcription of pro-IL-1 β and pro-IL-18. The second (TLR-independent) pathway is

mediated by the NLR-containing inflammasomes, which induce cleavage of cytokine precursors into active IL-1 β and IL-18 by activating caspase-1 [27]. Cellular polyamines are necessary for TLR2 expression and are implicated in the control of the innate immune system in intestinal epithelial cells [15]. Furthermore, cellular polyamines play a role in the innate immune response in the

mouse nervous system [28]. Whether polyamine analogs, such as Mygalin, activate TLRs to induce proinflammatory cytokine synthesis remains unclear.

In contrast to the immunostimulatory effects of Mygalin, several polyamine analogs inhibit immune responses [9,10,29]. Spermine inhibited the synthesis of iNOS and TNF- α in J774 cells [30] and TNF- α and nitrite synthesis in cells stimulated with LPS [9], suggesting that the suppression of TNF- α can be attributed to the nature of spermine. Small changes in the structures of polyamines can modify their effector functions, as analogs of these compounds have different degrees of inhibitory effects on cellular metabolism [31].

Inflammatory mediators can regulate the catabolism of polyamines in different ways depending on the level of enzymes induced [32], which may influence the activation of molecular signals [31].

We have shown that Mygalin is not cytotoxic to murine cells *in vitro* and does not affect cellular proliferation or IL-2 production.

In contrast, N-alkylated polyamine analogs have been shown to be cytotoxic in several human cancer cell lines [33]. This effect seems to be mediated by polyamine binding of the DNA double helix via the major groove or by elevated caspase-3 activity, increased DNA instability and ultimately DNA fragmentation [4,34].

Furthermore, some synthetic polyamine analogs of bis-naphthalimidopropyl (BNIP) putrescine, spermidine or spermine can suppress Con A- and LPS-induced proliferation of murine cells [29]. BNIP putrescine exerts a more pronounced inhibitory effect, suggesting a relationship between the degree of inhibition of proliferation and the size of the polyamine chain.

We have shown for the first time that a spider acylpolyamine activates the innate immune response through induction of Th1 cytokines and proinflammatory mediators, such as TNF- α and NO, that are essential for defense against infectious pathogens.

To better understand how the proinflammatory process is mediated by Mygalin, additional studies are necessary to determine the uptake of Mygalin and how it modulates signaling pathways. The transcription factor NFkB orchestrates inflammatory responses by upregulating the transcription of genes encoding cytokines, chemokines, adhesion molecules and inducible enzymes (e.g., iNOS, COX-2 and metalloproteases) [35,36]. Further investigation of the immunomodulatory and antimicrobial mechanisms of action of this class of molecules is warranted.

Finally, the ability of Mygalin to induce IFN- γ and NO release associated with superoxide stimulation [3] could be strategically used for the control of infection.

Furthermore, as a pro-inflammatory factor that regulates the innate immune response, Mygalin should be further explored for therapeutic use either alone or in combination with other molecules.

Acknowledgments

We thank the Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) and Instituto Butantan for financial support. C.S.G. is the recipient of a Conselho de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) Fellowship.

References

- [1] P. Escoubas, S. Diocot, G. Corzo, Structure and pharmacology of spider venom neurotoxins, *Biochimie* 82 (2000) 893–907.
- [2] G. Estrada, E. Villegas, G. Corzo, Spider venoms: a rich source of acylpolyamines and peptides as new leads for CNS drugs, *Nat. Prod. Rep.* 24 (2007) 145–161.
- [3] L.S. Pereira, P.I. Silva Jr., M.T.M. Miranda, I.C. Almeida, H. Naoki, K. Konno, S. Daffre, Structural and biological characterization of one antibacterial acylpolyamine isolated from the hemocytes of the spider *Acanthocurra gomesiana*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 352 (2007) 953–959.
- [4] K. Igarashi, K. Kashiwagi, Modulation of cellular function by polyamines, *Inter. J. Biochem. Cell Biol.* 42 (2010) 39–51.
- [5] C.V. Tabor, H. Tabor, Polyamines, *Annu. Rev. Biochem.* 53 (1984) 749–790.
- [6] L. Liu, R. Santora, J.N. Rao, X. Guo, T.T. Zou, H.F.M. Zhang, D.J. Turner, J.Y. Wang, Activation of TGF-beta-Smad signaling pathway following polyamine depletion in intestinal epithelial cells, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 285 (2003) G1056–G1067.
- [7] L. Liu, L. Li, J.N. Rao, T.T. Zou, H.F.M. Zhang, D. Boneva, M.S. Bernard, J.Y. Wang, Polyamine-modulated expression of c-myc plays a critical role in stimulation of normal intestinal epithelial cell proliferation, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 288 (2005) C89–C99.
- [8] E. Lovas, G. Carlin, Spermine: an anti-oxidant and anti-inflammatory agent, *Free Radic. Biol. Med.* 11 (1991) 455–461.
- [9] M.H. Zhang, T. Caragine, H.C. Wang, P.S. Cohen, G. Botchkina, K. Soda, M. Bianchi, P. Ulrich, A. Cerami, B. Sherry, K.J. Tracey, Spermine inhibits proinflammatory cytokine synthesis in human mononuclear cells: a counterregulatory mechanism that restrains the immune response, *J. Exp. Med.* 185 (1997) 1759–1768.
- [10] G. Hasko, D.G. Kuhel, A. Marton, Z.H. Nemeth, E.A. Deitch, C. Szabo, Spermine differentially regulates the production of interleukin-12p40 and interleukin-10 and suppresses the release of the T helper 1 cytokine interferon-gamma, *Shock* 14 (2000) 144–149.
- [11] R.A. Casero Jr., A.E. Pegg, Polyamine catabolism and disease, *Biochem. J.* 421 (2009) 323–338.
- [12] H.M. Wallace, A.V. Fraser, Polyamine analogues as anticancer drugs, *Biochem. Soc. Trans.* 31 (2003) 393–396.
- [13] M.H. Zhang, L.V. Borovikova, H.C. Wang, C. Metz, K.J. Tracey, Spermine inhibition of monocyte activation and inflammation, *Mol. Med.* 5 (1999) 595–605.
- [14] K. Soda, Y. Kano, T. Nakamura, K. Kasono, M. Kawakami, F. Konishi, Spermine, a natural polyamine, suppresses LFA-1 expression on human lymphocyte, *J. Immunol.* 175 (2005) 237–245.
- [15] J. Chen, J.N. Rao, T. Zou, L. Liu, B.S. Marasa, L. Xiao, X. Zeng, D.J. Turner, J.-Y. Wang, Polyamines are required for expression of Toll-like receptor 2 modulating intestinal epithelial barrier integrity, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 293 (2007) G568–G576.
- [16] R. Chaturvedi, M. Asim, S. Hoge, N.D. Lewis, K. Singh, D.P. Barry, T. de Sablet, M.B. Piazuelo, A.R. Sarvaria, Y. Cheng, E.I. Closs, R.A. Casero Jr., A.P. Gobert, K.T. Wilson, Polyamines impair immunity to *Helicobacter pylori* by inhibiting L-arginine uptake required for nitric oxide production, *Gastroenterology* 139 (2010) 1686–1698.
- [17] O. Heby, L. Persson, M. Rentala, Targeting the polyamine biosynthetic enzymes: a promising approach to therapy of African sleeping sickness, Chagas' disease, and leishmaniasis, *Amino Acids* 33 (2007) 359–366.
- [18] P.E. Carlson Jr., J. Horzempa1, D.M. O'Dee, C.M. Robinson, P. Neophytou, A. Alexandros Labrinidis, G.J. Nau, Global transcriptional response to spermine, a component of the intra-macrophage environment reveals regulation of Francisella gene expression through insertion sequence elements, *J. Bacteriol.* 191 (2009) 6854–6855.
- [19] B.B. Finlay, R.E.W. Hancock, Opinion – can innate immunity be enhanced to treat microbial infections?, *Nature Rev. Microbiol.* 2 (2004) 497–504.
- [20] H. Jensen, R.E. Hancock, Therapeutic potential of HDPs as immunomodulatory agents, *Methods Mol. Biol.* 618 (2010) 329–347.
- [21] G. Boltz-Nitulescu, C. Wiltshcke, C. Holzinger, A. Fellingner, O. Scheiner, A. Gessl, O. Forster, Differentiation of rat bone marrow cells into macrophages under the influence of mouse L929 cell supernatant, *J. Leuk. Biol.* 41 (1987) 83–91.
- [22] T. Mosmann, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay, *J. Immunol. Methods* 139 (1983) 55–63.
- [23] A.H. Ding, C.F. Nathan, D.J. Stuehr, Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production, *J. Immunol.* 120 (1988) 2407–2412.
- [24] R.G. Schipper, L.C. Penning, A.A.J. Verhofstad, Involvement of polyamines in apoptosis. Facts and controversies: effectors or protectors?, *Sem. Cancer Biol.* 10 (2000) 55–68.
- [25] C.J. Lowenstein, E.W. Alley, P. Raval, A.M. Snowman, S.H. Snyder, S.W. Russell, W.J. Murphy, Macrophage nitric-oxide synthase gene-2 upstream regions mediate induction by interferon-gamma and lipopolysaccharide, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 (1993) 9730–9734.
- [26] Y. Kobayashi, The regulatory role of nitric oxide in proinflammatory cytokine expression during the induction and resolution of inflammation, *J. Leuk. Biol.* 88 (2010) 1157–1162.
- [27] M.G. Netea, A. Simon, F. van de Veerdonk, B.-J. Kullberg, J.W.M. Van der Meer, L.A.B. Joosten, IL-1 beta processing in host defense: beyond the Inflammasomes, *PLoS Pathog.* (2010) 6 e1000661.
- [28] D. Soulet, S. Rivest, Polyamines play a critical role in the control of the innate immune response in the mouse central nervous system, *J. Cell Biol.* 162 (2003) 257–268.
- [29] A. Cordeiro-Da-Silva, J. Tavares, N. Araujo, F. Cerqueira, A. Tomas, P.K.T. Lin, A. Ouassii, Immunological alterations induced by polyamine derivatives on murine splenocytes and human mononuclear cells, *Int. Immunopharmacol.* 4 (2004) 547–556.
- [30] C. Szabo, G.J. Southan, E. Wood, C. Thiemermann, J.R. Vane, Inhibition by spermine of the induction of nitric-oxide synthase in J774.2 macrophages – requirement of a serum factor, *Br. J. Pharmacol.* 112 (1994) 355–356.

- [31] C. Pignatti, B. Tantini, C. Stefanelli, F. Flamigni, Signal transduction pathways linking polyamines to apoptosis, *Amino Acids* 27 (2004) 359–365.
- [32] N. Babbar, T. Murray-Stewart, R.A. Casero Jr., Inflammation and polyamine catabolism: the good, the bad and the ugly, *Biochem. Soc. Trans.* 35 (2007) 300–304.
- [33] V. Pavlov, P.K.T. Lin, V. Rodilla, Cytotoxicity, DNA binding and localization of novel bis-naphthalimidopropyl polyamine derivatives, *Chem. Biol. Interact.* 137 (2001) 15–24.
- [34] B.G. Feuerstein, L.D. Williams, H.S. Basu, L.J. Marton, Implications and concepts of polyamine-nucleic acid interactions, *J. Cell Biochem.* 46 (1991) 37–47.
- [35] S. Ghosh, M. Karin, Missing pieces in the NF-kappa B puzzle, *Cell* 109 (2002) S81–S96.
- [36] X. Li, P.E. Massa, A. Hanidu, G.W. Peet, P. Aro, A. Savitt, S. Mische, J. Li, K.B. Marcu, IKK alpha, IKK beta, and NEMO/IKK gamma are each required for the NF-kappa B-mediated inflammatory response program, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 45129–45140.