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

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 (MϕDM) 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-1β 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 MϕDM 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 (BDMϕ) 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-1β 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 $MyD88^{-}/^{-}$ BDMϕ 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.

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 denominas putrecina, 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).

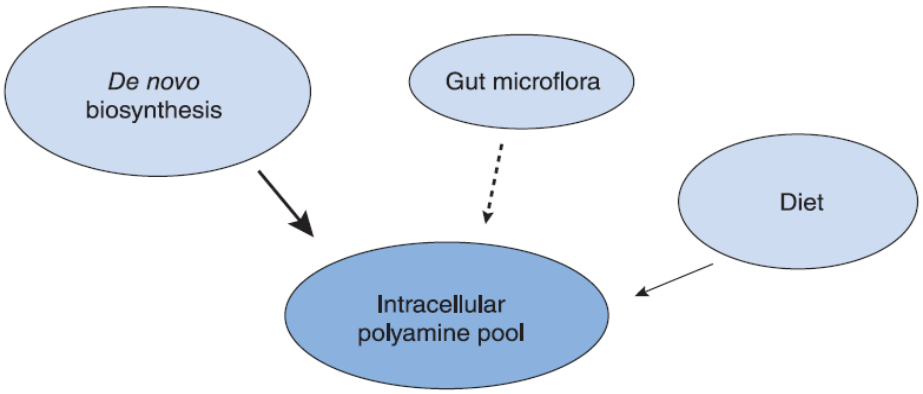

Figura 1 - Vias de obtenção das poliaminas.
Fonte: (WALLACE, 2009).

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 atráves 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).

A principal etapa de controle da via biossintética das poliaminas se dá através da ODC (**a**), onde esta é degradada pelo proteossoma 26S. Para ativar o complexo de degradação a ODC se liga a uma proteína especifica denominada antienzima (Az) (**h**) e esta ao proteossoma (HAYASHI; MURAKAMI; MATSUFUJI, 1996). A síntese de Az é estimulada pelas poliaminas, reduzindo as concentrações de ODC. Quando as concentrações das poliaminas apresentam-se diminuídas surge uma nova proteína denominada inibidor de antienzima (AzI) (**i**), que se liga a Az, ou seja, AzI inibi a ação de Az e se liga a esta com maior especificidade quando comparada a ODC, sendo assim, o complexo proteossoma passa a se ligar ao conjunto Az – AzI ao invés de Az – ODC, favorecendo a disponibilidade de ODC e potencializando a ativação da via biossintética (LO PERSSON, 2009).

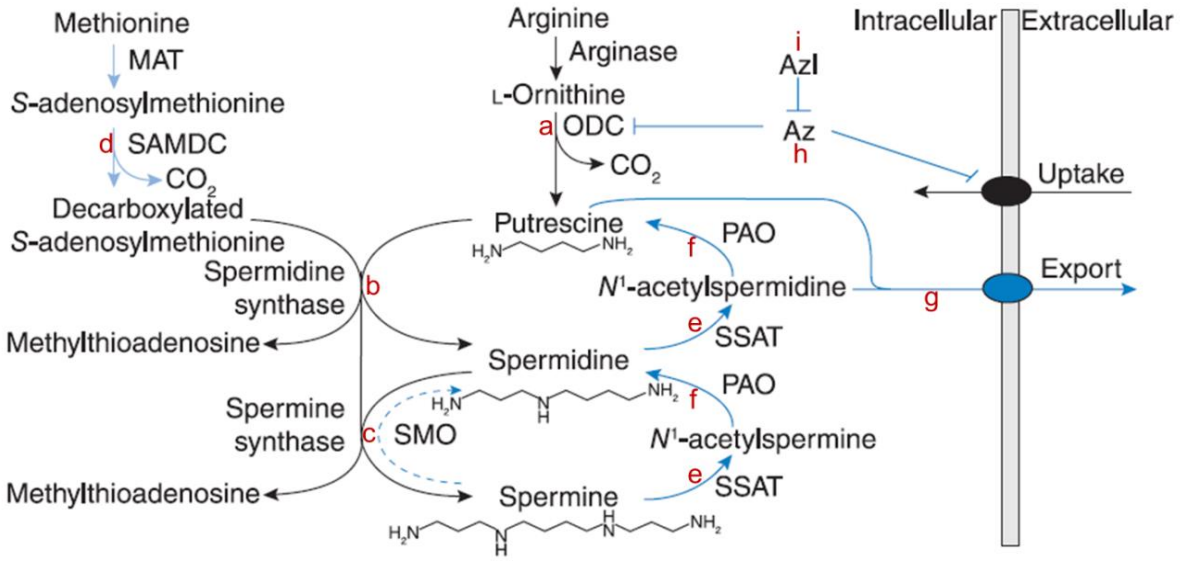

Figura 2 - Via biossintética das poliaminas.
Az, antienzima; AzI, inibidor da antienzima; MAT, metionina adenosiltransferase; PAO, poliamina oxidase; SMO, espermina oxidase.
Fonte: Modificado de Wallace (2009).

1.2.2 Captura de poliaminas do meio extracelular

Além da regulação da concentração intracelular de poliaminas pelas vias de biossíntese e efluxo, as células são equipadas com um sistema de transporte ativo que capta poliaminas do meio extracelular transportando-as para o meio intracelular (MITCHELL et al., 2007). Uma grande quantidade de poliamina é encontrada nos alimentos e as bactérias que compõem a microbiota intestinal excretam considerável

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 nucléicos (DNA, RNA, ATP), proteínas carregadas negativamente e fosfolipídios (IGARASHI; KASHIWAGI, 2010).

Putrescine

$H_3N^+(CH_2)_4N^+H_3$

Spermidine

$H_3N^+(CH_2)_4N^+H_2(CH_2)_3N^+H_3$

Spermine

$H_3N^+(CH_2)_3H_2N^+(CH_2)_4N^+H_2(CH_2)_3N^+H_3$

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 efetoras, 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 lipopolissacaridio (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)-1α/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 toxinologia 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 acido 2,5 dihidroxibenzoico (Figura 5) (PEREIRA et al., 2007).

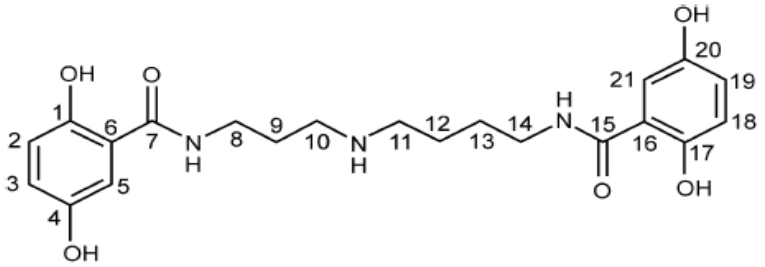

Figura 4 - Estrutura molecular da Migalina.
Fonte: (PEREIRA et al., 2007).

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 µg/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 dendriticas 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).

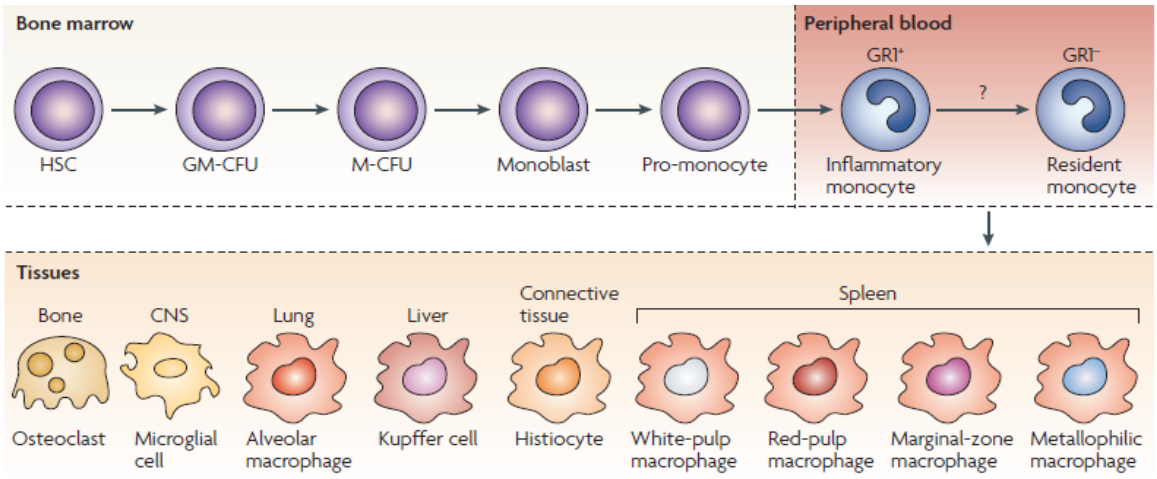

Figura 5 - Processo de maturação de macrófagos.
Na medula óssea, a partir de uma célula tronco hematopoiética comum (HSC), ocorrem várias etapas de diferenciação em resposta ao fator estimulador de colônias de macrófago, divisão e diferenciação em monoblastos, pro-monocitos e monócitos, estes saem da medula óssea e entram na corrente sanguínea. Em camundongos há evidencias 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, granulocito/ 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, peptidioglicanos 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).

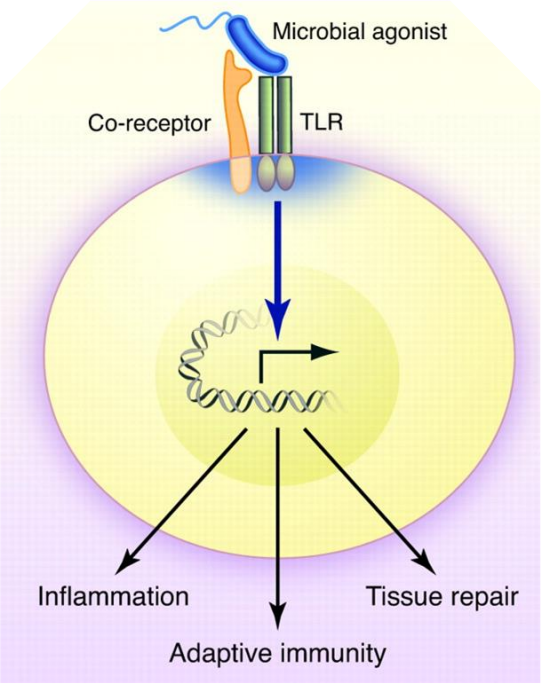

Figura 6 - Respostas ao reconhecimento de PAMPs pelos TLRs.
Fonte: Modificado de Iwasaki e Medzhitov (2010).

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 contem o dominio 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 estimulo 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, qui*nase ligada a TANK* (TBK)-1, proteina quinase ativada por mitógeno

(MAPK) e o complexo IKB quinase (IkK) levando a ativação do fator de transcrição nuclear kappa B (NF-κB) 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-κB. O TIRAP é requerido especificamente em resposta a ativação de TLR2 e TLR4 e parece regular a transcrição de NF-κB, 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 IKKε, levando a indução de IFN-β. O TRIF está associado diretamente ao TLR3, mas indiretamente ao TRL4, dependendo da intermediação de TRAM para desencadear a cascata de sinalização (AKIRA; UEMATSU; TAKEUCHI, 2006; 0'NEILL, 2006). A ativação dos fatores de transcrição resulta na produção de citocinas pró-inflamatórias dependentes de NF-κB 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).

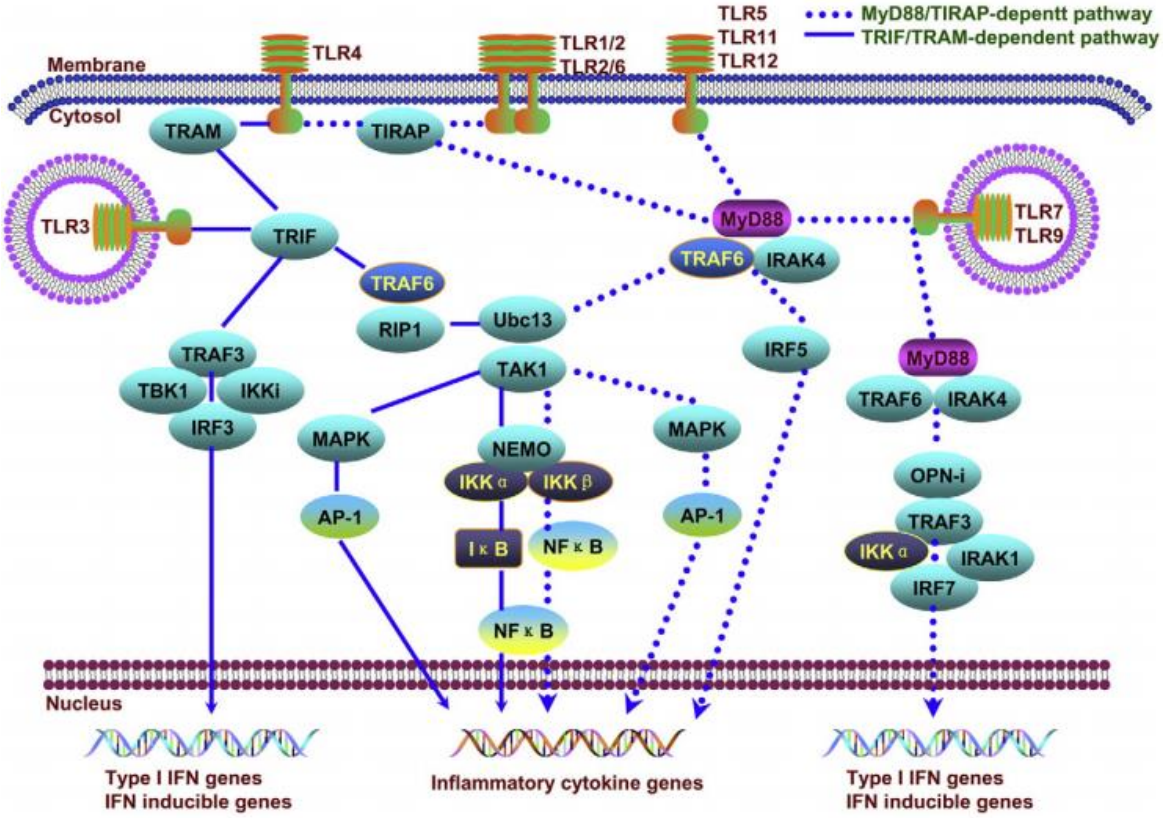

Figura 7 – Participação de MyD88 nas possíveis vias de sinalização desencadeadas pelos TLRs.
Todos os TLRs, exceto o TLR3 recruta MyD88, IRAKs e TRAF6 para ativar a via Ubc13/TAK1 pós estimulo dos receptores. O complexo TAK 1 ativa o complexo IKK composto por IKKα, IKKβ e IKKγ/NEMO, os quais induzem a fosforilação de IκB que libera NF-κB que será translocado ao núcleo. TAK1 também ativa a via MAPK e AP-1. IRF5 é recrutado pelo complexo MyD88-IRAK4-TRAF6 onde após ser fosforilado é translocado para o núcleo. NF-κB, AP-1 e IRF5 controlam a expressão de genes que codificam citocinas de perfil pró-inflamatório. TRIF é recrutado por TLR4 e TLR3 e interage com TBK1 e IKKi os quais fosforilão IRF3, este sofre dimerização e é translocado para o núcleo induzindo a expressão de IFN I e genes induzidos por IFN. TRIF interage com TRAF6 e RIP1, mediando ativação de NF-κB. TLR4, mas não TLR3 utiliza TRAM para ativação da via dependente de TRIF.
Fonte: (LIN et al., 2011).

1.5.1 Ativação de macrófagos

Após a interação dos macrófagos com microrganismos ou seus derivados, há produção de uma série de mediadores pró ou antiinflamatórios, dentre eles: Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF-α), interleceucinas (IL-1, IL-6, IL-10 e IL-12,) e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (EROs e ERNs) (GORDON, 2003; MAHIDA, 2000; MANTOVANI; SICA; LOCATI, 2007). Estes mediadores são produzidos como tentativa de eliminar o patógeno pelo hospedeiro, para manter a homeostase e

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 heterodimero 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 microbicida 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-inflmatórios 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 antitumoricida 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 potenciar 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-1β, 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.

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-1β, 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 MϕDM 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 pivital 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.; ORDIJA, 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 imune 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* lipopolisacharide (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 metabolismand 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-adapter-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.; BALAKRISHAN, 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 BID. **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 colormetric 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-1β 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.