

Saulo Fernandes Saturnino

**MASTÓCITOS, RECEPTORES TIPO TOLL E SEPSE: MANIFESTAÇÃO DE
TOLERÂNCIA INDUZIDA POR LIPOPOLISSACÁRIDES COMO MODELO PARA
O ESTUDO DE MODULAÇÃO DE RESPOSTA INFLAMATÓRIA**

Universidade Federal de Minas Gerais

2008

Saulo Fernandes Saturnino

**MASTÓCITOS, RECEPTORES TIPO TOLL E SEPSE: MANIFESTAÇÃO DE
TOLERÂNCIA INDUZIDA POR LIPOPOLISSACÁRIDES COMO MODELO PARA
O ESTUDO DE MODULAÇÃO DE RESPOSTA INFLAMATÓRIA**

**Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
graduação em Medicina da Faculdade de
Medicina da Universidade Federal de Minas
Gerais, como requisito parcial à obtenção do
título de Mestre em Medicina.**

**Orientador: Prof. Dr. Marcus Vinícius Melo de
Andrade**

**Co-orientador: Prof. Dr. José Renan da Cunha
Melo**

Universidade Federal de Minas Gerais

Faculdade de Medicina da UFMG.

Belo Horizonte

2008

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

REITOR Prof. Dr. Ronaldo Tadêu Pena

VICE-REITORA Prof. Dra. Heloísa Murgel Starling

PRÓ-REITORIA DA PÓS-GRADUAÇÃO

PRÓ-REITOR Prof. Dr. Jaime Arturo Ramírez

FACULDADE DE MEDICINA

DIRETOR Prof. Dr. Francisco José Penna

VICE-DIRETOR Prof. Dr. Tarcizo Afonso Nunes

CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO

COORDENADOR Prof. Dr. Carlos Faria Santos Amaral

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CLÍNICA MÉDICA

COLEGIADO

Coordenador - Prof. Carlos Faria Santos Amaral

Subcoordenador - Prof^a. Maria da Consolação Vieira Moreira

Prof. Antônio Carlos Martins Guedes

Prof. Marcus Vinícius de Melo Andrade

Prof. Nilton Alves de Rezende

Prof^a Suely Meireles Rezende

Elizabete Rosária de Miranda (Representante Discente)

Dedicado a
Adriana, impulso ao levantar vôo
Sul da Ilha, energia para seguir viagem
Pai e Mãe, ninho seguro para repouso estratégico
Sophia e João Pedro, asas que me permitem voar

AGRADECIMENTOS

Ao Prof Dr Marcus Vinícius Melo de Andrade, pelo companheirismo e confiança na condução dos trabalhos.

Ao Prof Dr José Renan da Cunha Melo, por ter me aberto as portas do laboratório, do qual me orgulho em ser humilde participante.

Aos colegas do Laboratório de Fisiopatologia Cirúrgica, pela convivência sincera e divertida, rara nos dias de hoje.

LISTA DE ABREVIATURAS

BMMC	<i>Bone marrow derived mast cells</i> , mastócitos derivados de medula óssea
CD14	<i>CD14 monocyte differentiation antigen</i> , antígeno CD14
c-Jun	<i>Proto-oncogene jun</i>
CpG	<i>Cytosine-phosphate diester-guanine</i>
DAMPs	<i>Damage-Associated molecular patterns</i> , padrões moleculares associados a dano celular
DNA	Ácido desoxiribonucléico
DNP-IgE	<i>2,4-dinitrophenyl-conjugated mouse IgE</i>
DNP-HAS	<i>Dinitrophenylated human serum albumin</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
FcεR1	<i>High-affinity receptor for IgE</i>
HEPES	<i>N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2'-ethanesulfonic Acid</i>
HMGB1	Proteína <i>High-Mobility Group Box 1</i>
IFN	Interferon
IgE	Imunoglobulina classe E
IL	Interleucina
IKK	<i>I kappa beta kinase</i>
IRAK	<i>IL-1R-associated kinase</i> , quinase associada ao receptor de IL1
IRF3	<i>Interferon regulatory factor 3</i> , fator regulador de interferon 3
JAK	<i>Janus kinase</i>
JNK	<i>c-Jun NH₂-terminal protein kinase</i>
KO	<i>Knock-out</i>
LPS	<i>Lipopolysaccharides</i> , lipopolissacárides
LBP	<i>LPS binding protein</i> , proteína ligadora de LPS
Mal	<i>MyD88 adaptor-like</i> , adaptador semelhante a MyD88
MD-2	<i>MD-2 protein, lymphocyte antigen 96</i>
MyD88	<i>Myeloid differentiation factor 88</i>
MyD88s	<i>Spliced myeloid differentiation Factor 88</i>
MAPK	<i>Mitogen-Activated protein kinase</i> , proteínocinases ativadas por mitógenos
MYLK	<i>Gene myosin light chain kinase</i>

NFkappaB	<i>Nuclear factor kappa beta</i> , fator nuclear kappaB
NOD	<i>Nucleotide-binding oligomerization domain</i>
PI3K	<i>Phosphoinositide 3-quinase</i>
p-38MPAK	<i>p-38 Mitogen-Activated protein kinase</i>
PAM-3-Cys	<i>Lipopeptide tripalmitoyl-S-glycerylcysteine</i>
PAMPs	<i>Pathogen-Associated molecular patterns</i> , padrões moleculares associados a patógenos
PRR	<i>Pattern recognition receptor</i> , receptor de reconhecimento padrão
RNA	Ácido ribonucléico
SIGIRR	<i>Single Immunoglobulin IL1 Receptor Related Molecule</i>
SOCS	<i>Suppressor of cytokine signaling proteins</i> , supressores da sinalização por citocinas
ST2	<i>Sulfurtransferase 2</i>
STAT1	<i>Signal transducers and activators of transcription 1</i> , transdutor de sinal e ativador de transcrição 1
TAK1	Fator transformador de crescimento, cinase ativada por (TGF) β
TRAF-6	<i>Tumor necrosis factor receptor associated factor 6</i> , fator 6 associado ao receptor de TNF citoplasmático.
TGF	<i>Transforming growth factor</i> , fator transformador de crescimento
TICAM	<i>TIR domain-containing adaptor molecule</i>
TIR	<i>Toll-interleukin 1 receptor</i>
TIRAP	<i>TIR domain-containing adaptor protein</i> , receptor de domínioToll/interleucina
Th2	Linfócito T auxiliar (<i>helper</i>) produtor de IL4, IL5, IL6 e IL10
TLR	<i>Toll-Like receptors</i> , receptores tipo Toll
TNF α	Fator de necrose tumoral alfa
TRAM	<i>TRIF-related adaptor molecule</i> , molécula adaptadora relacionada ao TRIF
TREM-1	<i>Triggering receptor expressed on myeloid cells 1</i>
TRIF	<i>TIR-domain containing adaptor inducing interferon-β</i> , proteína adaptadora contida em domínio TIR indutora de IFN β

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. EFEITO DO PRÉ-ESTÍMULO COM LPS SOBRE A PRODUÇÃO DE TNF α MEDIADA POR RECEPTORES DO TIPO TOLL – 4	47
FIGURA 2. EFEITO DO PRÉ ESTÍMULO COM LPS SOBRE A PRODUÇÃO DE IL-6 MEDIADA POR RECEPTORES DO TIPO TOLL – 4	48
FIGURA 3. EFEITO DO PRÉ ESTÍMULO COM LPS SOBRE A DESGRANULAÇÃO....	49
FIGURA 4. EFEITO DO PRÉ ESTÍMULO COM LPS SOBRE A FOSFORILAÇÃO DE p38, NFKappaB e c-JUN APÓS ESTÍMULO COM DNP-HSA, LPS E COMBINAÇÃO DE AMBOS.....	50

SUMÁRIO

1 Introdução e objetivos.....	11
2 Artigo I: Receptores tipo Toll, Novos Horizontes em Sepses.....	12
2.1 Resumo.....	12
2.2 Abstract.....	13
2.3 Introdução.....	14
2.3.1 Sepses e choque séptico.....	14
2.3.2 Epidemiologia e inovações no tratamento.....	16
2.4 Resposta imune mediada por Receptores Tipo Toll.....	16
2.4.1 Definições atuais em resposta inata.....	16
2.4.2 A descoberta dos Receptores Tipo Toll.....	17
2.4.3 A estrutura dos Receptores Tipo Toll.....	18
2.4.4 Ativação e vias de sinalização.....	19
2.5 Perspectivas abertas por estudos recentes.....	21
2.5.1 Nova visão dos fenômenos de tolerância.....	21
2.5.2 Possibilidades em modulação de respostas mediadas por Receptores Tipo Toll.....	22
2.5.2.1 IRAK-M.....	22
2.5.2.2 MyD88s.....	22
2.5.2.3 SIGIRR.....	23
2.5.2.4 ST2.....	23
2.5.2.5 SOCS.....	23
2.5.2.6 TREM-1.....	24
2.5.2.7 Peptídeos catiônicos.....	24
2.5.2.8 HMGB1.....	25
2.5.2.9 PI3K.....	26
2.5.2.10 Anticorpos antagonizadores.....	26
2.6 Polimorfismos genéticos e TLR.....	26
2.7 Considerações finais.....	27
2.8 Referências.....	28
3 Artigo II Mastócitos e tolerância a endotoxina: interação entre FcεR1 e Receptores Tipo Toll 4 como possibilidade de imunomodulação de processos inflamatórios infecciosos e alérgicos.	38

3.1	Resumo.....	38
3.2	Abstract.....	40
3.3	Introdução.....	42
3.4	Materiais e método.....	43
3.4.1	Materiais.....	43
3.4.2	Cultura de mastócitos.....	44
3.4.3	Método experimental.....	44
3.4.4	Ensaio para mensuração de citocinas.....	44
3.4.5	Mensuração da degranulação.....	44
3.4.6	Western Blotting.....	45
3.4.7	Análise estatística.....	45
3.5	Resultados.....	45
3.5.1	Mastócitos expressam tolerância a endotoxina.....	45
3.5.2	Pré-condicionamento com LPS e estímulo com agonistas FcεR1.....	46
3.5.3	O sinergismo entre FcεR1 e TLR4 na produção de TNFα e IL-6 é atenuado por pré-condicionamento com LPS.....	46
3.5.4	O sinergismo obtido pela co-estimulação é dependente de TLR4.....	47
3.5.5	O pré-condicionamento com LPS não afetou a intensidade de degranulação.....	48
3.5.6	O pré-condicionamento com LPS determinou atenuação da fosforilação de NFκappaB, c-Jun e p-38.....	49
3.6	Discussão.....	51
3.7	Conclusão.....	52
3.8	Referências.....	53
4	ANEXO I Aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (CETEA – UFMG).....	56
5	ANEXO II Abstract - Artigo de revisão publicado: Saturnino SF, Andrade MV. Toll-Like Receptors, New Horizons in Sepsis. Curr Mol Med. 2007;7:522-531.....	57
6	ANEXO III Abstract - Artigo original submetido a editora BioMed Central, periódico BMC Infectious Diseases, em revisão por pares.....	58

1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

Esta dissertação é apresentada na forma de dois artigos. Aborda o papel dos receptores tipo Toll na sepse, enfatizando as possibilidades de modulação da resposta inflamatória sistêmica consequente a infecção contidas em suas vias de sinalização. Neste contexto explora o fenômeno da tolerância em mastócitos, células em crescente valorização como essenciais na resposta inata a patógenos.

O primeiro artigo consta de revisão de literatura. Tem como objetivos esclarecer o papel dos receptores tipo Toll em sepse, apresentar sua estrutura e suas vias de sinalização e determinar, dentro destas, as possibilidades de modulação da resposta inflamatória desequilibrada e maléfica que caracteriza a sepse. Analisa o fenômeno da tolerância, visto sob a luz da sinalização por receptores tipo Toll, como uma oportunidade em se identificar estruturas moleculares envolvidas em sua regulação, identificando potenciais alvos terapêuticos.

O segundo artigo é um trabalho experimental original que ressalta a importância dos mastócitos como células de reconhecimento do sistema inato, as primeiras a entrar em contato com padrões moleculares de patógenos pela sua localização estratégica. Tem como objetivos avaliar a expressão do fenômeno de tolerância em mastócitos, tanto direta a lipopolissacárides como cruzada a antígeno, e estudar o possível papel do receptor tipo Toll 4 como mediador do fenômeno.

Este estudo foi realizado no Laboratório de Fisiopatologia Cirúrgica da Faculdade de Medicina da UFMG e contou com o apoio financeiro do National Institutes of Health (NIH) dos Estados Unidos da América (Grant TW0066121) e suporte das instituições brasileiras Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação de Apoio a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

2 Artigo I: RECEPTORES TIPO TOLL, NOVOS HORIZONTES EM SEPSE

2.1 RESUMO

Sepse e choque séptico, sua forma mais severa, têm tido aumento alarmante em sua incidência e uma alta mortalidade persistente, apesar dos avanços tecnológicos que permitem suporte vital em unidades de terapia intensiva. O progresso do conhecimento fisiopatológico tem direcionado a abordagem terapêutica, até recentemente direcionada a suporte de funções vitais e combate ao agente infeccioso, rumo às alterações provocadas por uma resposta inflamatória desequilibrada e seu efeito deletério sobre a função celular. Há cerca de 10 anos a descoberta dos receptores tipo Toll e sua definição como detectores de padrões moleculares de patógenos, envolvidos no início e modulação da resposta imune, abriram novas e excitantes possibilidades na abordagem da sepse. A elucidação de suas vias de transdução expuseram alvos terapêuticos promissores. Atualmente mecanismos associados à sinalização desencadeada pela ativação dos receptores tipo Toll são identificados no fenômeno de tolerância descrito no passado. O relato de polimorfismos genéticos associados à expressão destes receptores tem definido grupos de alto risco para desenvolvimento de resposta inflamatória desequilibrada. A compreensão do papel de estruturas moleculares envolvidas no processo e as propriedades de regulação negativa de algumas delas têm aberto oportunidades de antagonização e modulação da resposta inflamatória mediada pelos receptores tipo Toll. A compreensão de como o sistema imune reconhece patógenos e organiza a resposta inflamatória com a descoberta dos receptores tipo Toll e suas vias de sinalização nos proporcionaram possibilidades de uma abordagem mais etiológica e menos suportiva para sepse.

Palavras-chave: Receptores tipo Toll, sepse, choque séptico, tolerância, imunidade inata, padrões moleculares de patógenos, receptores de reconhecimento padrão.

2.2 ABSTRACT

Sepsis and septic shock, its more severe form, have shown alarming increases in incidence and a persistently high mortality rate, despite technological advancement allowing adequate support of vital functions in intensive care units. Progress in understanding of physiopathology has directed the therapeutic approach, until recently limited to sustaining failing organ systems and combating infectious agents, towards the alterations provoked by an unbalanced systemic inflammatory response and its deleterious effects on cellular function. Less than 10 years ago, the discovery of Toll-Like Receptor proteins, which allow the detection of pathogen molecular patterns, initiate and modulate the immune response, opened up new and exciting possibilities in approaches to sepsis. The elucidation of the transduction pathways triggered by Toll-Like Receptors activation signals exposes promising therapeutic targets. Currently, mechanisms associated within the context of Toll-Like Receptor signalization are identified in the tolerance phenomena described in the past. The description of genetic polymorphisms associated with Toll-Like Receptors, and the different patterns of response to infectious insults have defined high-risk subgroups of imbalanced immune response with greater specificity. A better understanding of the molecular structures involved in the process and the negative-regulation of some of them have opened up possibilities in antagonizing and modulating the response to the inflammatory activation mediated by Toll-Like Receptors. Having understood how the immune system recognizes pathogens and organizes the inflammatory response upon the discovery of Toll-Like Receptors and their signaling pathways, we gained an insight into the possibilities of specific treatment instead of supportive measures for sepsis.

Keywords: Toll-like receptor, sepsis, septic shock, signal transduction, immune tolerance, innate immunity, pathogen-associated molecular patterns, pattern recognition receptors.

2.3 INTRODUÇÃO

A abordagem terapêutica da sepse e choque séptico é atualmente quase que exclusivamente sintomática. O progredir do conhecimento fisiopatológico tem direcionado o tratamento, até recentemente limitado a suporte de sistemas orgânicos em falência e combate ao agente infeccioso, rumo às alterações provocadas por uma resposta inflamatória desequilibrada a infecção e seus efeitos deletérios sobre a função celular. Com o foco na resposta inadequada do sistema imune e considerando avanços em biologia molecular, novas perspectivas têm sido abertas tendo como alvo as características da resposta orgânica ao agente infeccioso. A descoberta dos receptores tipo Toll (TLRs) pavimentaram a via rumo a novas possibilidades na abordagem da sepse; evidências têm se acumulado desde então a respeito da participação dos TLRs em vários processos inflamatórios, estéreis e infecciosos, organizando a resposta inata e modulando a resposta adaptativa. Definindo a sepse como um processo determinado por uma resposta inflamatória desequilibrada a um agente infeccioso, os TLRs assumem posição estratégica, tanto como detectores do agente como orquestradores da resposta inflamatória resultante, se revelando como alvos potenciais de ações terapêuticas.

O propósito desta revisão é sumarizar os conceitos fundamentais em sepse e sinalização inflamatória por TLRs. Com esta base conceitual, mostrar estudos recentes com foco na elucidação dos papéis desempenhados pelas vias de transdução dos TLRs e seus reguladores em termos de potencial terapêutico.

2.3.1 Sepse e choque séptico

A despeito da era da microbiologia ter se iniciado no século XVII com Antonie Van Leeuwenhoek e bactérias terem sido identificadas na corrente sanguínea em 1879 por Louis Paster, somente em 1992 um consenso em definição de sepse foi atingido (1). Este intervalo de tempo pode ser parcialmente explicado pela falta de conhecimento dos processos fisiopatológicos envolvidos no desequilíbrio da resposta inflamatória que por vezes se segue a uma infecção. Adicionalmente esta condição clínica pode se apresentar após outras circunstâncias não infecciosas, associadas a liberação de sinais de alarme por células em falência, os chamados padrões moleculares associados a dano celular (DAMPs).

A variedade de definições, o fato de microorganismos na corrente sanguínea de pacientes sépticos não serem sempre detectados, e a progressão do conhecimento fisiopatológico, dentre outros fatores, levou alguns pesquisadores, entre eles Roger Bone, a estimular um consenso de definições (2,3). Sepsis foi então definida com a presença de infecção mais evidência de inflamação sistêmica; sepsis severa como sepsis mais indicação de déficit de oferta/consumo de oxigênio ou disfunção orgânica; choque séptico como sepsis acompanhada de hipotensão persistente a despeito de reposição volêmica adequada (1,4).

Todavia, a evidência de resposta inflamatória sistêmica (aumento ou queda de temperatura e leucócitos, taquicardia e taquipnéia) é inespecífica, e a despeito de ter valor no diagnóstico de sepsis e unificação de conceitos, tenta simplificar um processo extremamente complexo de desequilíbrio de resposta imune. Esta argumentação nos remete imediatamente a um pilar fundamental na compreensão da sepsis, o trabalho de Sorensen et al, que em 1988 estabeleceram um fato que poderia parecer absurdo há alguns anos antes: “ A influência imposta pela carga genética no risco de morrer por uma causa infecciosa é maior que a imposta no câncer ou em doenças cardiovasculares degenerativas”(5). Este conceito é mais compreensível atualmente, pois sabemos que a condição clínica de um paciente séptico é devida não somente ao agente etiológico ou ao sítio da infecção, mas também e principalmente às características da resposta imune do organismo.

O desenvolvimento da sepsis é extremamente complexo e pode ser atribuído a uma predominância de resposta pró-inflamatória sistêmica exacerbada a um insulto infeccioso, que pode ser seguida por, ou alternar com, períodos de predominância antiinflamatória (6). A ampla ativação de células responsivas a componentes bacterianos resulta na liberação de vários mediadores inflamatórios como citocinas, quimiocinas, prostaglandinas, óxido nítrico e radicais livres de oxigênio que podem levar a dano mitocondrial e celular por disóxia. Estes mediadores são também responsáveis por vasodilatação e liberação de moléculas de adesão que resultam em migração de neutrófilos e monócitos e ativação de linfócitos e células endoteliais (7,8). Há também a ativação da cascata de coagulação pelas citocinas e pelos próprios componentes bacterianos, que resulta em coagulação intravascular disseminada, shunts de microcirculação, hipoperfusão e piora da função celular pela hipóxia. Em conjunto, estes fatores podem levar a disfunção orgânica, iniciando a condição letal de falência orgânica múltipla associada a sepsis (2,6).

2.3.2 Epidemiologia e Inovações no Tratamento

A necessidade de novos horizontes no tratamento da sepse pode ser expressa em números: somente nos EUA a incidência aumentou de 73,4 para 175,9 por 100.000 habitantes entre 1979 e 1987; foi a causa de 9,3% de todas as mortes e respondeu por 10% de todas as admissões em terapia intensiva em 1995 (9,10). Além do alto custo do tratamento e do fato de a sepse ser a maior responsável por mortes nestas unidades, as taxas de mortalidade não tem tido redução significativa, atingido 30% para sepse grave e ultrapassando 60% para choque séptico (10,11).

Em certos subgrupos, terapias recentemente introduzidas têm mostrado alguma melhora em resultados, como controle dos níveis glicêmicos (12), utilização de proteína C ativada (13), suplementação de corticosteróides em doses baixas (14) e esforços para incorporar e padronizar condutas clínicas (15). Entretanto, tratamentos baseados em modificação da resposta imunológica direcionado a seus mediadores, tais como moléculas de adesão, TNF α , interleucina 1, radicais livres de oxigênio, metabólitos do ácido aracdônico, fator de ativação plaquetária, óxido nítrico sintetase, dentre outros, não reduziram a taxa de mortalidade e eventualmente as elevaram (16). A descoberta dos receptores tipo Toll, seu papel como detectores de patógenos, desencadeadores de sinalização inflamatória e potenciais orquestradores da resposta imune, abriu novos e excitantes caminhos rumo a tratamentos mais efetivos.

2.4 RESPOSTA IMUNE MEDIADA POR TOLL-LIKE RECEPTORS

2.4.1 Definições atuais em resposta inata

Contrariando as definições tradicionais que dividem o sistema imune em inato e adaptativo, atribuindo papéis específicos a cada um, há um crescente acúmulo de evidências atribuindo ao sistema inato um papel muito mais significativo e vital na defesa orgânica. Em contraste com o sistema adaptativo, o sistema inato tem receptores com especificidade geneticamente pré-determinadas que evoluíram por seleção natural (17). Pelo número

limitado de genes relacionados ao reconhecimento imune, a estratégia do sistema inato é o foco em estruturas presentes em grandes grupos de microorganismos. Estas estruturas são chamadas padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e os receptores envolvidos em seu reconhecimento são receptores de reconhecimento padrão (PRRs). Os receptores do sistema inato estão presentes em vários tipos celulares e quando um PAMP é reconhecido funções celulares são imediatamente ativadas.

Funcionalmente podem ser divididos em secretores, endocíticos e sinalizadores. PRR sinalizadores reconhecem PAMPs e ativam vias de transdução de sinais que induzem a expressão de uma variedade de genes envolvidos na resposta imune, incluindo os determinantes da produção de citocinas, seja via ativação de NF-kappaB ou via MAP-kinases (JNK, p-38, ERK). Os recentemente identificados receptores da família Toll parecem ter papel principal na indução da resposta inflamatória e organização da resposta adaptativa; é razoável supor que estes mecanismos de controle possam conter a base fisiopatológica para uma gama de patologias, incluindo desordens auto-imunes, alérgicas ou infecciosas (18).

Os mecanismos moleculares de interação entre TLRs e outros PRRs do sistema inato estão começando a emergir, envolvendo principalmente os receptores NOD (nucleotide-binding oligomerization domain). Estes receptores intracelulares exercem um papel importante tanto em reconhecimento de componentes bacterianos e sinais de alarme endógenos, como HMGB1 (high-mobility group box 1). Uma função na homeostase imunológica tem sido atribuída a interação entre os receptores Toll e NOD (19,20).

2.4.2 A Descoberta dos Toll-Like Receptors

A oportunidade de identificar os receptores de patógenos do sistema inato veio de uma mutação em camundongos que aboliu a resposta a endotoxinas. Em 1965 determinou-se que camundongos C3H/HeJ eram incapazes de responder a lipopolissacárides (21). Esta deficiência foi atribuída a um locus (*lps*). Uma série de tentativas foram iniciadas para identificar a proteína afetada por estas mutações e para esclarecer a via de sinalização ativada pela endotoxina. O grande progresso no conhecimento dos mediadores da resposta a LPS, especialmente TNF α , levou não somente a um grande conhecimento da via propriamente dita, mas também às características prováveis do receptor que iniciaria sua produção. A compreensão da resposta inata ao LPS teve grande avanço com a descoberta da proteína LBP

(LPS binding protein) e do CD14. Todavia, dada a ausência de domínio citoplasmático, CD14 não poderia transduzir sinais e levar a expressão gênica e produção de mediadores como TNF α . Este receptor deveria ser a proteína produzida pelo locus *lps* (22-24). Quase que concomitante a estes últimos fatos, estudos genéticos em *Drosophila melanogaster* levaram a descoberta de um gene que codifica um receptor transmembrana, Toll, e parecia vital a polarização dorso-ventral embrionária. Este receptor poderia levar à ativação de fatores de transcrição semelhantes a NF-kappaB, um dos mais importantes fatores de transcrição em mamíferos para a produção de citocinas pró-inflamatórias; mais tarde o envolvimento do receptor Toll na resposta a infecção fúngica nestas moscas foi demonstrado (25,26). Em 1998 TLR4 foi identificado como o receptor de LPS necessário a uma resposta imune efetiva a bactérias gram negativas em camundongos (27). Progressivamente os mecanismos de sinalização via TLR4 foram clarificados e os papéis desempenhados por LBP, CD14 e principalmente pela glicoproteína MD-2 descritos. Esta última age como um receptor extracelular adaptador na ativação de TLR4 por LPS e é essencial a sinalização (28). Visintin *et al* demonstrou que LPS realmente se liga a MD-2 que por sua vez se associa a TLR4 via domínio extracelular, desta forma induzindo agregação e transdução de sinais (29). Um estudo recente sugeriu que a região Glu24Lys47 é o sítio de ligação de MD-2 e que Cys29 e Cys40 dentro desta região são resíduos críticos para ligação de MD-2 e sinalização induzida por LPS (30).

Dez subtipos de TLRs foram identificados até recentemente com função determinada em humanos. A hipótese de que cada TLR poderia detectar um grupo distinto de moléculas microbianas de forma que, coletivamente, eles seriam capazes de reconhecer a maioria, senão todos os patógenos, têm ganhado força através de estudos recentes (31).

2.4.3 Estrutura dos Toll-Like Receptors

Todos os componentes do grupo TLR são proteínas transmembrana que contém um domínio extracelular composto de 550-950 aminoácidos incluindo 18-31 repetições ricas em leucina, além de um domínio citoplasmático com aproximadamente 200 aminoácidos que são responsáveis por iniciar a resposta celular logo que o domínio extracelular reconhece seu ligante (32). O receptor de IL-1 foi a primeira molécula descrita em mamíferos como tendo semelhança significativa do ponto de vista estrutural com a proteína Toll da *Drosophila*

melanogaster (33). Dada a homologia dos genes que codificam o anteriormente chamado receptor Toll/IL-1(TIR) e os genes Toll da *Drosophila* o nome receptor tipo Toll (Toll-Like Receptor) foi cunhado (33-36).

TLRs são membros da superfamília do receptor de interleucina 1 que mostram grande semelhança em sua região citoplasmática, conhecida como domínio Toll/IL-1 R (TIR). Além disto, sinalizam através de uma via compartilhada que inclui a proteína de diferenciação mielóide 88 (MyD88) como adaptadora, bem como proteínocinases associadas ao receptor de IL-1 (IRAKs) e o fator 6 associado ao receptor de TNF (TRAF-6). Esta associação MyD88-IRAK-TRAF6 pode ativar o fator transformador de crescimento (TGF) β -ativado proteínocinase 1 (TAK1), que por sua vez leva a ativação de IkappaBquinase (IKK), seguido de degradação de IkappaB e consequente liberação de NFkappaB. Aparentemente a ativação de TAK-1 também resulta em ativação de proteínocinases ativadas por mitógenos (MAPKs) (37).

TLR4 foi o primeiro receptor da família a ser identificado como reconhecedor de lipopolissacárides e serviu de esteio no estudo das interações entre o sistema inato e os componentes bacterianos (27,36). A incapacidade de um determinado animal em reconhecer LPS aumenta a possibilidade de invasão por bactérias gram negativas e morte do organismo (38-41). Por outro lado, uma resposta exuberante ao LPS resulta em liberação excessiva de mediadores inflamatórios responsáveis pelas alterações observadas em sepse (39). Subsequentemente foi estabelecido que cada TLR exerce papel fundamental no reconhecimento de componentes microbianos derivados de patógenos, incluindo fungos, bactérias, parasitas e vírus.

2.4.4 Ativação e vias de sinalização

Em uma revisão recente, Takeda e Akira descrevem a via de sinalização por Toll-Like Receptors (42). Resumidamente, o reconhecimento de componentes microbianos pelo domínio extracelular leva a sua dimerização, que por sua vez ativa as vias de sinalização do domínio citoplasmático. Logo abaixo, uma molécula adaptadora, MyD88, foi a primeira a se mostrar essencial para indução de produção de citocinas como TNF α e IL-12 (45-48). Todavia, ativação de TLR específicos leva a pequenas diferenças no perfil de expressão gênica (49-51). Além de MyD88, há outras três moléculas adaptadoras descritas: proteína

associada à TIR/adaptador semelhante a MyD88 (Mal), proteína adaptadora contida em domínio TIR indutora de IFN β (TRIF)/molécula 1 contida no domínio TIR (TICAM1) e molécula adaptadora relacionada ao TRIF (TRAM). As respostas diferenciadas mediadas por ligantes específicos de TLR podem ser explicadas parcialmente pelo uso seletivo destas moléculas adaptadoras. Na via que utiliza MyD88, há associação entre MyD88 e domínio TIR do TLR; quando estimulado, MyD88 recruta IRAK4 e facilita a fosforilação de IRAK1. A forma ativada de IRAK1 se associa a TRAF6, resultando em duas rotas distintas de sinalização. Uma leva a ativação dos fatores de transcrição AP1 através da ativação de MAPK, e a outra ativa o complexo TAK1/TAB que potencia a atividade do complexo IKK, que quando ativado induz a fosforilação e degradação subsequente de I κ B que resulta em translocação nuclear de NF κ B (42). A procura de moléculas estruturalmente relacionadas levou a identificação de um segundo adaptador, TIRAP/Mal (52,53), que se provou essencial à sinalização dependente de MyD88 via TLR2 e TLR4 (54,55), mas não via TLR3, TLR5, TLR7 e TLR9.

Nos macrófagos deficientes de MyD88 a produção de citocinas inflamatórias não é observada após estimulação via TLR4, mas há uma ativação retardada de NF κ B (46). Isto indica que há uma rota na sinalização por TLR4 que é independente de MyD88. Subsequentemente, ativação do fator de transcrição IRF3 e a fase tardia de ativação NF κ B independente de MyD88 após estímulo TLR4 foi demonstrada (56). Ativação IRF3 induzida por TLR4 leva a produção de IFN β , que por sua vez ativa STAT1 e genes induzíveis por interferon (49-51). Infecções virais ou RNA de dupla hélice ativam IRF3, induzindo produção de IFN β não dependente de MyD88, mostrando que ativação TLR3 usa uma via independente de MyD88 para produzir IFN β (57). Adicionalmente um terceiro adaptador foi identificado, TRIF/TICAM1 (58,59,60), essencial a respostas TLR3 e TLR4 independentes de MyD88 (61,62). Posteriormente um quarto adaptador TRAM/TICAM2 foi descrito, vital para resposta TLR4 independente de MyD88, mas não a resposta TLR3 (63-66).

Após o LPS ter sido identificado como o principal agonista TLR4, outros padrões moleculares de patógenos foram definidos como agonistas de outros TLRs: ácido lipoteicoico e peptidoglicano de TLR2, dimerizados com TLR1 ou TLR6 (67,68), RNA viral de dupla hélice de TLR3 (69), flagelina de TLR5 (70), CpG de DNA bacteriano de TLR9 (71), compostos imidazólicos e RNA viral de hélice simples com TLR7 e TLR8 (72-74), dentre outros.

2.5 PERSPECTIVAS ABERTAS POR ESTUDOS RECENTES

A elucidação das vias de transdução ativadas por TLR, bem como a descoberta de novas moléculas envolvidas na regulação da consequente resposta inflamatória, tem exposto mecanismos promissores para abordagem da sepse. Atualmente mecanismos associados ao contexto da sinalização por TLR são vistos no fenômeno de tolerância descrito no passado. Uma melhor compreensão das estruturas moleculares envolvidas no processo e a regulação negativa de algumas delas abriram possibilidades de antagonizar e modular a resposta inflamatória desencadeada pelos TLRs. A descrição de polimorfismos genéticos associados aos TLRs, e os padrões distintos de resposta aos insultos infecciosos tem conseguido definir subgrupos de alto risco para resposta inflamatória desequilibrada com grande precisão.

2.5.1 Nova Visão do Fenômeno da Tolerância

Há quase 60 anos uma resposta modificada ao contato com certos agentes microbianos foi obtida por exposição prévia (75). Posteriormente este fenômeno foi chamado tolerância a endotoxina e caracterizado por uma produção reduzida de citocinas pró-inflamatórias a um segundo estímulo. A análise deste fenômeno sob a luz da sinalização por TLRs e interação entre respostas inata e adquirida mostrou possibilidades em explorar seu potencial terapêutico em sepse, isquemia, alergia e desordens auto-imunes. Com relação específica aos insultos infecciosos, tem sido demonstrado que a estimulação de macrófagos peritoneais de camundongos por LPS resulta em ativação reduzida de TLR4 (76); posteriormente o envolvimento de atenuação da ativação de IRAK-1 após estimulação com PAM-3-Cys foi descrita (77). Recentemente, ST2, um receptor da família dos receptores de interleucina 1 que não ativa NFkappaB e é possivelmente um importante efetor em respostas Th-2, foi envolvido na regulação negativa de TLR4 e conseqüentemente com tolerância a endotoxina (78). Pré-estimulação por agonistas TLR2 tem sido sugerida como mecanismo protetor em modelos de peritonite nos quais a redução da produção de citocinas dependentes ou não de MyD88, redução de mortalidade e regulação positiva de ST2 foi demonstrada (79). Evidências atuais

mostram que proteínas envolvidas no braço intracelular da via de sinalização dos TLRs podem mediar o fenômeno de tolerância, como discutido adiante.

2.5.2 Possibilidades na Modulação de Respostas Mediadas por TLRs

Paralelamente ao crescente entendimento das vias de sinalização dos TLRs, as moléculas que os regulam negativamente tem sido identificadas e podem ser divididas em três grupos principais relacionados a via de sinalização: reguladores intracelulares, transmembrana e solúveis. Adicionalmente outras substâncias com propriedades imunomodulatórias merecem investigação no que diz respeito ao seu mecanismo de ação. Tentativas de modular TLR2 e TLR4 em modelos animais de sepse tem resultado em melhora da mortalidade (80). Como o sistema imune necessita obter um equilíbrio para evitar resposta inapropriada, compreender a regulação da sinalização dos TLRs obviamente constitui um avanço significativo na pesquisa por intervenções terapêuticas.

2.5.2.1 IRAK-M

IRAK-M é um membro da família IRAK induzido por estimulação dos TLRs mas deficiente em atividade como proteínquinase (81). Kobaiashy *et al* demonstraram que, *in vitro*, macrófagos de camundongos deficientes em IRAK-M produziram níveis aumentados de citocinas pró-inflamatórias em resposta a ligantes TLR4 e TLR9. *In vivo*, camundongos deficientes em IRAK-M desafiados com a mesma carga bacteriana mostraram resposta inflamatória mais exuberante comparados com *wild-type*. De fato, uma resposta inflamatória aumentada e não uma maior susceptibilidade a infecção foram atribuídas a deficiência de IRAK-M. Adicionalmente a tolerância a LPS foi reduzida de forma transitória, mas significativa, em camundongos deficientes em IRAK-M (82).

2.5.2.2 Variante de MyD88 (MyD88s).

MyD88s não tem o domínio intermediário que leva a ativação de NFkappaB induzida por LPS através da inibição da fosforilação de IRAK-1 pela IRAK-4 (83). A expressão aumentada de MyD88s inibe a ativação de NFkappaB induzida por IL-1 e LPS mas não por TNF (84). Como MyD88 é o principal adaptador na sinalização por TLR, utilizado por TLR2,

TLR4, TLR5, TLR7, TLR8 e TLR9, torna-se alvo potencial na modulação da expressão de todos estes receptores e, portanto, em patologias relacionadas a seus ligantes específicos.

2.5.2.3 SIGIRR (Single Immunoglobulin IL1 Receptor Related Molecule)

São proteínas ligadas a membrana, envolvidas na regulação negativa da sinalização por TLR (85). Expressão aumentada de SIGIRR por células dendríticas inibem a ativação de NFkappaB mediadas por IL-1 e IL-18. *In vivo*, camundongos deficientes em SIGIRR têm susceptibilidade aumentada a choque por endotoxina (86).

2.5.2.4 ST2

ST2 é um receptor que se apresenta em duas formas principais: ST2L, uma proteína transmembrana tipo I, como mencionado antes; sST2, a forma solúvel. ST2L regula negativamente a ativação de NFkappaB em resposta a estimulação por IL-1 ou LPS. Macrófagos de camundongos deficientes em ST2 produzem mais citocinas pró-inflamatórias e tem sido sugerido que ST2L poderia agir diretamente na via dependente de MyD88, pela ausência de alterações em resposta a agonistas TLR3 (78). sST2 é também um regulador negativo da inflamação e sua expressão é acentuada por citocinas pró-inflamatórias e LPS (87,88). sST2 se liga a macrófagos através de um receptor ST2, cuja expressão é aumentada por LPS. *In vivo*, tratamento de camundongos com sST2 atenuou choque séptico (89).

2.5.2.5 SOCS (Supressores da sinalização por citocinas)

A família de proteínas SOCS é de particular interesse, uma vez que seus membros sofrem indução por citocinas e regulam negativamente suas vias de sinalização (90). Os estimuladores dos TLRs podem induzir a expressão de SOCS1 em macrófagos (91,92). Camundongos deficientes em SOCS1 são mais sensíveis ao LPS em termos de indução de choque e não expressam completamente o fenômeno de tolerância (93,94). SOCS1 não só regula negativamente a via JAK/STAT mas também TLR-NFkappaB. Fortemente induzida por IL-6 e IL-10 na presença de LPS, SOCS3 inibe seletivamente a sinalização por IL-6 (95). Evidências recentes têm envolvido a degradação de Mal na regulação negativa de sinalização de TLR por SOCS1 (96).

2.5.2.6 TREM-1(Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells).

TREM-1 é uma molécula recentemente identificada envolvida na ativação de monócitos que tem uma ação sinérgica com TLR, amplificando a resposta inflamatória desencadeada por componentes bacterianos. A modulação da via de sinalização através de peptídeos sintéticos derivados do domínio extracelular tem sido proposta, com resultados interessantes em modelos experimentais de sepse (97). Estes peptídeos inibem o reconhecimento TREM-1 e protegem camundongos da morte por endotoxina. Em ratos sépticos, a modulação de TREM-1 pelos peptídeos melhorou o estado hemodinâmico, atenuou o desenvolvimento de acidose láctica, modulou a produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF α e IL-1 e reduziu a mortalidade (98). Por outro lado, evidências do papel essencial de TREM-1 na resposta a infecção foram recentemente demonstradas por Gibot, expondo promessa terapêutica e risco potencial em sua modulação. *In vivo*, a utilização de técnicas silenciadoras de RNA direcionadas a TREM-1 em modelos de peritonite fecal resultou em uma resposta inflamatória atenuada e aumento da mortalidade. Em contraste, camundongos silenciados para TREM-1 foram altamente resistentes a uma carga de endotoxina letal, enquanto que camundongos parcialmente silenciados no modelo de peritonite bacteriana tiveram um benefício significativo em sobrevivência (99).

2.5.2.7 Peptídeos catiônicos

Estas são moléculas importantes na defesa orgânica contra patógenos, demonstrando uma ampla propriedade de funções imunomodulatórias (100). LL-37 é um peptídeo helicoidal e o único peptídeo derivado de catelicidina com propriedades antimicrobianas encontrado em humanos. A modulação da resposta inflamatória mediada por TLR pelo peptídeo endógeno humano LL-37 tem mostrado efeito protetor contra endotoxemia e sepse em modelos animais quando administrado logo após a endotoxina (101). Esta ação é provavelmente devida a inibição da expressão de genes que codificam mediadores pró-inflamatórios na presença de LPS. Translocação nuclear de subunidades p50 e p65 de NFkappaB, em células pré-tratadas com LPS, foi reduzida na presença de LL-37, sugerindo que o peptídeo altera a expressão gênica em parte por agir na via TLR-NFkappaB. Em contraste, LL-37 não inibiu de forma significativa genes induzidos por LPS que antagonizam a inflamação (102). Estas propriedades talvez exerçam um papel na obtenção de uma resposta inflamatória mais

equilibrada em resposta a infecção e podem ser responsáveis pelo efeito protetor observado. Adicionalmente, sequências específicas de DNA tem sido descritas com a propriedade de inibir ativação de TLR9 por oligodeoxinucleotídeos em modelos de camundongos e células humanas, resultando em uma menor produção de citocinas (103). Peptídeos sintéticos que podem interagir com TLR4 e inibir a ativação de NFkappaB induzida por LPS e a liberação de IL-1, IL-6 e TNF por monócitos também foram relatados (104).

2.5.2.8 HMGB1 (High Mobility Group Box Chromosomal Protein 1)

Esta proteína intranuclear, previamente conhecida somente como um fator de transcrição nuclear, foi recentemente identificada como um mediador pró-inflamatório potente quando presente no meio extracelular. Representa também um sinal endógeno liberado por células necróticas que induz inflamação. Quando ativamente secretado por macrófagos ou monócitos, HMGB1 também age como citocina por sinalizar via TLR, dentre outros; a administração de antagonistas HMGB1 tem efeitos benéficos em modelos de sepse em camundongos (105). HMGB1 não é detectável no soro de pessoas saudáveis, enquanto seu nível em pacientes sépticos não é somente elevado mas se correlaciona com mortalidade (106). Há evidências de que, em choque hemorrágico, os níveis de HMGB1 séricos aumentam significativamente dentro das primeiras 24 horas do início e retornam ao nível basal assim que a condição clínica melhora (107). Em conjunto, estas evidências sugerem um papel fundamental de HMGB1 e sua interação com TLR, NOD-like receptors e outros não só na resposta a padrões moleculares de patógenos como também em mediar resposta inflamatória devida a sinais de dano endógeno. Sobre a mesma base teórica, a interação entre HMGB1 e TLR4 tem se mostrado um alvo promissor em modelos de isquemia/reperfusão (108). Wang e colaboradores observaram uma melhora significativa na mortalidade após uma dose letal de LPS com a administração de anticorpos anti-HMGB1, atingindo 70% de sobrevivência em camundongos tratados contra 0% em controles (106).

2.5.2.9 PI3K (Phosphoinositol-3-kinase)

Um número crescente de evidências sugere que a via PI3K B (akt) exerça um papel importante como regulador negativo de resposta inata excessiva pela produção pró-inflamatória mediada por TLR. Zhang *et al* demonstraram recentemente que ácido α lipoico

tem um efeito benéfico por atenuar a resposta inflamatória induzida por LPS e melhora a mortalidade em camundongos endotoxêmicos, por ativar a via PI3K/akt (109).

2.5.2.10 Anticorpos Antagonizadores

Anticorpos antagonizadores têm sido utilizados para inibir a expressão de TLR e ativação imune consequente. Meng, em modelo de choque séptico, sugere uma função terapêutica de anticorpos monoclonais em toxemia mediada por TLR2. A reversibilidade deste bloqueio pode ser importante para recuperação da responsividade celular dependente de TLR2, que é relevante dada a fisiopatologia da sepse (110).

Em resumo, mecanismos constitutivos envolvidos na sinalização por TLR e sua regulação negativa tem sido progressivamente esclarecidos através de modelos que utilizam animais geneticamente modificados e técnicas silenciadoras de RNA. O papel dos TLRs e sua interação com NOD-like receptors em reconhecer sinais de dano endógenos emitidos por células em falência, como em trauma e isquemia, aumentam a relevância da sua modulação a condições não-infecciosas. A interação com amplificadores em ambas condições, como TREM-1 e HMGB1, atualmente integrados ao contexto da sinalização por TLR, expõem oportunidades em intervenção como demonstrado em resultados experimentais. Embora estes resultados iniciais em roedores consistentemente demonstrem benefícios, o desenvolvimento de experimentos em outros modelos animais devem preceder o início de estudos em humanos.

2.6 POLIMORFISMOS GENÉTICOS E TLR

A identificação de subgrupos com risco aumentado e pior prognóstico em insultos infecciosos, a possibilidade de melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na indução de resposta inflamatória induzida por TLR e o potencial de identificação de novos alvos terapêuticos fazem dos estudos de polimorfismos genéticos associados aos TLR um assunto de grande interesse. Em sepse por *Cândida*, TLR4 Asp299/ThrIle determinam maior susceptibilidade provavelmente por uma maior produção de IL-10 (111). TLR4+896 está relacionado a um maior risco de sepse severa após queimaduras (112). Outro exemplo é a alta prevalência de hemoculturas positivas e sepse relacionadas a polimorfismos em TLR2 (T-16933 A) (113). Adicionalmente um polimorfismo A para G na posição 896 do gene TLR4

resulta em uma resposta deficiente a endotoxina (114). Embora esta e outras evidências sugiram que diferenças na expressão dos TLR afetem a susceptibilidade e prognóstico em sepse, uma revisão sistemática recente aponta a necessidade de melhora na qualidade nos estudos de associação genética para a identificação dos fatores associados a sepse (115).

2.7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Uma vez compreendido como o sistema imune reconhece patógenos e organiza a resposta inflamatória via sinalização por TLR, seremos capazes de vislumbrar possibilidades de tratamento específico ao invés de medidas suportivas para sepse. Distante da intenção de esgotar o assunto, mostramos somente algumas das inúmeras possibilidades advindas do progresso do conhecimento fisiopatológico destes distúrbios. Atualmente testemunhamos uma convergência de idéias focadas nos mecanismos através dos quais os TLRs determinam as características da defesa orgânica e o afetam o perfil da resposta inflamatória. Obviamente o número de possibilidades está se expandindo rapidamente, em paralelo com a crescente compreensão dos mecanismos de sinalização intrínseca desencadeado pelo reconhecimento de patógenos. Sem dúvida, um enorme avanço qualitativo tem sido atingido em um curto período de tempo, considerando a evolução histórica do nosso conhecimento sobre sepse. Em um futuro próximo poderemos ter opções de tratamento centrados em etiologia disponíveis para desordens envolvendo resposta imune desequilibrada, sejam de ordem infecciosa ou não.

2.8 REFERÊNCIAS

- [1] American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference: definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Crit Care Med* 1992;20:864-74.
- [2] Bone RC. The pathogenesis of sepsis. *Ann Intern Med* 1991;115:457-69.
- [3] Bone RC. Why new definitions of sepsis and organ failure are needed. *Am J Med* 1993;95:348-50.
- [4] Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, Cohen J, Opal SM, Vincent JL, Ramsay G. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Crit Care Med* 2003;31:1250-6.
- [5] Sorensen TI, Nielsen GG, Andersen PK, Teasdale TW. Genetic and environmental influences on premature death in adult adoptees. *N Engl J Med* 1988;318:727-32.
- [6] Osuchowski MF, Welch K, Siddiqui J, Remick DG. Circulating cytokine/inhibitor profiles reshape the understanding of the SIRS/CARS continuum in sepsis and predict mortality. *J Immunol* 2006;177:1967-74.
- [7] van der Poll T, van Deventer SJ. Cytokines and anticytokines in the pathogenesis of sepsis. *Infect Dis Clin North Am* 1999;13:413-26.
- [8] Karima R, Matsumoto S, Higashi H, Matsushima K. The molecular pathogenesis of endotoxic shock and organ failure. *Mol Med Today* 1999;5:123-32.
- [9] Martin GS, Mannino DM, Eaton S, Moss M. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med* 2003;348:1546-54.
- [10] Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med* 2001;29:1303-10.
- [11] Annane D, Aegerter P, Jars-Guinestre MC, Guidet B, CUB-Réa Network. Current epidemiology of septic shock: the CUB-Réa Network. *Am J Respir Crit Care Med* 2003;168:165-72.
- [12] Van den Berghe G, Wilmer A, Hermans G, Meersseman W, Wouters PJ, Milants I, Van Wijngaerden E, Bobbaers H, Bouillon R. Intensive insulin therapy in the medical ICU. *N Engl J Med* 2006;354:449-61.
- [13] Bernard GR, Vincent JL, Laterre PF, LaRosa SP, Dhainaut JF, Lopez-Rodriguez A, Steingrub JS, Garber GE, Helterbrand JD, Ely EW, Fisher CJr, Recombinant human protein

- C Worldwide Evaluation in Severe Sepsis (PROWESS) study group. Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis. *N Engl J Med* 2001;344:699-709.
- [14] Annane D, Sebille V, Charpentier C, Bollaert PE, Francois B, Korach JM, Capellier G, Cohen Y, Azoulay E, Troche G, Chaumet-Riffaut P, Bellissant E. Effect of treatment with low doses of hydrocortisone and fludrocortisone on mortality in patients with septic shock. *JAMA* 2002;288:862-71.
- [15] Slade E, Tamber PS, Vincent JL. The Surviving Sepsis Campaign: raising awareness to reduce mortality. *Crit Care* 2003;7:1-2.
- [16] Marshall JC. Such stuff as dreams are made on: mediator-directed therapy in sepsis. *Nat Rev Drug Discov* 2003;2:391-405.
- [17] Delves PJ, Roitt IM. The immune system. First of two parts. *N Engl J Med* 2000;343:37-49.
- [18] Medzhitov R, Janeway C.Jr. Innate immunity. *N Engl J Med* 2000;343:338-44.
- [19] Tada H, Aiba S, Shibata K, Ohteki T, Takada H. Synergistic effect of Nod1 and Nod2 agonists with toll-like receptor agonists on human dendritic cells to generate interleukin-12 and T helper type 1 cells. *Infect Immun* 2005;73:7967-76.
- [20] Zedler S, Faist E. The impact of endogenous triggers on trauma-associated inflammation. *Curr Opin Crit Care* 2006;12:595-601.
- [21] Heppner G, Weiss DW. High Susceptibility of Strain A Mice to Endotoxin and Endotoxin-Red Blood Cell Mixtures. *J Bacteriol* 1965;90:696-703.
- [22] Tobias PS, Soldau K, Ulevitch RJ. Isolation of a lipopolysaccharide-binding acute phase reactant from rabbit serum. *J Exp Med* 1986;164:777-93.
- [23] Wright SD, Ramos RA, Tobias PS, Ulevitch RJ, Mathison JC. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science* 1990;249:1431-3.
- [24] Beutler, B. Toll-like receptors: how they work and what they do. *Curr Opin Hematol* 2002;9:2-10.
- [25] Anderson KV, Bokla L, Nusslein-Volhard C. Establishment of dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo: the induction of polarity by the Toll gene product. *Cell* 1985;42:791-8.
- [26] Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffmann JA. The dorsoventral regulatory gene cassette *spätzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell*;1996;86, 973-83.
- [27] Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, Van Huffel C, Du X, Birdwell D, Alejos E, Silva M, Galanos C, Freudenberg M, Ricciardi-Castagnoli P, Layton B, Beutler B. Defective LPS

- signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* 1998;282:2085-8.
- [28] Palsson-McDermott EM, O'Neill LA. Signal transduction by the lipopolysaccharide receptor, Toll-like receptor-4. *Immunology* 2004;113:153-62.
- [29] Visintin A, Latz E, Monks BG, Espevik T, Golenbock DT. Lysines 128 and 132 enable lipopolysaccharide binding to MD-2, leading to Toll-like receptor-4 aggregation and signal transduction. *J Biol Chem* 2003;278:48313-20.
- [30] Nishitani C, Mitsuzawa H, Sano H, Shimizu T, Matsushima N, Kuroki Y. Toll-like receptor 4 region Glu24-Lys47 is a site for MD-2 binding: importance of CYS29 and CYS40. *J Biol Chem* 2006;281:38322-9.
- [31] Beutler B. Inferences, questions and possibilities in Toll-like receptor signalling. *Nature* 2004;430:257-63.
- [32] Anderson KV. Toll signaling pathways in the innate immune response. *Curr Opin Immunol* 2000;12:13-9.
- [33] Gay NJ, Keith FJ. Drosophila Toll and IL-1 receptor. *Nature* 1991;351:355-6.
- [34] Taguchi T, Mitcham JL, Dower SK, Sims JE, Testa JR. Chromosomal localization of TIL, a gene encoding a protein related to the Drosophila transmembrane receptor Toll, to human chromosome 4p14. *Genomics* 1996;32:486-8.
- [35] Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA Jr. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 1997;388:394-7.
- [36] Rock FL, Hardiman G, Timans JC, Kastelein RA, Bazan JF. A family of human receptors structurally related to Drosophila Toll. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:588-93.
- [37] Akira S. Toll-like receptor signaling. *J Biol Chem* 2003;278:38105-8.
- [38] Jack RS, Fan X, Bernheiden M, Rune G, Ehlers M, Weber A, Kirsch G, Mentel R, Furll B, Freudenberg M, Schmitz G, Stelter F, Schutt C. Lipopolysaccharide-binding protein is required to combat a murine gram-negative bacterial infection. *Nature* 1997;389:742-5.
- [39] Fierer J, Swancutt MA, Heumann D, Golenbock D. The role of lipopolysaccharide binding protein in resistance to Salmonella infections in mice. *J Immunol* 2002;168:6396-403.
- [40] Campos MA, Rosinha GM, Almeida IC, Salgueiro XS, Jarvis BW, Splitter GA, Qureshi N, Bruna-Romero O, Gazzinelli RT, Oliveira SC. Role of Toll-like receptor 4 in induction of cell-mediated immunity and resistance to *Brucella abortus* infection in mice. *Infect Immun* 2004;72:176-86.
- [41] Bernheiden M, Heinrich JM, Minigo G, Schutt C, Stelter F, Freeman M, Golenbock D, Jack RS. LBP, CD14, TLR4 and the murine innate immune response to a peritoneal

Salmonella infection. *J Endotoxin Res* 2001;7:447-50.

[42] Takeda K, Akira S. Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol* 2005;17:1-14.

[43] Hayashi F, Smith KD, Ozinsky A, Hawn TR, Yi EC, Goodlett DR, Eng JK, Akira S, Underhill DM, Aderem A. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* 2001;410:1099-103.

[44] Hemmi H, Kaisho T, Takeuchi O, Sato S, Sanjo H, Hoshino K, Horiuchi T, Tomizawa H, Takeda K, Akira S. Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway. *Nat Immunol* 2002;3:196-200.

[45] Takeuchi O, Takeda, K., Hoshino, K., Adachi, O., Ogawa, T, Akira, S. (2000) *Int. Immunol.*, 12,113-7.

[46] Kawai, T., Adachi O, Ogawa T, Takeda K, Akira S. Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. *Immunity* 1999;11:115-22.

[47] Schnare M, Holt AC, Takeda K, Akira S, Medzhitov R. Recognition of CpG DNA is mediated by signaling pathways dependent on the adaptor protein MyD88. *Curr Biol* 2000;10:1139-42.

[48] Hacker H, Vabulas RM, Takeuchi O, Hoshino K, Akira S, Wagner H. Immune cell activation by bacterial CpG-DNA through myeloid differentiation marker 88 and tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF)6. *J Exp Med* 2000;192:595-600.

[49] Toshchakov V, Jones BW, Perera PY, Thomas K, Cody MJ, Zhang S, Williams BR, Major J, Hamilton TA, Fenton MJ, Vogel SN. TLR4, but not TLR2, mediates IFN-beta-induced STAT1alpha/beta-dependent gene expression in macrophages. *Nat Immunol* 2002;3:392-8.

[50] Hoshino K, Kaisho T, Iwabe T, Takeuchi O, Akira S. Differential involvement of IFN-beta in Toll-like receptor-stimulated dendritic cell activation. *Int Immunol* 2002;14:1225-31.

[51] Doyle S, Vaidya S, O'Connell R, Dadgostar H, Dempsey P, Wu T, Rao G, Sun R, Haberland M, Modlin R, Cheng G. IRF3 mediates a TLR3/TLR4-specific antiviral gene program. *Immunity* 2002;17:251-63.

[52] Horng T, Barton GM, Medzhitov R. TIRAP: an adapter molecule in the Toll signaling pathway. *Nat Immunol* 2001;2:835-41.

[53] Fitzgerald KA, Palsson-McDermott EM, Bowie AG, Jefferies CA, Mansell AS, Brady G, Brint E, Dunne A, Gray P, Harte MT, McMurray D, Smith DE, Sims JE, Bird TA. and O'Neill, L.A. Mal (MyD88-adaptor-like) is required for Toll-like receptor-4 signal transduction. *Nature* 2001;413:78-83.

[54] Horng T, Barton GM, Flavell RA, Medzhitov R. The adaptor molecule TIRAP provides

signalling specificity for Toll-like receptors. *Nature* 2002;420:329-33.

[55] Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Sanjo H, Uematsu S, Kaisho T, Hoshino K, Takeuchi O, Kobayashi M, Fujita T, Takeda K, Akira S. Essential role for TIRAP in activation of the signalling cascade shared by TLR2 and TLR4. *Nature* 2002;420:324-9.

[56] Kawai T, Takeuchi O, Fujita T, Inoue J, Muhlradt PF, Sato S, Hoshino K, Akira S. Lipopolysaccharide stimulates the MyD88-independent pathway and results in activation of IFN-regulatory factor 3 and the expression of a subset of lipopolysaccharide-inducible genes. *J Immunol* 2001;167:5887-94.

[57] Yoneyama M, Suhara W, Fukuhara Y, Fukuda M, Nishida E, Fujita T. Direct triggering of the type I interferon system by virus infection: activation of a transcription factor complex containing IRF-3 and CBP/p300. *EMBO J* 1998;17:1087-95.

[58] Yamamoto M, Sato S, Mori K, Hoshino K, Takeuchi O, Takeda K, Akira S. Cutting edge: a novel Toll/IL-1 receptor domain-containing adapter that preferentially activates the IFN-beta promoter in the Toll-like receptor signaling. *J Immunol* 2002;169:6668-72.

[59] Oshiumi H, Matsumoto M, Funami K, Akazawa T, Seya T. TICAM-1, an adaptor molecule that participates in Toll-like receptor 3-mediated interferon-beta induction. *Nat Immunol* 2003;4:161-7.

[60] Diebold SS, Montoya M, Unger H, Alexopoulou L, Roy P, Haswell LE, Al-Shamkhani A, Flavell R, Borrow P, Reis e Sousa C. Viral infection switches non-plasmacytoid dendritic cells into high interferon producers. *Nature* 2003;424:324-8.

[61] Hoebe K, Du X, Georgel P, Janssen E, Tabet K, Kim SO, Goode J, Lin P, Mann N, Mudd S, Crozat K, Sovath S, Han J, Beutler B. Identification of Lps2 as a key transducer of MyD88-independent TIR signalling. *Nature* 2003;424:743-8.

[62] Fitzgerald KA, Rowe DC, Barnes BJ, Caffrey DR, Visintin A, Latz E, Monks B, Pitha PM, Golenbock DT. LPS-TLR4 signaling to IRF-3/7 and NF-kappaB involves the toll adapters TRAM and TRIF. *J Exp Med* 2003;198:1043-55.

[63] Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Uematsu S, Hoshino K, Kaisho T, Takeuchi O, Takeda K, Akira S. TRAM is specifically involved in the Toll-like receptor 4-mediated MyD88-independent signaling pathway. *Nat Immunol* 2003;4:1144-50.

[64] Oshiumi H, Sasai M, Shida K, Fujita T, Matsumoto M, Seya T. TIR-containing adapter molecule (TICAM)-2, a bridging adapter recruiting to toll-like receptor 4 TICAM-1 that induces interferon-beta. *J Biol Chem* 2003;278:49751-62.

[65] Bin LH, Xu LG, Shu HB. TIRP, a novel Toll/interleukin-1 receptor (TIR) domain-containing adapter protein involved in TIR signaling. *J Biol Chem* 2003;278:24526-32.

- [66] Lien E, Sellati TJ, Yoshimura A, Flo TH, Rawadi G, Finberg RW, Carroll JD, Espevik T, Ingalls RR, Radolf JD, Golenbock DT. Toll-like receptor 2 functions as a pattern recognition receptor for diverse bacterial products. *J Biol Chem* 1999;274:33419-25.
- [67] Ozinsky A, Underhill DM, Fontenot JD, Hajjar AM, Smith KD, Wilson CB, Schroeder L, Aderem A. The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:13766-71.
- [68] Takeuchi O, Kawai T, Muhlradt PF, Morr M, Radolf JD, Zychlinsky A, Takeda K, Akira S. Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6. *Int Immunol* 2001;13(7):933-40.
- [69] Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* 2001;413(6857):732-8.
- [70] Hayashi F, Smith KD, Ozinsky A, Hawn TR, Yi EC, Goodlett DR, Eng JK, Akira S, Underhill DM, Aderem A. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* 2001;410(6832):1099-103.
- [71] Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sato S, Sanjo H, Matsumoto M, Hoshino K, Wagner H, Takeda K, Akira S. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 2000;408(6813):740-5.
- [72] Heil F, Hemmi H, Hochrein H, Ampenberger F, Kirschning C, Akira S, Lipford G, Wagner H, Bauer S. Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science* 2004;303:1526-9.
- [73] Diebold SS, Kaisho T, Hemmi H, Akira S, Reis e Sousa C. Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science* 2004;303:1529-31.
- [74] Lund JM, Alexopoulou L, Sato A, Karow M, Adams NC, Gale NW, Iwasaki A, Flavell RA. Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:5598-603.
- [75] Paul B. Beeson and With the Technical Assistance of Elizabeth Roberts. Tolerance to bacterial pyrogens: I. Factors influencing its development. *J Exp Med* 1947;86:29-38.
- [76] Nomura F, Akashi S, Sakao Y, Sato S, Kawai T, Matsumoto M, Nakanishi K, Kimoto M, Miyake K, Takeda K, Akira S. Cutting edge: endotoxin tolerance in mouse peritoneal macrophages correlates with down-regulation of surface toll-like receptor 4 expression. *J Immunol* 2000;164:3476-9.
- [77] Siedlar M, Frankenberger M, Benkhart E, Espevik T, Quirling M, Brand K, Zembala M, Ziegler-Heitbrock L. Tolerance induced by the lipopeptide Pam3Cys is due to ablation of IL-

- 1R-associated kinase-1. *J Immunol* 2004;173:2736-45.
- [78] Brint EK, Xu D, Liu H, Dunne A, McKenzie AN, O'Neill LA, Liew FY. ST2 is an inhibitor of interleukin 1 receptor and Toll-like receptor 4 signaling and maintains endotoxin tolerance. *Nat Immunol* 2004;5(4):373-9.
- [79] Feterowski C, Novotny A, Kaiser-Moore S, Muhlradt PF, Rossmann-Bloeck T, Rump M, Holzmann B, Weighardt H. Attenuated pathogenesis of polymicrobial peritonitis in mice after TLR2 agonist pre-treatment involves ST2 up-regulation. *Int Immunol* 2005;17:1035-46.
- [80] Williams DL, Ha T, Li C, Kalbfleisch JH, Schweitzer J, Vogt W, Browder IW. Modulation of tissue Toll-like receptor 2 and 4 during the early phases of polymicrobial sepsis correlates with mortality. *Crit Care Med* 2003;31:1808-18.
- [81] Wesche H, Gao X, Li X, Kirschning CJ, Stark GR, Cao Z. IRAK-M is a novel member of the Pelle/interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK) family. *J Biol Chem* 1999;274:19403-10.
- [82] Kobayashi K, Hernandez LD, Galan JE, Janeway CAJr, Medzhitov R, Flavell RA. IRAK-M is a negative regulator of Toll-like receptor signaling. *Cell* 2002;110:191-202.
- [83] Burns K, Janssens S, Brissoni B, Olivos N, Beyaert R, Tschopp J. Inhibition of interleukin 1 receptor/Toll-like receptor signaling through the alternatively spliced, short form of MyD88 is due to its failure to recruit IRAK-4. *J Exp Med* 2003;197:263-8.
- [84] Janssens S, Burns K, Tschopp J, Beyaert R. Regulation of interleukin-1- and lipopolysaccharide-induced NF-kappaB activation by alternative splicing of MyD88. *Curr Biol* 2002;12(6):467-71.
- [85] Wald D, Qin J, Zhao Z, Qian Y, Naramura M, Tian L, Towne J, Sims JE, Stark GR, Li X. SIGIRR, a negative regulator of Toll-like receptor-interleukin 1 receptor signaling. *Nat Immunol* 2003;4: 920-7.
- [86] Polentarutti N, Rol GP, Muzio M, Bosisio D, Camnasio M, Riva F, Zoja C, Benigni A, Tomasoni S, Vecchi A, Garlanda C, Mantovani A. Unique pattern of expression and inhibition of IL-1 signaling by the IL-1 receptor family member TIR8/SIGIRR. *Eur. Cytokine Netw* 2003;14:211-8.
- [87] Saccani S, Polentarutti N, Penton-Rol G, Sims JE, Mantovani A. Divergent effects of LPS on expression of IL-1 receptor family members in mononuclear phagocytes in vitro and in vivo. *Cytokine* 1998;10:773-80.
- [88] Kumar S, Tzimas MN, Griswold DE, Young PR. Expression of ST2, an interleukin-1 receptor homologue, is induced by proinflammatory stimuli. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;235:474-8.

- [89] Sweet MJ, Leung BP, Kang D, Sogaard M, Schulz K, Trajkovic V, Campbell CC, Xu D, Liew FY. A novel pathway regulating lipopolysaccharide-induced shock by ST2/T1 via inhibition of Toll-like receptor 4 expression. *J Immunol* 2001;166:6633-9.
- [90] Yasukawa H, Sasaki A, Yoshimura A. Negative regulation of cytokine signaling pathways. *Annu Rev Immunol* 2000;18:143-64.
- [91] Stoiber D, Kovarik P, Cohnhey S, Johnston JA, Steinlein P, Decker T. Lipopolysaccharide induces in macrophages the synthesis of the suppressor of cytokine signaling 3 and suppresses signal transduction in response to the activating factor IFN-gamma. *J Immunol* 1999;163:2640-7.
- [92] Dalpke AH, Opper S, Zimmermann S, Heeg K. Suppressors of cytokine signaling (SOCS)-1 and SOCS-3 are induced by CpG-DNA and modulate cytokine responses in APCs. *J Immunol* 2001;166:7082-9.
- [93] Kinjyo I, Hanada T, Inagaki-Ohara K, Mori H, Aki D, Ohishi M, Yoshida H, Kubo M, Yoshimura A. SOCS1/JAB is a negative regulator of LPS-induced macrophage activation. *Immunity* 2002;17:583-91.
- [94] Nakagawa R, Naka T, Tsutsui H, Fujimoto M, Kimura A, Abe T, Seki E, Sato S, Takeuchi O, Takeda K, Akira S, Yamanishi K, Kawase I, Nakanishi K, Kishimoto T. SOCS-1 participates in negative regulation of LPS responses. *Immunity* 2002;17:677-87.
- [95] Takagi H, Sanada T, Minoda Y, Yoshimura A. Regulation of cytokine and toll-like receptor signaling by SOCS family genes. *Nippon Rinsho* 2004;62:2189-96.
- [96] Mansell A, Smith R, Doyle SL, Gray P, Fenner JE, Crack PJ, Nicholson SE, Hilton DJ, O'Neill LA, Hertzog PJ. Suppressor of cytokine signaling 1 negatively regulates Toll-like receptor signaling by mediating Mal degradation. *Nat Immunol* 2006;7:148-55.
- [97] Gibot S. The therapeutic potential of TREM-1 modulation in the treatment of sepsis and beyond. *Curr Opin Investig Drugs* 2006;7:438-42.
- [98] Gibot S, Buonsanti C, Massin F, Romano M, Kolopp-Sarda MN, Benigni F, Faure GC, Bene MC, Panina-Bordignon P, Passini N, Levy B. Modulation of the triggering receptor expressed on the myeloid cell type 1 pathway in murine septic shock. *Infect Immun* 2006;74:2823-30.
- [99] Gibot S, Massin F, Marcou M, Taylor V, Stidwill R, Wilson P, Singer M, Bellingan G. TREM-1 promotes survival during septic shock in mice *Eur J Immunol* 2007;37:456-66.
- [100] Zanetti, M. Cathelicidins, multifunctional peptides of the innate immunity. *J Leukoc Biol* 2004;75:39-48.
- [101] Fukumoto K, Nagaoka I, Yamataka A, Kobayashi H, Yanai T, Kato Y, Miyano T.

Effect of antibacterial cathelicidin peptide CAP18/LL-37 on sepsis in neonatal rats. *Pediatr Surg Int* 2005;21:20-4.

[102] Mookherjee N, Brown KL, Bowdish DM, Doria S, Falsafi R, Hokamp K, Roche FM, Mu R, Doho GH, Pistolic J, Powers JP, Bryan J, Brinkman FS, Hancock RE. Modulation of the TLR-mediated inflammatory response by the endogenous human host defense peptide LL-37. *J Immunol* 2006;176:2455-64.

[103] Duramad O, Fearon KL, Chang B, Chan JH, Gregorio J, Coffman RL, Barrat FJ. Inhibitors of TLR-9 act on multiple cell subsets in mouse and man in vitro and prevent death in vivo from systemic inflammation. *J Immunol* 2005;174:5193-200.

[104] Yang QW, Mou L, Lv FL, Zhu PF, Wang ZG, Jiang JX, Wang JZ. Novel TLR4-antagonizing peptides inhibit LPS-induced release of inflammatory mediators by monocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;329:846-54.

[105] Erlandsson-Harris H, Andersson U. Mini-review: The nuclear protein HMGB1 as a proinflammatory mediator. *Eur J Immunol* 2004;34:1503-12.

[106] Wang H, Bloom O, Zhang M, Vishnubhakat JM, Ombrellino M, Che J, Frazier A, Yang H, Ivanova S, Borovikova L, Manogue KR, Faist E, Abraham E, Andersson J, Andersson U, Molina PE, Abumrad NN, Sama A, Tracey KJ. HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice. *Science* 1999;285:248-51.

[107] Ombrellino M, Wang H, Ajemian MS, Talhouk A, Scher LA, Friedman SG, Tracey KJ. Increased serum concentrations of high-mobility-group protein 1 in haemorrhagic shock. *Lancet* 1999;354:1446-7.

[108] Tsung A, Sahai R, Tanaka H, Nakao A, Fink MP, Lotze MT, Yang H, Li J, Tracey KJ, Geller DA, Billiar T.R. The nuclear factor HMGB1 mediates hepatic injury after murine liver ischemia-reperfusion. *J Exp Med* 2005;201:1135-43.

[109] Zhang WJ, Wei H, Hagen T, Frei B. Alpha-lipoic acid attenuates LPS-induced inflammatory responses by activating the phosphoinositide 3-kinase/Akt signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104:4077-82.

[110] Meng G, Rutz M, Schiemann M, Metzger J, Grabiec A, Schwandner R, Luppa PB, Ebel F, Busch DH, Bauer S, Wagner H, Kirschning CJ. Antagonistic antibody prevents toll-like receptor 2-driven lethal shock-like syndromes. *J Clin Invest* 2004;113:1473-81.

[111] Van der Graaf CA, Netea MG, Morre SA, Den Heijer M, Verweij PE, Van der Meer JW, Kullberg BJ. Toll-like receptor 4 Asp299Gly/Thr399Ile polymorphisms are a risk factor for *Candida* bloodstream infection. *Eur Cytokine Netw* 2006;17:29-34.

[112] Barber RC, Aragaki CC, Rivera-Chavez FA, Purdue GF, Hunt JL, Horton JW. J TLR4

and TNF-alpha polymorphisms are associated with an increased risk for severe sepsis following burn injury. *Med Genet* 2004;41:808-13.

[113] Sutherland AM, Walley KR, Russell JA. Polymorphisms in CD14, mannose-binding lectin, and Toll-like receptor-2 are associated with increased prevalence of infection in critically ill adults. *Crit Care Med* 2005;33:638-44.

[114] Arbour NC, Lorenz E, Schutte BC, Zabner J, Kline JN, Jones M, Frees K, Watt, JL, Schwartz DA. TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans. *Nat Genet* 2000;25:187-91.

[115] Clark MF, Baudouin SV. A systematic review of the quality of genetic association studies in human sepsis. *Intens Care Med* 2006;32:1706-12.

3 Artigo II Mastócitos e tolerância a endotoxina: interação entre FcεR1 e Receptores Tipo Toll 4 como possibilidade de imunomodulação de processos inflamatórios infecciosos e alérgicos

3.1 RESUMO

Introdução: A resposta inflamatória desequilibrada a infecção é atualmente considerada primordial no desenvolvimento da sepse, e as possibilidades de imunomodulação são alvos terapêuticos promissores. O papel recentemente definido dos Receptores Tipo Toll (TLR) e dos mastócitos tanto como componentes essenciais da resposta inata, quanto como orquestradores da imunidade adquirida, são claramente confluentes e permitem que bases fisiopatológicas e genéticas comuns estabelecidas entre processos inflamatórios infecciosos e alérgicos possam ser exploradas. O estudo do fenômeno da tolerância à endotoxina, sob a luz destes novos conceitos, pode revelar mecanismos potencialmente úteis em imunomodulação. O objetivo deste estudo é investigar a hipótese de tolerância ao lipopolissacáride (LPS) e verificar a possibilidade de interações com respostas mediadas por FcεR1 em mastócitos, em termos de tolerância e sinergismo entre Receptor Tipo Toll 4 e FcεR1. **Métodos:** Mastócitos obtidos de medula óssea de camundongos selvagem (*C57BL/6*) e TLR4 knock-out (TLR4 KO) foram pré-estimulados com LPS e incubados com Imunoglobulina E, e então estimulados com LPS, agonista FcεR1 dinitrophenylated human serum albumin (DNP-HSA) ou agonista mais LPS. A produção de interleucina 6 e fator de necrose tumoral alfa (TNFα) e a fosforilação de NFκB, c-Jun e p-38 MAPK foram analisados, bem como a desgranulação dos mastócitos. **Resultados:** observou-se redução da produção de TNFα (p=0,01) e IL-6 (p=0,01) após estímulo com LPS em células pré-estimuladas com LPS. Há potencialização da resposta inflamatória pelo estímulo simultâneo com LPS e agonista FcεR1 e atenuação desta potencialização pela reprogramação induzida pelo pré-estímulo: TNFα (p=0,01), IL-6 (p=0,03). Estes efeitos são mediados por TLR4. Houve redução da fosforilação de NFκB e p-38 em células pré-estimuladas e aumento da fosforilação de c-Jun pelo estímulo simultâneo. **Conclusões:** mastócitos manifestam tolerância a LPS e foi demonstrada interação entre TLR4 e FcεR1 pelo sinergismo e sua atenuação, sugerindo uma conexão entre processos inflamatórios originados de insultos infecciosos e alérgicos através da via TLR4-NFκB.

Os mediadores responsáveis por estes efeitos nos mastócitos podem ser definidos e explorados na modulação da resposta inflamatória associada a sepse ou a processos alérgicos em estudos futuros. Palavras-chave: sepse, imunidade inata, mastócitos, tolerância a endotoxina, lipopolissacáride, receptores tipo Toll, receptores de alta afinidade por imunoglobulina E.

3.2 ABSTRACT

Mast cells and tolerance to endotoxins: interaction between FcεR1 and Toll-Like Receptor 4 as a possibility of connect immunomodulation of infectious and allergic inflammatory processes.

Introduction An unbalanced inflammatory response to infection is currently considered crucial in the development of sepsis, and the possibilities of immunomodulation are promising treatment goals. The recently defined roles of Toll-Like Receptors (TLR) and mast cells both as essential components of the innate response and as orchestrators of acquired immunity are clearly confluent and allow the investigation of common physiopathological and genetic bases established between infectious and allergic inflammatory processes. The study of the endotoxin tolerance phenomenon in light of these new concepts may reveal potentially useful mechanisms in immunomodulation. The objective of this study is to evaluate the tolerance to lipopolysaccharides (LPS) and verify the possibility of interactions with FcεR1 responses in mast cells, in terms of crosstolerance and synergism.

Methods Mast cells obtained from the bone marrow of wild-type (*C57BL/6*) and TLR4 knock-out mice (TLR4 KO) were prestimulated with LPS and incubated with Immunoglobulin E and then stimulated with LPS, dinitrophenylated human serum albumin (DNP-HSA), a FcεR1 agonist, or the agonist plus LPS. The production of interleukin 6 and tumor necrosis factor alpha (TNFα), and the phosphorylation of NFκappaB, c-Jun, and p-38 MAPK were analyzed, as well as mast cell degranulation.

Results A reduction of TNFα ($p=0.01$) and IL-6 ($p=0.01$) production was observed after stimulation with LPS in cells prestimulated with LPS. There is potentiation of the inflammatory response by simultaneous stimulation with LPS and the FcεR1 agonist and attenuation of this potentiation by reprogramming induced by the prestimulus: TNFα ($p=0.01$), IL-6 ($p=0.03$); these effects are mediated by TLR4. There was a reduction in phosphorylation of NFκappaB and p-38 in prestimulated cells and an increase of c-Jun phosphorylation by simultaneous stimulation.

Conclusions Mast cells manifest tolerance to LPS and interaction between TLR4 and FcεR1 was demonstrated by synergism and attenuation, suggesting connection in inflammatory processes of infectious and allergic origins via the TLR4-NFκappaB

pathway. The mediators responsible for these effects in mast cells may be defined and explored in the modulation of the inflammatory response associated with septic or allergic processes in future studies.

Key words: sepsis, innate immunity, mast cells, endotoxin tolerance, lipopolysaccharide, Toll-Like receptors, high affinity immunoglobulin E receptors.

3.3 INTRODUÇÃO

Atualmente um cenário preocupante envolve a sepse: aliam-se em sua composição a inefetividade do tratamento suportivo (1) e a falência das inovações terapêuticas em alterar significativamente seu curso (2). Desde 1972, partindo de idéias quase que intuitivas de Thomas Lewis (3) temos a concepção de que nossa resposta imunológica à infecção é a base sustentadora da sepse e a evolução do conhecimento fisiopatológico proveu sustentáculos mais consistentes a esta hipótese (4). Dois fatos confluentes e coincidentes do ponto de vista temporal abriram perspectivas reais de uma nova abordagem da sepse na segunda metade da década de 90. A descoberta dos receptores tipo Toll (5,6) deu início ao nosso entendimento atual sobre como reconhecemos padrões moleculares de patógenos, damos início à resposta inata e organizamos a resposta adquirida (7). Em 1996 Bernd Echtenacher determinou o papel essencial dos mastócitos em resposta inata utilizando modelo de sepse peritoneal em camundongos deficientes em mastócitos (8). Pesquisas adicionais elevaram estas células, anteriormente consideradas meros efetores, à categoria de sentinelas do sistema inato e organizadoras da resposta adaptativa (9). De fato, sua residência fixa em locais onde há a possibilidade de invasão por patógenos - pele, seios paranasais, pulmão, mucosa intestinal – as coloca em posição privilegiada em termos de detecção e organização subsequente da resposta imune. Inúmeras possibilidades em modulação da resposta inflamatória surgiram após a determinação do papel dos TLRs, tendo como alvo suas vias de transdução (10). O acúmulo de evidências definindo os mastócitos como fundamentais na resposta à sepse (11,12,13) abre novas perspectivas de estudo destas possibilidades neste tipo celular (14).

A interação entre respostas a estímulos infecciosos e alérgicos tem sido sugerida em diversos níveis, aventando a possibilidade de via comum. Estudos de base genética revelam o envolvimento de polimorfismos no gene myosin light chain kinase (MYLK) em risco aumentado de sepse e de injúria pulmonar aguda. Este mesmo gene esta envolvido com outras patologias inflamatórias, incluindo asma brônquica (15). Dados epidemiológicos têm demonstrado o efeito da exposição a agonistas TLR na incidência de fenômenos alérgicos (16). Estudos experimentais em cultura de mastócitos humanos revelam interrelação entre receptores FcεR1 e TLR2 (17). Em mastócitos derivados de medula óssea (BMDC) nós demonstramos previamente a ação sinérgica da co-estimulação de FcεR1 e TLR na produção de citocinas inflamatórias (18).

O fenômeno da tolerância à endotoxina foi descrito há mais de 60 anos (19) e é caracterizado pela hiporresponsividade à exposição a endotoxina induzida por exposição prévia. Compreendido no contexto da sinalização por TLRs, pode ser usado como modelo para identificação de mediadores que determinam a atenuação da resposta inflamatória, revelando potenciais imunomoduladores. Os mastócitos são uma das primeiras células a ter contato com patógenos invasores; quando ativadas liberam citocinas imunoregulatórias que organizam a resposta inflamatória. A liberação de TNF α e o recrutamento de leucócitos circulantes são elementos essenciais da resposta imune atribuídas ao mastócitos e, caracteristicamente, estas são as únicas células que armazenam TNF α pré-formado e o liberam quando ativadas (20). Poucos estudos abordaram a tolerância a endotoxina em mastócitos, provavelmente pelo fato de seu papel essencial na resposta a infecção ter sido tão recentemente definido.

Nós testamos a hipótese de que mastócitos expressam o fenômeno de tolerância direta à endotoxina através do pré-estímulo de mastócitos derivados de medula óssea (BMMC) de camundongos com LPS, e que este poderia induzir tolerância cruzada para o estímulo com agonistas Fc ϵ R1. A liberação de TNF α e IL-6 foram mensuradas e o mesmo experimento foi conduzido em BMMC obtidas de camundongos TLR4 KO para avaliar o papel de TLR4 na possível indução de tolerância cruzada e na potencialização pelo co-estímulo. Adicionalmente estudamos as principais vias de transdução envolvidas e a influência do pré-estímulo com LPS sob a desgranulação.

3.4 MATERIAIS E MÉTODO

3.4.1 Materiais

Reagentes foram obtidos das seguintes fontes: meio e reagentes de cultura de Invitrogen/GIBCO (Carlsbad, CA); IL-3 recombinante de camundongo de Pepro Tech (Rocky Hill, NJ); anticorpo monoclonal anti-DNP IgE e o antígeno, dinitrophenylated human serum albumin(DNP-HSA), lipopolissacáride (LPS, Escherichia coli 055:B5) de Sigma (St Louis MO); anticorpos policlonais que detectam fosforilação ativadora de p38 MAPkinase (Thr180/Tyr182), NFkappaB (Ser536) e c-Jun (Ser63), bem como as próprias proteínas de Cell Signaling Technology (Beverly, ME).

3.4.2 Cultura dos mastócitos

Mastócitos derivados de medula óssea foram cultivadas em suspensão em frascos de 75 milímetros cúbicos (300000 cel/ml) em RPMI 1640 suplementado por soro fetal bovino a 5%, 30 ng/ml de IL-3, glutamina 2 mM, 100 μ M aminoácidos não essenciais, 10 μ M 2-mercaptoethanol, e 1 mM de piruvato de sódio. BMMC foram obtidas de camundongos selvagem (*C57BL/6*) e TLR4 KO, sob aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (CETEA- UFMG), com procedimentos previamente descritos (21) e cultivadas em estufa de CO₂ a 37° Celsius. BMMCs foram utilizadas nos experimentos após a 4ª semana em cultura e apresentavam 99% de mastócitos quando coradas por azul de toluidina.

3.4.3 Método experimental

BMMCs foram sensibilizadas a DNP-HSA com DNP-IgE 100 ng/ml e pré-estimulada ou não com LPS 10 ng/ml e LPS 100 ng/ml por 18 horas com incubação em estufa de CO₂ a 37° Celsius. A seguir procedeu-se a estimulação com DNP-HAS 20 ng/ml, LPS 1 μ g/ml ou combinação de ambos por 24 horas para produção de citocinas e 30 min para desgranulação. Para os estudos de sinalização as BMMCs foram estimuladas por 30 minutos.

3.4.4 Ensaio para mensuração de citocinas

TNF α e IL-6 foram mensuradas no sobrenadante pelo método de enzyme-linked immunosorbent assay – ELISA, de acordo com as orientações do fabricante (kits Biosource, Camarillo, CA).

3.4.5 Mensuração da desgranulação

Para estas mensurações as culturas foram lavadas três vezes com meio salino tamponado por HEPES antes da estimulação (meio HEPES: 10 mM; NaCl 137 mM; KCl 2,7 mM; Na₂HPO₄.7H₂O 0,4 mM; glicose 5,6 mM; CaCl₂.2H₂O 1,8 mM; MgSO₄.7H₂O 1,3 mM; pH=7,4). A desgranulação foi determinada pela mensuração da liberação do marcador β -hexosaminidase pelo uso de ensaio colorimétrico no qual a liberação de *p*-nitrophenol oriundo

de p-nitrophenyl-N-acetyl- β -D-glucosaminide é mensurado. Valores são expressos como a porcentagem de β -hexosaminidase que é liberada no meio.

3.4.6 Western Blotting

Células foram lisadas por tampão inibidor de protease e fosfatase pela adição de 100 μ l a 100 μ l de suspensão de células. Este tampão era constituído por Complete protease inhibitor cocktail (Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN), Sigma protease inhibitor cocktail (Sigma, St Louis, MO), 3-4 dichloroisocoumarin (Roche Molecular Biochemicals) e benzamidine, além dos inibidores de fosfatase de sódio orthovanadate, pirofosfato de sódio e fluoreto de sódio (Sigma). As amostras foram fervidas por 4 minutos e qualquer debris porventura existente, removido por centrifugação a 14000 rpm por 5 minutos, previamente ao carregamento dos gels. Proteínas foram separadas por NuPAGE BisTris gels (Invitrogen) e então transferidas para membranas de nitrocelulose para immunoblotting com os anticorpos primários indicados. Visualização foi feita por quimioluminescência e quantificação por densitometria (Kodak Image Station 4000R).

3.4.7 Análise estatística

Resultados foram analisados por teste t não paramétrico – Mann Whitney - com intervalo de confiança estabelecido para 95% e considerados significativos valores de p menores que 0,05. Dados foram armazenados no programa estatístico Graphpad Prism 4.

3.5 RESULTADOS

3.5.1 Mastócitos expressam tolerância à endotoxina.

BMMC que foram pré-estimuladas com LPS 10 ng/ml e 100 ng/ml mostraram uma menor produção de TNF α quando estimuladas com LPS 1 μ g/ml: em pré-estímulo de 10ng/ml (p=0,18) e de 100ng/ml (p=0,01). Com relação a IL-6, o mesmo ocorreu: pré-estímulo de 10 ng/ml (p=0,17) e pré-estímulo de 100 ng/ml (p=0,01). Em comparação com BMMC que não

receberam pré-estímulo, células pré-estimuladas com LPS 100 ng/ml significativamente reduziram a produção de TNF α e IL-6 a segundo estímulo com LPS 1 μ g/ml, determinando que exposição a endotoxina induz redução significativa da produção destas citocinas pró-inflamatórias a um segundo estímulo de LPS [FIG. 1 e 2].

3.5.2 Pré-condicionamento com LPS e estímulo com agonistas Fc ϵ R1

Para testar hipótese de que uma via comum possa modular as respostas oriundas de estímulos aos receptores TLR4 e Fc ϵ R1, a cultura celular foi incubada com DNP-IgE 50 ng/ml e pré estimulada com LPS 10 ng/ml ou 100 ng/ml. Analisamos o efeito do pré-estímulo sobre a produção de citocinas inflamatórias determinadas pelo estímulo de BMMCs via receptor de alta afinidade por IgE (Fc ϵ R1) com DNP-HSA 20 ng/ml. Em pré-estímulo LPS 10 ng/ml, não houve redução significativa da liberação de TNF α ($p=0,057$), assim como em pré-estímulo LPS 100 ng/ml, ($p=0,17$). Com relação a IL-6, o mesmo ocorreu em pré estímulo com LPS 10 ng/ml ($p=0,1$) e para pré-estímulo com LPS 100 ng/ml, ($p=0,1$). O grupo controle de ambas é constituído por células que não receberam pré-estímulo. Em termos de liberação de TNF α , mesmo pré-estímulo com doses pequenas determinaram tolerância cruzada. Embora tenha se observado menor produção de IL-6 com pré-estímulo com LPS 10ng/ml, a análise não mostrou significância estatística [FIG 1 e 2].

3.5.3 O sinergismo entre Fc ϵ R1 e TLR4 na produção de TNF α e IL-6 é atenuado por pré-condicionamento com LPS

Como previamente demonstramos (18), o estímulo simultâneo dos receptores Fc ϵ R1 e TLR4 determinou uma maior produção de citocinas quando comparados ao estímulo isolado de cada um deles. Fortalecendo a hipótese de via comum temos dois fatos novos demonstrados nesta sequência de experimentos: o primeiro a atenuação do sinergismo pelo pré-condicionamento com LPS 100 ng/ml para TNF α ($p=0,01$), e para IL-6 ($p=0,03$), sendo ambos pré-estimulados por 18 horas antes do estímulo com LPS 1 μ g/ml; o segundo a dependência de TLR4 para que a potencialização pelo co-estímulo ocorra, como veremos adiante. Portanto, pré-estímulo com 100 ng/ml determinou atenuação do efeito sinérgico da co-estimulação com LPS e DNP-HSA [FIG. 1 e 2].

3.5.4 O sinergismo obtido pela co-estimulação é dependente de TLR4.

Para determinar o papel do TLR4 conduzimos experimentos com o mesmo padrão de pré-estímulo e estímulo em BMMC obtidas de camundongos TLR4 *KO*. Não observamos indução de tolerância nem tendência a menor produção de citocinas pró-inflamatórias quando analisamos a produção de TNF α e IL-6 por mastócitos obtidos de camundongos TLR4 *KO* seja o pré-estímulo feito com LPS 10 ou 100 ng/ml. A potencialização pelo estímulo simultâneo é mediada por TLR4, pois não se observa este fenômeno em mastócitos obtidos de camundongos TLR4 *KO* [FIG. 1 e 2].

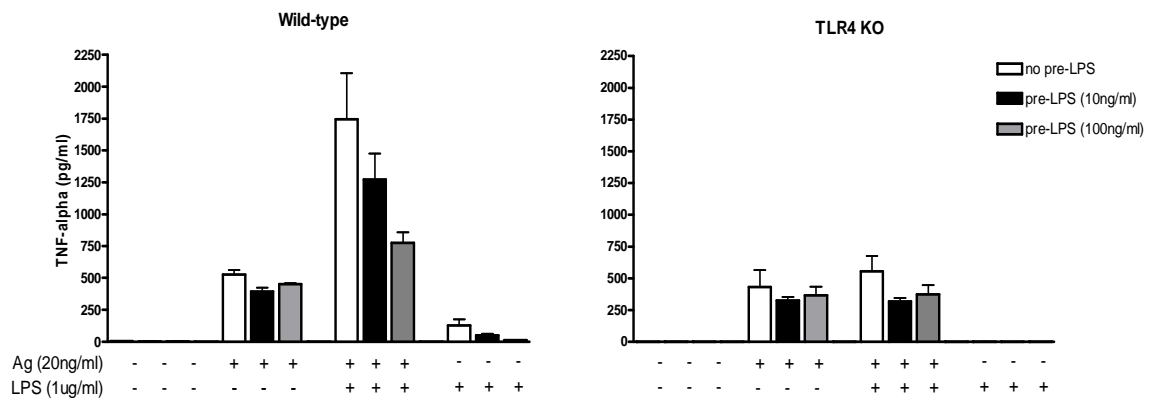


FIGURA 1. EFEITO DO PRÉ-ESTÍMULO COM LPS SOBRE A PRODUÇÃO DE TNF α MEDIADA RECEPTOR TIPO TOLL-4.

Sequencialmente: A - redução não significativa da produção de TNF α induzida por DNP-HSA 20 ng/ml em células pré-estimuladas com LPS 10ng/ml ($p=0,057$) e LPS 100 ng/ml ($p=0,17$). B - Potencialização da produção de TNF α pelo estímulo simultâneo com DNP-HSA 20ng/ml e LPS 1 μ g/ml e atenuação da potencialização pelo pré-estímulo com LPS 10 ng/ml ($p=0,16$) e 100 ng/ml ($p=0,01$). C - Resultados após estímulo com LPS 1 μ g/ml em células pré estimuladas com LPS 10 ng/ml($p=0,18$) e LPS 100 ng/ml($p=0,01$). No gráfico TLR4KO demonstração que a potencialização pelo co-estímulo TLR4 e Fc ϵ R1 e sua atenuação pelo pré- estímulo é mediada por TLR4, onde não há diferença significativa entre os grupos não pré-estimulado e pré-estimulado.

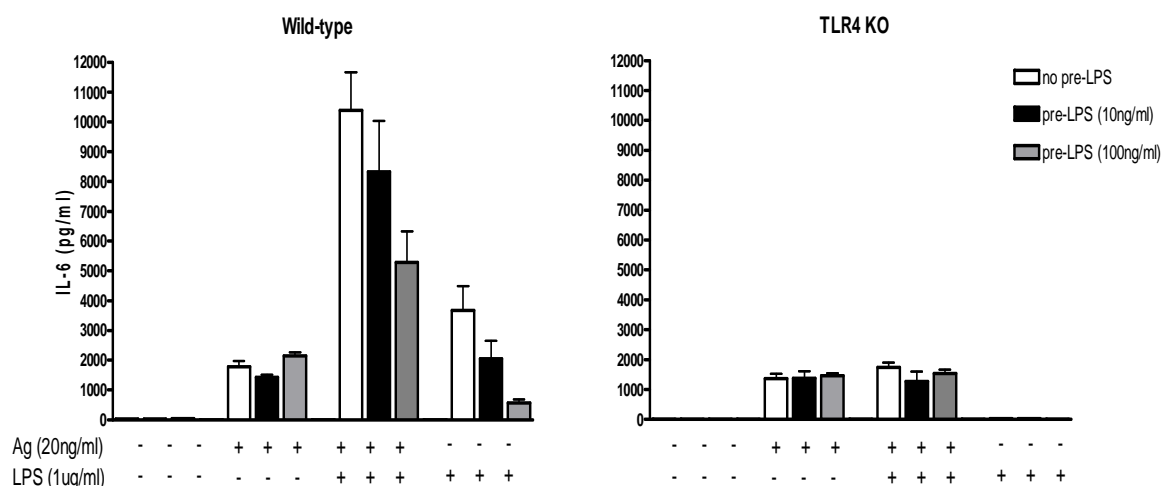


FIGURA 2. EFEITO DO PRÉ-ESTÍMULO COM LPS SOBRE A PRODUÇÃO DE IL-6 MEDIADA POR RECEPTOR TIPO TOLL-4.

A - Diminuição não significativa da produção de IL-6 induzida por DNP-HSA 20 ng/ml em células pré-estimuladas com LPS 10ng/ml ($p=0,1$) e LPS 100 ng/ml ($p=0,1$). B - Potencialização da produção de IL-6 pelo estímulo simultâneo com DNP-HSA 20ng/ml e LPS 1 μ g/ml e atenuação da potencialização pelo pré-estímulo com LPS 10 ng/ml ($p=0,24$) e 100 ng/ml ($p=0,03$). C - Resultados após estímulo com LPS 1 μ g/ml em células pré estimuladas com LPS 10 ng/ml ($p=0,17$) e LPS 100 ng/ml ($p=0,01$). A potencialização pelo co-estímulo e sua atenuação pelo pré-estímulo é mediada por TLR4, pois no grupo TLR4 KO não se observa este fenômeno.

3.5.5 O pré-condicionamento com LPS não afetou a intensidade de desgranulação.

Para análise da influência do pré-condicionamento com LPS sobre a desgranulação conduzimos ensaio da β -hexosaminidase. Não houve alteração significativa da porcentagem de desgranulação em nenhum dos grupos [FIG3].

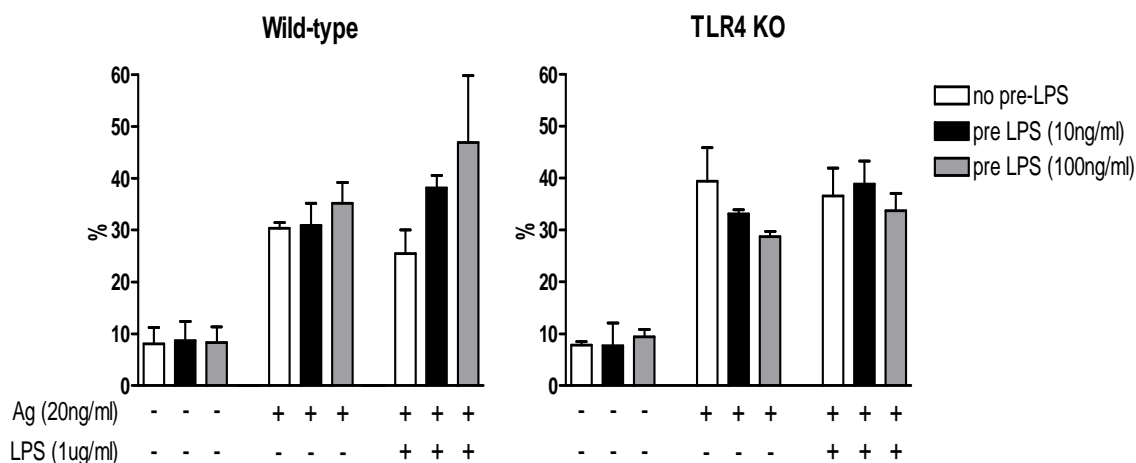


FIGURA 3. EFEITO DO PRÉ-ESTÍMULO COM LPS SOBRE DA DESGRANULAÇÃO.

Através do ensaio da β -hexosaminidase avaliou-se o efeito do pré-estímulo com LPS 10 ng/ml e LPS 100 ng/ml sobre a degranulação. Não foi observada redução da degranulação induzida por pré-estímulo com qualquer dose de LPS.

3.5.6 O pré-condicionamento com LPS determinou atenuação da fosforilação de NFkappaB e p-38MAPK e a potencialização se associa ao aumento da fosforilação de C-Jun.

Conduzimos, finalmente, experimentos com células de camundongo selvagem (*C57BL/6*) pré-estimuladas com LPS 100 ng/ml e não pré-estimuladas como grupo controle e estimuladas por LPS 1 μ g/ml, DNP-HSA 20 ng/ml e combinação de ambos. A fosforilação de NFkappaB e p-38MAPK foram analisadas e observou-se uma redução na fosforilação no grupo pré-estimulado. BMMC obtidas de camundongos TLR4 KO pré-estimuladas foram estimuladas com DNP-HSA 20 ng/ml e a fosforilação de NFkappaB foi analisada comparativamente ao grupo controle não pré-estimulado. Não observamos atenuação significativa da fosforilação pela reprogramação, indicando a via TLR-NFkappaB como possivelmente envolvida no processo de tolerância cruzada. Com relação a potencialização induzida pelo co-estímulo, notamos associação com aumento da fosforilação de C-Jun [FIG 4].

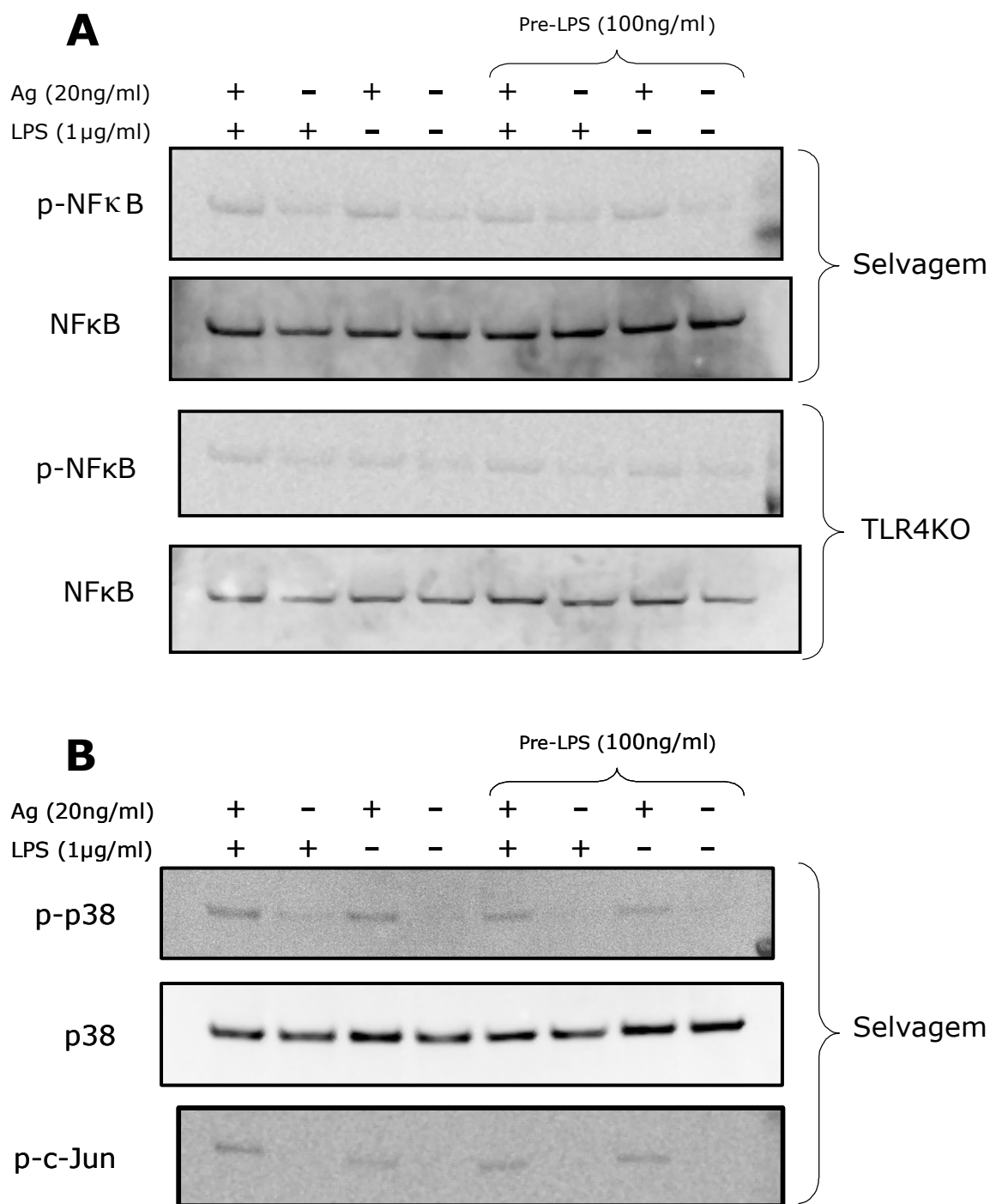


FIGURA 4. EFEITO DO PRÉ ESTÍMULO COM LPS SOBRE A FOSFORILAÇÃO DE p38, NFκbeta e c-JUN APÓS ESTÍMULO COM DNP-HSA, LPS E COMBINAÇÃO DE AMBOS.

Com relação à NFκappaB observamos uma redução da intensidade de fosforilação determinada pelo pré-estímulo no grupo estimulado por Ag e Ag + LPS, ausente no controle realizado com células obtidas em camundongos TLR4 knock-out, correspondente ao efeito da tolerância cruzada determinada na análise da produção de IL-6 e TNFα. (A) Observa-se em p-38MAPK a mesma redução da intensidade de fosforilação determinada pelo pré-estímulo nos grupos Ag, Ag+LPS e também em LPS isolado. A fosforilação de C-Jun revelou nítido aumento quando se analisa o efeito do co-estímulo com Ag+LPS, estabelecendo associação desta via com a potencialização(B)

3.6 DISCUSSÃO.

Com a nova visão dos mecanismos reguladores da resposta imune introduzida a partir da segunda metade da década de 90, os modelos de tolerância a endotoxina têm sido vistos também como uma oportunidade para identificar mediadores e oportunidades em modulação da resposta inflamatória, particularmente em sepse (22). Nossos resultados estabelecem a expressão do fenômeno de tolerância a endotoxina e sinergismo induzido por LPS, e atenuado por seu pré-estímulo, a agonistas FcεR1 em mastócitos, mediados por TLR4.

A membrana dos mastócitos expressa receptores tipo toll, que sob estimulação de componentes de patógenos levam estas células a liberar citocinas, particularmente TNFα, e outras moléculas efetoras. Estas, por sua vez, controlam o comportamento de outras células, promovendo a inflamação e o afluxo ao sítio de infecção (23). O estabelecimento da reprogramação induzida em mastócitos por LPS abre a perspectiva de se estudar as possibilidades de modulação da resposta inflamatória em sua origem, tanto no que se refere ao primeiro contato com o patógeno quanto aos eventos consequentes. Relatos das possibilidades de regulação negativa da resposta imune mediadas por TLR (24) podem ser extrapolados tendo como alvo os mastócitos.

A interação sinérgica entre os receptores TLR4 e FcεR1, como anteriormente descrito, foi demonstrada por nossos resultados prévios. Os resultados aqui descritos confirmaram o sinergismo e acrescentaram dados à interação demonstrando que a atenuação do sinergismo pelo pré-condicionamento através do estímulo a TLR4 com baixas doses de LPS e o papel fundamental de TLR na potencialização pelo co-estímulo, ausente no grupo TLR4 KO. A correspondência funcional em mastócitos humanos, no que diz respeito às respostas de TLR4 e FCεR1, foi demonstrada em termos de modulação de resposta imune incluindo análise de expressão gênica (25). No que concerne a sepse, bases genéticas comuns definem o elo entre o risco de desenvolvimento de sepse e injúria pulmonar aguda relacionada à sepse e fenômenos alérgicos como a asma (14). Mecanismos reguladores da resposta inflamatória associados ao fenômeno de tolerância podem ser identificados neste contexto, eventualmente comuns à gênese infecciosa ou alérgica.

Os resultados que revelaram a atenuação da fosforilação induzida pela reprogramação dos mastócitos através do pré-estímulo com LPS, particularmente a via TLR4 - NFκappaB, são dados importantes na busca por mediadores que possam ser utilizados na tentativa de se

obter uma resposta inflamatória mais balanceada. Vários reguladores negativos já foram descritos como envolvidos no processo da tolerância a endotoxina (26). Em macrófagos demonstrou-se que o tratamento com sST2 atenuou a expressão de TLR4 e a administração de sST2 in vivo após administração de LPS reduziu significativamente a mortalidade mediada pela endotoxina (27). Em mastócitos, evidências se acumulam sobre suas propriedades imunomodulatórias, abrindo a perspectiva de se tentar explorar estas células em processos de desequilíbrio de resposta inflamatória (28), como em sepse ou asma brônquica.

3.7 CONCLUSÃO

Mastócitos expressam a tolerância a endotoxina e nossos dados demonstraram pela primeira vez a dependência de TLR4 para que potencialização pelo co-estímulo ocorra e sua atenuação pelo pré-estímulo. Estes fatos fortalecem os indícios de interação entre a resposta inflamatória de causas infecciosa e alérgica através dos receptores TLR4 e FcεR1.

Considerando o papel essencial dos mastócitos como detectores e reguladores da resposta inflamatória desencadeada por patógenos, estudos futuros podem explorar os mediadores envolvidos na regulação deste fenômeno. A utilização destes potenciais moduladores teria como objetivo resposta inflamatória mais balanceada em processos onde o desequilíbrio é o determinante do malefício, como em sepse, explorando as propriedades imunomodulatórias recentemente atribuídas aos mastócitos.

3.8 REFERÊNCIAS

1. Martin GS, Mannino DM, Eaton S, Moss. The Epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med* 2003;348:1546-54.
2. Dellinger RP, Levy MM, Carlet JM, Bion J, Parker MM, Jaeschke R, Reinhart K, Angus DC, Brun-Buisson C, Beale R, Calandra T, Dhainaut J, Gerlach H, Harvey M, Marini JJ, Marshall J, Ranieri M, Ramsay G, Sevransky J, Thompson BT, Townsend S, Vender JS, Zimmerman JL, Vincent J, for the International Surviving Sepsis Campaign Guidelines Committee. Surviving Sepsis Campaign: International guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2008. *Crit Care Med.* 2008;36:1.
3. Thomas L. Germs. *N Engl J Med.* 1972;287:553-555.
4. Cohen J. The immunopathogenesis of sepsis. *Nature* 2002;420: 885-91.
5. Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffmann JA. The dorsoventral regulatory gene cassette *spätzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 1996;6:973-83.
6. Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, Van Huffel C, Du X, Birdwell D, Alejos E, Silva M, Galanos C, Freudenberg M, Ricciardi-Castagnoli P, Layton B, Beutler B. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in *Tlr4* gene. *Science* 1998;282:2085-8.
7. Echtenacher B, Männel DN, Hültner L. Critical protective role of mast cells in a model of acute septic peritonitis. *Nature* 1996;381(6577):75-7.
8. Beutler B. Inferences, questions and possibilities in Toll-like receptor signaling. *Nature* 2004; 430(6996):257-63
9. Galli SJ, Nakae S, Tsai M. Mast cells in the development of adaptive immune responses. *Nat Immunol.* 2005;6(2):135-42.
10. Saturnino SF, Andrade MV. Toll-Like Receptors, New Horizons in Sepsis. *Curr Mol Med.* 2007;7:522-531.
11. Nakano N, Nishiyama C, Kanada S, Niwa Y, Shimokawa N, Ushio H, Nishiyama M, Okumura K, Ogawa H. Survival from polymicrobial infections involvement of mast cells in IL-12/23 p40 production is essential for survival from polymicrobial infections. *Blood* 2007;109(1):4846-55.
12. Maurer M, Wedemeyer J, Metz M, Piliponsky AM, Weller K, Chatterjea D, Clouthier DE, Yanagisawa MM, Tsai M, Galli SJ. Mast cells promote homeostasis by limiting

- endothelin-1-induced toxicity. *Nature* 2004;432:512-6.
13. Mallen-St Clair J, Pham CT, Villalta SA, Caughey GH, Wolters PJ. Mast cell dipeptidyl peptidase I mediates survival from sepsis. *J Clin Invest* 2004;113(4):628-34.
 14. Supajatura V, Ushio H, Nakao A, Okumura K, Ra C, Ogawa H. Protective roles of mast cells against enterobacterial infection are mediated by Toll-like receptor 4. *J Immunol.* 2001;167(4):2250-6.
 15. Gao L, Grant A, Halder I, Brower R, Sevransky J, Maloney JP, Moss M, Shanholtz C, Yates CR, Meduri GU, Shriver MD, Ingersoll R, Scott AF, Beaty TH, Moitra J, Ma SF, Ye SQ, Barnes KC, Garcia JG. Novel polymorphisms in the myosin light chain kinase gene confer risk for acute lung injury. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2006;34(4):487-95.
 16. Braun-Fahrlander C, Riedler J, Herz U, Eder W, Waser M, Grize L, Maisch S, Carr D, Gerlach F, Bufe A, Lauener RP, Schierl R, Renz H, Nowak D, von Mutius E; Allergy and Endotoxin Study Team. Environmental exposure to endotoxin and its relation to asthma in school-age children. *N Engl J Med.* 2002;347(12):869-77.
 17. Yoshioka M, Fukuishi N, Iriguchi S, Ohsaki K, Yamanobe H, Inukai A, Kurihara D, Imajo N, Yasui Y, Matsui N, Tsujita T, Ishii A, Seya T, Takahama M, Akagi M. Lipoteichoic acid downregulates FcεRI expression on human mast cells through Toll-like receptor 2. *J Allergy Clin Immunol.* 2007;120(2):452-61.
 18. Qiao H, Andrade MV, Lisboa FA, Morgan K, Beaven MA. FcεR1 and toll-like receptors mediate synergistic signals to markedly augment production of inflammatory cytokines in murine mast cells. *Blood* 2006;107(2):610-8.
 19. Paul B. Beeson and With the Technical Assistance of Elizabeth Roberts. Tolerance to bacterial pyrogens: I. Factors influencing its development. *J Exp Med* 1947;86:29-38.
 20. Tkaczyk C, Beaven MA, Brachman SM, Metcalfe DD, Gilfillan AM. The phospholipase Cγ1-dependent pathway of FcεRI-mediated mast cells activation is regulated independently of phosphatidylinositol-3-Kinase. *J Biol Chem* 2003;278:48474-48484.
 21. Gordon JR, Galli SJ. Release of both preformed and newly synthesized tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha)/cachectin by mouse mast cells stimulated via the Fc epsilon RI. A mechanism for the sustained action of mast cell-derived TNF-alpha during IgE-dependent biological responses. *J Exp Med.* 1991;174(1):103-7.
 22. Cavaillon JM, Adib-Conquy M. Review Bench-to-bedside review: endotoxin tolerance as a model of leukocyte reprogramming in sepsis. *Crit Care.* 2006;10:233.
 23. Dawicki W, Marshall JS. New and emerging roles for mast cells in host defence. *Curr Opin Immunol.* 2007;19(1):31-8.

24. Liew FY, Xu D, Brint EK, O'Neill LA. Negative regulation of toll-like receptor-mediated immune responses. *Nat Rev Immunol.* 2005;5(6):446-58.
25. Okumura S, Kashiwakura J, Tomita H, Matsumoto K, Nakajima T, Saito H, Okayama Y. Identification of specific gene expression profiles in human mast cells mediated by Toll-like receptor 4 and FcRI. *Blood* 2003;102(7):2547-54.
26. Sly LM, Rauh MJ, Kalesnikoff J, Song CH, Kristal G. LPS-induced upregulation of SHIP is essential for endotoxin tolerance. *Immunity* 2004;21(2): 227-39
27. Sweet MJ, Leung BP, Kang D, Sogaard M, Schulz K, Trajkovic V, Campbell CC, Xu D, Liew FY. A novel pathway regulating lipopolysaccharide-induced shock by ST2/T1 via inhibition of Toll-like receptor 4 expression. *J Immunol.* 2001;166(11):6633-9.
28. Galli SJ, Grimaldeston M, Tsai M. Immunomodulatory mast cells: negative, as well as positive, regulators of immunity. *Nat Rev Immunol.* 2008 May 16. [Epub ahead of print].

4 ANEXO I Aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (CETEA – UFMG)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
- C E T E A -

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 161/2007**, relativo ao projeto intitulado **"Influência do Toll Like Receptors-4 de mastócitos pulmonares em tolerância imunológica e intensidade de degranulação: avaliação de potencial via comum"**, que tem como responsável **Marcus Vinicius Melo de Andrade**, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **19/ 12/2007**.

Este certificado expira-se em **19/ 12 / 2012**.

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 161/2007**, related to the project entitled **"Role of mast cell's Toll Like receptors-4 in immune tolerance and degranulation: searching for a common pathway"**, under the supervision of **Marcus Vinicius Melo de Andrade**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **December 19, 2007**.

This certificate expires in **December 19, 2012**.

Belo Horizonte, 21 de Dezembro de 2007.

Prof. Humberto Pereira Oliveira
Coordenador do CETEA/UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil
Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4516
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br

(Mod.Cert. v1.0)

5 ANEXO II Abstract - Artigo de revisão publicado: Saturnino SF, Andrade MV. Toll-Like Receptors, New Horizons in Sepsis. *Curr Mol Med.* 2007;7:522-531.

522 *Current Molecular Medicine* 2007, 7, 522-531
1566-5240/07 \$50.00+.00 © 2007 Bentham Science Publishers Ltd.

Toll-Like Receptors, New Horizons in Sepsis

Saulo F. Saturnino and Marcus V. Andrade*

Department of Internal Medicine, School of Medicine, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, MG 30130-100, Brazil

Abstract: Sepsis and septic shock, its more severe form, have shown alarming increases in incidence and a persistently high mortality rate, despite technological advancement allowing adequate support of vital functions in intensive care units. Progress in understanding of physiopathology has directed the therapeutic approach, until recently limited to sustaining failing organ systems and combating infectious agents, towards the alterations provoked by an unbalanced systemic inflammatory response and its deleterious effects on cellular function.

Less than 10 years ago, the discovery of Toll-Like Receptor proteins, which allow the detection of pathogen molecular patterns, initiate and modulate the immune response, opened up new and exciting possibilities in approaches to sepsis. The elucidation of the transduction pathways triggered by Toll-Like Receptors activation signals exposes promising therapeutic targets. Currently, mechanisms associated within the context of Toll-Like Receptor signalization are identified in the tolerance phenomena described in the past. The description of genetic polymorphisms associated with Toll-Like Receptors, and the different patterns of response to infectious insults have defined high-risk subgroups of imbalanced immune response with greater specificity. A better understanding of the molecular structures involved in the process and the negative-regulation of some of them have opened up possibilities in antagonizing and modulating the response to the inflammatory activation mediated by Toll-Like Receptors.

Having understood how the immune system recognizes pathogens and organizes the inflammatory response upon the discovery of Toll-Like Receptors and their signaling pathways, we gained an insight into the possibilities of specific treatment instead of supportive measures for sepsis.

Keywords: Toll-like receptor, sepsis, septic shock, signal transduction, immune tolerance, innate immunity, pathogen-associated molecular patterns, pattern recognition receptors.

Received: February 07, 2007 Revised: April 03, 2007 Accepted: April 10, 2007

6 ANEXO III Abstract - Artigo original submetido a editora BioMed Central, periódico BMC Infectious Diseases, em revisão por pares.

Mast cells and tolerance to endotoxins: interaction between FcεR1 and Toll-Like Receptor 4 as a possibility of connect immunomodulation of infectious and allergic inflammatory processes.

Saulo Fernandes Saturnino (Saturnino SF)¹, sfsaturnino@gmail.com

Roberta Oliveira Prado (Oliveira-Prado R)², robertaprado@gmail.com

José Renan Cunha-Melo (Cunha-Melo JR)², jrcmelo@medicina.ufmg.br

Marcus Vinícius Andrade (Andrade MV)¹, andradem@medicina.ufmg.br

Departments of 1Internal Medicine and 2Surgery, School of Medicine, Federal University of Minas Gerais, Avenida Alfredo Balena, 190, Belo Horizonte-MG, Brazil, 30130100.

Corresponding Author: Marcus V Andrade – andradem@medicina.ufmg.br

Department of Internal Medicine, School of Medicine, Federal University of Minas Gerais Avenida Alfredo Balena, 190, Belo Horizonte-MG, Brazil, 30130100

Abstract

Introduction An unbalanced inflammatory response to infection is currently considered crucial in the development of sepsis, and the possibilities of immunomodulation are promising treatment goals. The recently defined roles of Toll-Like Receptors (TLR) and mast cells both as essential components of the innate response and as orchestrators of acquired immunity are clearly confluent and allow the investigation of common physiopathological and genetic bases established between infectious and allergic inflammatory processes. The study of the endotoxin tolerance phenomenon in light of these new concepts may reveal potentially useful mechanisms in immunomodulation. The objective of this study is to evaluate the tolerance to lipopolysaccharides (LPS) and verify the possibility of interactions with FcεR1 responses in mast cells, in terms of crosstolerance and synergism.

Methods Mast cells obtained from the bone marrow of wild-type (*C57BL/6*) and TLR4 knock-out mice (TLR4 KO) were prestimulated with LPS and incubated with Immunoglobulin E and then stimulated with LPS, dinitrophenylated human serum albumin (DNP-HSA), a FcεR1 agonist, or the agonist plus LPS. The production of interleukin 6 and tumor necrosis factor alpha (TNFα), and the phosphorylation of NFκappaB, c-Jun, and p-38 MAPK were analyzed, as well as mast cell degranulation.

Results A reduction of TNFα (p=0.01) and IL-6 (p=0.01) production was observed after stimulation with LPS in cells prestimulated with LPS. There is potentiation of the inflammatory response by simultaneous stimulation with LPS and the FcεR1 agonist and attenuation of this potentiation by reprogramming induced by the prestimulus: TNFα (p=0.01), IL-6 (p=0.03); these effects are mediated by TLR4. There was a reduction in phosphorylation of NFκappaB and p-38 in prestimulated cells and an increase of c-Jun phosphorylation by simultaneous stimulation.

Conclusions Mast cells manifest tolerance to LPS and interaction between TLR4 and FcεR1 was demonstrated by synergism and attenuation, suggesting connection in inflammatory processes of infectious and allergic origins via the TLR4-NFκappaB pathway. The mediators responsible for these effects in mast cells may be defined and explored in the modulation of the inflammatory response associated with septic or allergic processes in future studies.

Key words: sepsis, innate immunity, mast cells, endotoxin tolerance, lipopolysaccharide, Toll-Like receptors, high affinity immunoglobulin E receptors.

S254 Saturnino, Saulo Fernandes.
Mastócitos receptores tipo Toll e Sepsis [manuscrito] :
manifestação de tolerância induzida por lipopolissacárides como
modelo para o estudo de modulação de resposta inflamatória / Saulo
Fernandes Saturnino. - 2008.

59 f. : il.

Orientador: Marcus Vinícius Melo de Andrade.

Co-orientador: José Renan da Cunha Melo.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais,
Faculdade de Medicina.

1. Mastócitos. 2. Imunidade inata. 3. Receptores tipo Toll. 4.
Sepsis. I. Andrade, Marcus Vinícius Melo de. II. Melo, José Renan
da Cunha. III. Título.

NLM: W427i

CDU: 612.017

