

Universidade Federal de Goiás
Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública
Programa de Pós-Graduação em Medicina
Tropical

Hélio Galdino Júnior

**Produção de fator de necrose tumoral (TNF) em
hemoculturas humanas induzida por agonistas de TLR2
(*toll*-like receptor 2): modulação pelo fator ativador de
plaquetas (PAF)**

**Orientadora:
Prof. Dra. Fátima Ribeiro Dias**

Goiânia-GO 2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Universidade Federal de Goiás
Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública
Programa de Pós-Graduação em Medicina
Tropical

Hélio Galdino Júnior

**Produção de fator de necrose tumoral (TNF) em
hemoculturas humanas induzida por agonistas de TLR2
(*toll*-like receptor 2): modulação pelo fator ativador de
plaquetas (PAF)**

**Orientadora:
Prof. Dra. Fátima Ribeiro Dias**

Dissertação submetida ao PPGMT/IPTSP/UFG
como requisito parcial para a obtenção do Grau
de Mestre em Medicina Tropical, na área de
concentração em Imunologia.

Este trabalho foi realizado com o auxílio financeiro do CNPq.

Goiânia-GO 2008

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(GPT/BC/UFG)

Galdino Júnior, Hélio.
G149p Produção de fator de necrose tumoral (TNF) em hemoculturas humanas induzida por agonistas de TLR2 (toll-like receptor 2) [manuscrito]: modulação pelo fator ativador de plaquetas (PAF) / Hélio Galdino Júnior . – 2008.
74 f.: il., figs.

Orientadora: Profa. Dra. Fátima Ribeiro-Dias.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, 2008.

Bibliografia: f.60-74

Inclui listas de figuras e de abreviaturas.

1. Imunidade inata 2. Fator de necrose de tumor (TNF) 3. Fator ativador de plaquetas (PAF) 4. Toll-like receptor 2 I. Ribeiro-Dias, Fátima. II. Universidade Federal de Goiás, **Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública** III. Título.

CDU: 612.017

"De absoluto só a Relatividade" (Einstein)

AGRADECIMENTOS

Aos meus queridos pais, Dayse e Hélio, pelo investimento de amor, carinho, força e por financiarem os meus estudos até a graduação; pelo apoio e respeito nesse segundo passo, à pós-graduação.

Aos professores da Graduação, por incitarem a vontade de continuar a buscar conhecimentos por meio da pesquisa.

A professora Dra. Fátima Dias, pela imensa paciência e amor ao ensinar, pela amizade e consideração, por ter me dado a oportunidade de começar como monitor na sua disciplina, posteriormente permitiu-me conhecer o universo da pesquisa científica como bolsista do CNPq e enfim, ter me concedido esse grande crédito de ser seu aluno de Mestrado; pelos seis anos de convivência aprendendo não somente a pesquisar, mas também, crescendo como ser humano, pois seus exemplos éticos e morais atingem todos os que têm a grande oportunidade de estar ao seu lado.

A professora Dra. Miriam Dorta, pela alegria contagiante, pelos momentos em que na ausência da Fátima, soube me ouvir e me auxiliar quando possível.

Ao professor Dr. Milton Oliveira, pela generosidade de oferecer seu laboratório para a realização da técnica de ELISA.

Ao prof. Wilson de Melo, pelo auxílio com material e apoio técnico para a realização da citometria de fluxo.

A Dra. Elisângela Ribeiro, pelas horas dedicadas às aquisições e análises das citometrias de Fluxo.

A profa. Dra. Fabiana Pimenta, pela gentileza em ceder as bactérias utilizadas neste trabalho.

Ao prof. Dr. Luiz Carlos Crocco Afonso, da Universidade Federal de Ouro Preto, pelas células B154.9.2 e pela gentileza em ceder o anticorpo anti-TNF purificado.

Ao mestrando Hermínio Maurício da Rocha Sobrinho, pelo auxílio com a colheita das amostras de sangue e pela realização da eletroforese das lipoproteínas.

Aos funcionários e ao diretor do Banco de Sangue do Hospital das Clínicas da UFG, bem como aos doadores de sangue, pela concordância em participarem do estudo.

A minha companheira de mestrado, Rosidete Pereira de Bastos, pelo auxílio, pela amizade, pela paciência de ouvir minhas queixas quando achava que nada estava dando certo.

A todos os colegas do laboratório que tive grande satisfação de conhecer desde 2001 quando comecei minhas atividades com este grupo, até aqui já passou muita gente... Camila, Fábio, Neemias, Rafael, Daisy, Selma, Leonardo, Carina, Ludimilla, Carolina, Renata, Geovana, Gabriela, Alause, Tatiana, Milla, Renata Jarach e Cibeli.

A todos os professores do Setor de Imunologia/DMIPP/IPTSP, por compartilharem seus conhecimentos durante as disciplinas da pós-graduação e aos colegas de mestrado dos outros laboratórios pela troca de experiências nas disciplinas.

A todos os amigos pelos momentos de alegria e pela companhia nas horas difíceis.

Aos Colegas de trabalho do Hospital de Doenças Tropicais, por colaborarem com minha escala de trabalho, permitindo assim, a minha ausência do trabalho quando necessário.

A Inteligência Suprema do Universo, Deus, por ter me dado a oportunidade de nascer junto à família que eu amo e por ter me colocado em contato com todas essas pessoas maravilhosas que tornaram possível realizar este projeto.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Sinalização via TLR e regulação negativa da via de sinalização TLR	7
Figura 2 - Perfil eletroforético das LAMPf de <i>Mycoplasma fermentans</i> PG18.....	28
Figura 3 - LAMPf e agonistas de TLR2 (<i>Pam₃Cys</i>) e TLR4 (LPS) induzem NO em macrófagos murinos RAW 264.7.....	30
Figura 4 - O tratamento com sulfato de polimixina B (PMB) não alterou a indução de NO pelas LAMPf.....	31
Figura 5 - As LAMPf e agonistas de TLR4 (LPS) e TLR2 (<i>Pam₃Cys</i>) induzem a produção de TNF em macrófagos murinos RAW 264.7.....	32
Figura 6 - Curso temporal da produção de TNF induzida por agonistas de TLR2 e TLR4 nas hemoculturas humanas.....	33
Figura 7 - A produção de TNF nas hemoculturas humanas induzida por agonistas de TLR2 ou TLR4 é dependente da concentração dos agonistas.....	34
Figura 8 - Agonistas de TLR2 induzem uma menor produção de TNF do que agonistas de TLR4 em hemoculturas humanas.....	36
Figura 9 - Antagonista de PAF aumenta a produção de TNF induzida por agonista de TLR2 (<i>Pam₃Cys</i>).....	37
Figura 10 - Os efeitos do PAF na produção de TNF induzido por agonistas de TLR são dependentes do momento em que o PAF age nas células.....	38
Figura 11 - PAF exógeno, de maneira dependente da concentração, aumenta a produção de TNF induzida por agonistas de TLR2.....	40
Figura 12 - Pré-estimulação com PAF é mais eficiente para aumentar a produção de TNF induzido por agonistas de TLR2 do que a estimulação simultânea com o agonista.....	41
Figura 13 - A pré-estimulação com PAF não altera a expressão de TLR2 em granulócitos.....	42
Figura 14 - A pré-estimulação com PAF não altera a expressão de TLR2 em monócitos.....	43
Figura 15 - <i>Staphylococcus aureus</i> ou <i>Escherichia coli</i> induzem altos níveis de TNF nas hemoculturas, de maneira dependente do tempo e da concentração bacteriana.....	45
Figura 16 - Antagonista de PAF diminui a produção de TNF induzida por <i>S. aureus</i>	46
Figura 17 - Avaliação da modulação da produção de TNF induzida por bactéria Gram positiva ou Gram negativa pelo PAF exógeno.....	47

LISTA DE ABREVIATURAS

AA: Ácido araquidônico

CO₂: Gás Carbônico

CD14: marcador fenotípico presente em monócitos/macrófagos/PMN

DAG: diacilglicerol

DNA: Ácido desoxiribonucléico

DO: Densidade Óptica

ELISA: Ensaio Imunoenzimático

ERK: Quinases reguladas por sinais extracelulares

FITC: Fluorescein isothiocyanate – Isotiocianato de fluoresceína

GM-CSF: *granulocyte and macrophage colony-stimulating factor* - Fator estimulador de colônia de granulócitos e macrófagos

GPCR: *G protein-coupled receptor* – receptor acoplado a proteínas G

IP₃: Inositol triphosphate - Trifosfato inositol

IRAK: *IL-1R-associated kinases* - quinase associada ao receptor da IL-1

IL: Interleucina

IFN: Interferon

IgE: Imunoglobulina E

IRF: *Interferon regulatory factor* - Fator de transcrição regulador de IFN

JNK: c-jun NH₂-terminal quinase

LAMPf : *Lipid-associated membrane proteins of M. fermentans* -ipoproteínas associada a membrana de *Mycoplasma fermentans*

LPS: Lipopolissacarídeo

LBP: Proteína de ligação ao LPS

LT: Linfotoxina

LTA: Lipoteicoic acid - Ácido lipoteicóico

MALP-2: Lipopeptídeo ativador de macrófagos de 2KDa

M-CSF: *macrophage colony-stimulating factor* - Fator estimulador de colônia de macrófagos

MyD88: *Myeloid differentiation protein 88* - Proteína de diferenciação mielóide 88

Mal: *MyD88 adaptor-like* - Adaptador semelhante MyD88

MAPK: *Mitogen-activated protein kinases* - proteína quinase ativada por mitógeno

mIgG: Imunoglobulina G monoclonal

NK: Natural Killer

NO: *nitric oxide* - Óxido Nítrico

PAMPs: *pathogen-associated molecular patterns* - Padrões moleculares associados a patógenos

PMN: Polimorfonucleares

PGN: Peptideoglicano

PAF: *Platelet-activating factor* - Fator ativador de plaquetas

PLA₂: Fosfolipase A₂

PAF-AH: PAF - acetilhidrolase

cPLA₂ Fosfolipase A₂ citosólica

PLC: fosfolipase C

PIP₂: Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato

PKC: proteína quinase C

PMB: Polimixina B

PE: Ficoeritrina

PBS: salina tamponada com fosfato

RNA: Ácido ribonucléico

ROI: espécies reativas do oxigênio

SFB: Soro Fetal Bovino

SDS-PAGE: Dodecil sulfato de sódio. Eletroforese em gel de poliacrilamida.

TIR: *Toll/Interleukin-1 receptor* - Receptor Toll/IL-1

TIRAP: *TIR domain-containing adaptor protein* - Proteína adaptadora contendo domínio TIR

TLR: Toll-like receptor – Receptor similar ao Toll

TNF: *tumor necrosis factor* α – Fator de necrose tumoral alfa

TNF-R: Receptor para o TNF

TRAF: *TNF receptor-associated factor 6* - Fator associado ao receptor do TNF

SUMÁRIO

1. Introdução	1
1.1 Os receptores similares a proteína Toll (TLR, Toll-Like receptors).....	1
1.2 Fator de Necrose Tumoral (TNF).....	8
1.3 Fator ativador de Plaquetas (PAF).....	11
1.4 As interações entre o PAF e o TNF.....	15
1.5 A conexão TLR-PAF-TNF na ativação celular por PAMPs bacterianos.....	17
2. Objetivos	19
2.1 Objetivo Geral.....	19
2.2 Objetivos Específicos.....	19
3. Materiais e Métodos	20
3.1 Aspectos éticos e doadores.....	20
3.2 Obtenção dos micoplasmas.....	20
3.3 Extração das lipoproteínas.....	20
3.4 Eletroforese em gel de poliacrilamida.....	21
3.5 Cultura de linhagens celulares RAW 264.7 e L929.....	22
3.6 Cultivo de RAW 264.7 com agonista de TLR2 ou TLR4.....	23
3.7 Determinação das concentrações de nitrito.....	23
3.8 Bioensaio para detecção de TNF murino.....	24
3.9 Preparação das bactérias.....	24
3.10 Hemoculturas com agonistas de TLR e tratamentos com PAF ou antagonista de PAF.....	25
3.11 Citometria de Fluxo.....	25
3.12 Dosagem de TNF humano por ELISA.....	26
3.13 Análise Estatística.....	27
4. Resultados	28
4.1 Avaliação da atividade biológica das lipoproteínas de <i>Mycoplasma fermentans</i>	28
4.2 Indução de TNF por agonistas de TLR2 e de TLR4 em hemoculturas humanas.....	33
4.3 Produção de TNF induzida pelos agonistas de TLR2 ou TLR4: modulação pelo PAF.....	36
4.4 Produção de TNF induzida por bactérias Gram positiva (<i>Staphylococcus aureus</i>) ou Gram negativa (<i>Escherichia coli</i>) em hemoculturas e sua modulação pelo PAF.....	44
5. Discussão	48
6. Conclusões	59
Conclusão Geral.....	59
Conclusões Pontuais.....	59
7. Referências	60

RESUMO

Os microrganismos expressam moléculas conservadas que ativam as células do sistema imune inato. Estas são conhecidas como padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs), tais como o lipopolissacarídeo (LPS) e as lipoproteínas bacterianas. Estes PAMPs são reconhecidos por receptores da família dos *Toll-like receptors* (TLR). A ativação das células da imunidade natural via TLR induz a produção de citocinas e mediadores lipídicos pro-inflamatórios dentre eles, o fator de necrose tumoral (TNF) e o fator ativador de plaquetas (PAF), respectivamente. A modulação da produção de TNF induzida por agonista de TLR4 (o LPS), pelo PAF, é conhecida, no entanto, a interação entre PAF e outros TLR foi pouco investigada. O presente trabalho teve o objetivo de avaliar a atividade moduladora do PAF na produção de TNF induzida por agonistas de TLR2. Para isto, foram utilizados as lipoproteínas de *Mycoplasma fermentans* PG 18 (LAMPf), agonistas de TLR2/TLR6 e o Pam₃Cys, um lipopeptídeo sintético agonista de TLR2/TLR1. Culturas de sangue total periférico humano foram ativadas com os agonistas de TLR2 ou TLR4 e o TNF foi avaliado nos sobrenadantes, por meio do ELISA. Para avaliar os efeitos do PAF endógeno na produção do TNF, foi utilizado o antagonista do receptor do PAF (PAFR), o WEB2170, e para avaliar o efeito do PAF exógeno, o PAF foi adicionado às hemoculturas. As hemoculturas também foram ativadas com bactérias inteiras (*S. aureus* ou *E. coli*) inativadas pelo calor. A expressão de TLR2 em polimorfonucleares (PMN) e monócitos foi avaliada por citometria de fluxo, analisando a celularidade total para os PMN e as células CD14⁺, para os monócitos. As LAMPf, Pam₃Cys ou LPS induziram TNF nas hemoculturas. O tratamento com WEB2170 aumentou a produção de TNF nas hemoculturas estimuladas com agonistas de TLR2, mas não de TLR4. A pré-estimulação das hemoculturas com o PAF aumentou a produção de TNF induzida pelos agonistas de TLR2. A adição de PAF não causou alterações significantes na produção de TNF induzida pelo LPS. Nos ensaios com as bactérias inteiras, *E. coli* induziu maiores concentrações de TNF do que *S. aureus*. O tratamento com WEB2170 das hemoculturas estimuladas com *S. aureus* reduziu a produção de TNF, no entanto, a adição de PAF não alterou significantemente a produção de TNF nas hemoculturas estimuladas com as bactérias. Para *E. coli*, nem o tratamento com WEB2170, nem com o PAF alterou significantemente a produção de TNF. Os resultados indicam que o PAF pode aumentar ou diminuir a produção de TNF induzida por agonista de TLR2, dependendo do momento em que ele ativa o PAFR em relação à ativação do TLR2. O aumento da produção de TNF após prolongada pré-ativação das hemoculturas com o PAF não foi devido a um aumento na expressão de TLR2. Assim, é sugerido que a interação entre as vias bioquímicas de sinalização do PAFR e do TLR2 determina o nível de produção de TNF. A via de sinalização TLR2/PAF/TNF pode ser importante na imunidade inata contra infecções causadas por bactérias Gram positivas tão bem quanto em doenças inflamatórias.

ABSTRACT

Microorganisms express conserved molecules which ones activate the innate immune system. These molecules are known as pathogen-associated molecular patterns (PAMPs), such as lipopolysaccharide (LPS) and bacterial lipoproteins. The PAMPs can be recognized by *Toll-like receptors* (TLR). The innate immunity activation through TLR pathway induces pro-inflammatory cytokines and lipid mediators, as tumor necrosis factor (TNF) and platelet-activating factor (PAF), respectively. Several reports showed the interaction between TLR4 and PAF receptor (PAFR) signaling to the TNF production; however, the interaction between PAF and other TLR was poorly investigated. The aim of this study was to evaluate the PAF regulatory activity on TLR2-induced TNF production. Thus, *Mycoplasma fermentans* PG 18 lipoproteins (LAMPf), TLR2/TLR6 agonists and Pam₃Cys, a synthetic lipopeptide agonist of TLR2/TLR1 were added to human whole blood cultures and TNF was evaluated by enzyme-linked immunosorbent assay. To evaluate the effects of endogenous PAF on TNF production, a PAF receptor antagonist, WEB2170 was used, and to evaluate the effect of exogenous PAF, PAF was added to the cultures. The blood cultures were also activated with Gram-positive or negative heat-killed bacteria (*Staphylococcus aureus* or *Escherichia coli*). The TLR2 expression on polymorphonuclear (PMN) and monocytes were evaluated by flow cytometry, analyzing total cellularity for PMN and CD14+ cells for monocytes. LAMPf, Pam₃Cys or LPS induced TNF and the treatment with WEB2170 increased TNF production after TLR2 activation, but not after TLR4 activation. Priming of the blood cultures with PAF up regulated TLR2-induced TNF production. Addition of PAF did not alter TNF release induced by LPS. *E. coli* induced higher levels of TNF than *S. aureus* and the treatment with WEB2170 lead to a significant reduction of *S. aureus*-induced TNF release. However, addition of PAF did not significantly alter bacteria-induced TNF production. With *E. coli* neither treatment with WEB2170 nor with PAF modulated TNF release. Results indicate that PAF can increase or decrease TNF production induced by TLR2 depending on the time when PAF is combined with TLR2. The increase of the TNF production after extended priming with PAF it was not caused by an increase in TLR2 expression. Thus, it is suggested that interaction between PAFR and TLR2 signaling determines the levels of TNF release. TLR2/PAF/TNF signaling pathway can be relevant in innate immune responses against Gram positive bacteria as well as in inflammatory diseases.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Os receptores similares à proteína *Toll* (TLR, *Toll-like receptors*)

Os padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs, *pathogen-associated molecular patterns*) são moléculas vitais para os microrganismos e altamente conservadas, sendo representados por carboidratos, proteínas, lipídios e ácidos nucleicos. O sistema imune inato possui uma família de receptores que reconhecem PAMPs dos diversos microrganismos e sinalizam a presença dos patógenos. Entre estes receptores, os receptores similares à *Toll* (TLR, *Toll-like receptors*) representam importantes moléculas para a identificação de bactérias, vírus, fungos e protozoários (Medzhitov et al. 1997; Albiger et al. 2007).

Os TLR são estruturalmente caracterizados pela presença de um domínio rico em leucina em sua porção extracelular, compondo o sítio de ligação ao PAMP. Inicialmente, foram descritos 10 TLR e estes foram agrupados em cinco subfamílias, sendo esta subdivisão baseada na similaridade das seqüências de aminoácidos e também nas suas estruturas genômicas: TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, e TLR9. A subfamília TLR2 compreende os receptores TLR2, TLR1 e TLR6, e na subfamília do TLR9 estão incluídos os receptores TLR9, TLR8 e TLR7. O TLR3 reconhece RNA de dupla fita, um PAMP viral. Também reconhecem PAMPs virais, os TLR7 e 8 (para RNA de fita simples). Já os TLR5, TLR4 e TLR9 reconhecem PAMPs bacterianos, como a flagelina, o lipopolissacarídeo (LPS) e motivos de CpG DNA não metilados, respectivamente. O TLR2 é o TLR com maior número de ligantes identificados até o momento, sendo capaz de reconhecer PAMPs de bactérias Gram negativas, Gram positivas, micoplasmas, protozoários e fungos (Takeda et al. 2003; Albiger et al. 2007). O TLR11, em camundongos, reconhece bactérias uropatogênicas (Zhang et al. 2004) e também a profilina, uma proteína de *Toxoplasma gondii*. Assim, TLR5 e TLR11 ligam proteínas. Ainda em camundongos, foram descritos os TLR12 e TLR13, cujos ligantes ainda não foram identificados (Albiger et al. 2007).

Os TLR são expressos em várias células do sistema imune inato, tais como, monócitos, macrófagos, células dendríticas em diferentes estágios de maturação e subtipos, mastócitos e polimorfonucleares (PMN). E, além dessas,

as células epiteliais das mucosas também expressam os TLR, que podem estar presentes na membrana das células e/ou nos compartimentos citosólicos. Em geral, os TLR1, 2, 4, 5 e 6 são expressos nas membranas celulares, enquanto os TLR3, 7, 8 e 9 são expressos intracelularmente (Takeda et al. 2003). O TLR4 foi encontrado na superfície de monócitos, porém a sua expressão na membrana das células dendríticas, que são derivadas dos monócitos, é muito baixa. A expressão intracelular do TLR4 é descrita tanto em monócitos quanto em células dendríticas (Uronen-Hansson 2004). Flo et al. (2001) analisaram a expressão de TLR2 nas células do sangue humano e encontraram a expressão deste receptor em altos níveis em monócitos, seguidos por granulócitos, linfócitos B e T. Visintin et al. (2001) caracterizaram a expressão de TLR em monócitos humanos e acompanharam a regulação desses receptores, mostrando que durante o estágio de diferenciação dos monócitos em células dendríticas imaturas e posteriormente maduras, há mudanças no padrão da expressão dos TLR, e que esta mudança é compatível com a função que a célula irá exercer em cada estágio.

O LPS de bactéria Gram negativa é composto por uma parte lipídica, o lipídio A, ligado a uma cadeia polissacarídica. O lipídio A está associado a fosfatos e ácidos graxos, e variações nesta composição resultam em ligações mais ou menos eficazes ao TLR4, variando o grau da resposta inflamatória induzida no hospedeiro (Albiger et al. 2007). Para o reconhecimento do LPS é necessária a ligação do LPS à proteína ligante de LPS, a LPB (*lipopolysaccharide-binding protein*) presente no soro, que carrega a molécula de LPS para o reconhecimento pela molécula CD14, presente na membrana celular. Ocorre, então, uma interação entre o LPS e o TLR4 e a associação da proteína extracelular denominada MD-2. Esta interação leva à ativação de vias bioquímicas que culminam na translocação de fatores de transcrição para o núcleo, com a consequente produção de citocinas pró-inflamatórias pelas células ativadas (Underhill & Ozinski 2002). Embora o TLR4 tenha como principal agonista o LPS de bactérias Gram negativas, outros PAMPs, como a pneumolisina (*Streptococcus pneumoniae*) e proteínas de envelope viral, bem como proteínas endógenas, tais como as proteínas do choque térmico e fibrinogênio, são ligantes de TLR4 (Albiger et al. 2007).

O TLR2 reconhece lipoproteínas de bactérias Gram negativas e Gram positivas (Lien et al. 1999), peptídeoglicano (PGN) e ácido lipoteicoico (LTA) de

bactérias Gram positivas (Schwadner et al. 1999), estruturas da parede celular micobacteriana (Means et al. 1999) e até mesmo zimozan, um componente de parede celular de fungos (Underhill 1999). As lipoproteínas de *Mycoplasma fermentans* (LAMPf, *Lipid-associated membrane proteins of M. fermentans*) ativam células expressando TLR2, induzindo a produção de fator de necrose tumoral alfa, o TNF α (*tumor necrosis factor α*), uma citocina pró-inflamatória (Lien et al. 1999; Nishiguchi et al. 2001; Seya & Matsumoto 2002). As lipoproteínas de micoplasma são diaciladas, enquanto as das demais bactérias são triaciladas (Chambaud et al. 1999). Takeuchi et al. (2001) demonstraram que para o reconhecimento do lipopeptídeo MALP-2 (extraído de lipoproteína de *M. fermentans*) é necessária a heterodimerização de TLR2 com TLR6. Para reconhecer lipopeptídios triacilados, tal como o lipopeptídeo sintético Pam₃Cys (tripalmitoyl-S-glycero-Cys-(Lys)), o TLR2 forma heterodímero com TLR1 (Takeuchi et al. 2002). A heterodimerização de TLR, ou mesmo a necessidade de três TLR diferentes, como TLR1/TLR2/TLR6 para o reconhecimento de lipoproteínas de *M. pneumoniae* (Shimizu et al. 2005), amplia o repertório de PAMPs que podem ser reconhecidos pelas células da imunidade inata. Assim, as respostas do hospedeiro aos PAMPs de bactérias podem ser mediadas especialmente pelos receptores TLR2, na forma de homodímero ou em associação com TLR6 ou TLR1, e por TLR4. Bactéria Gram negativa, além de ativar as células via TLR4, pode também ativar via TLR2, no entanto, bactéria Gram positiva usa a via do TLR2, mas parece ativar as células de maneira independente de TLR4 (Elson et al. 2007).

Os TLR são expressos constitutivamente em várias células, mas a expressão destes receptores pode ser modulada por vários produtos microbianos ou citocinas. O LPS induz aumento de TLR2 em macrófagos e neutrófilos, tanto após injeção *in vivo*, quanto após tratamento *in vitro* destas células, sem alterar ou diminuindo a expressão de TLR4 (Kurt-Jones et al. 2002). Citocinas tais como os fatores de crescimento de macrófagos e de neutrófilos (M-CSF e GM-CSF, *macrophage colony-stimulating factor* e *granulocyte and macrophage colony-stimulating factor*), interleucina-15 (IL-15) e interferon gama (IFN γ), interleucina-1 β (IL-1 β) e TNF aumentam a expressão de TLR2 em monócitos/macrófagos e neutrófilos. O IFN γ e o M-CSF aumentam também a expressão de TLR4 em

monócitos, porém o IFN γ diminui a expressão de TLR5 nestas células. A expressão de TLR4 em neutrófilos é aumentada pelo tratamento com GM-CSF (Mita et al. 2001; Kurt-Jones et al. 2002; Takeda et al. 2003, O'Mahony et al. 2008). Assim, as citocinas que aumentam a atividade microbicida dos fagócitos, além de ativarem as células via seus receptores específicos, também amplificam as respostas microbicidas e inflamatórias por meio do aumento da expressão dos TLR.

Como referido acima, os TLR possuem um domínio extracelular rico em leucina, envolvido no reconhecimento dos PAMPs e, para a transdução dos sinais dos agonistas, possuem um domínio intracelular denominado TIR (*Toll/Interleukin-1 receptor*), que leva à ativação dos fatores de transcrição NF κ B e AP-1 e à liberação de citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas e moléculas acessórias. A via de sinalização dos TLR inclui, inicialmente, a fosforilação do TLR dependente de proteína tirosina quinase (Chen et al. 2003), seguida do recrutamento de proteínas adaptadoras, a MyD88 (*Myeloid differentiation protein 88*), presente na via de sinalização de todos os TLR, exceto o TLR3, e a Mal/TIRAP (*Mal, MyD88 adaptor-like* ou *TIRAP, TIR domain-containing adaptor protein*), presente na via de sinalização de TLR4 e TLR2 (Fitzgerald et al. 2001; Mansell et al. 2004; Kawai & Akira 2007). Em seguida, a MyD88 ativa as quinases IRAK1 e 4 (*IL-1R-associated kinases*). A hiperfosforilação destas quinases leva à associação de TRAF6 (*TNF receptor-associated factor 6*), ocasionando a ativação de quinases do complexo I κ B, de c-jun NH₂-terminal quinase (JNK), p38 e ERK1/2 (MAPK, *Mitogen-activated protein kinases*). Conseqüentemente, ocorre a ativação de NF κ B e de AP-1, levando à secreção de citocinas e quimiocinas, tais como a IL-1, TNF α , IL-12 e IL-8, além da expressão de cicloxigenase-2 e produção de prostaglandinas e de óxido nítrico (NO, *nitric oxide*) (Scherle et al. 1998; Hacker et al. 2000; Hume et al. 2001; Jones et al. 2001; Khan et al. 2004). A via da Mal/TIRAP ativa IRAK-2 e interage diretamente com o TRAF6, para gerar a ativação de MAPK e de NF κ B (Fitzgerald et al. 2001; Mansell et al. 2004).

Uma via alternativa à via da MyD88 foi definida, na qual é utilizada a proteína adaptadora TRIF (*TIR domain-containing adaptor inducing IFN β*), que ativa o fator de transcrição regulador do interferon, o IRF-3, para gerar produção de interferons do tipo I. Esta via é associada ao TLR3 e ao TLR4, sendo o TLR3 o

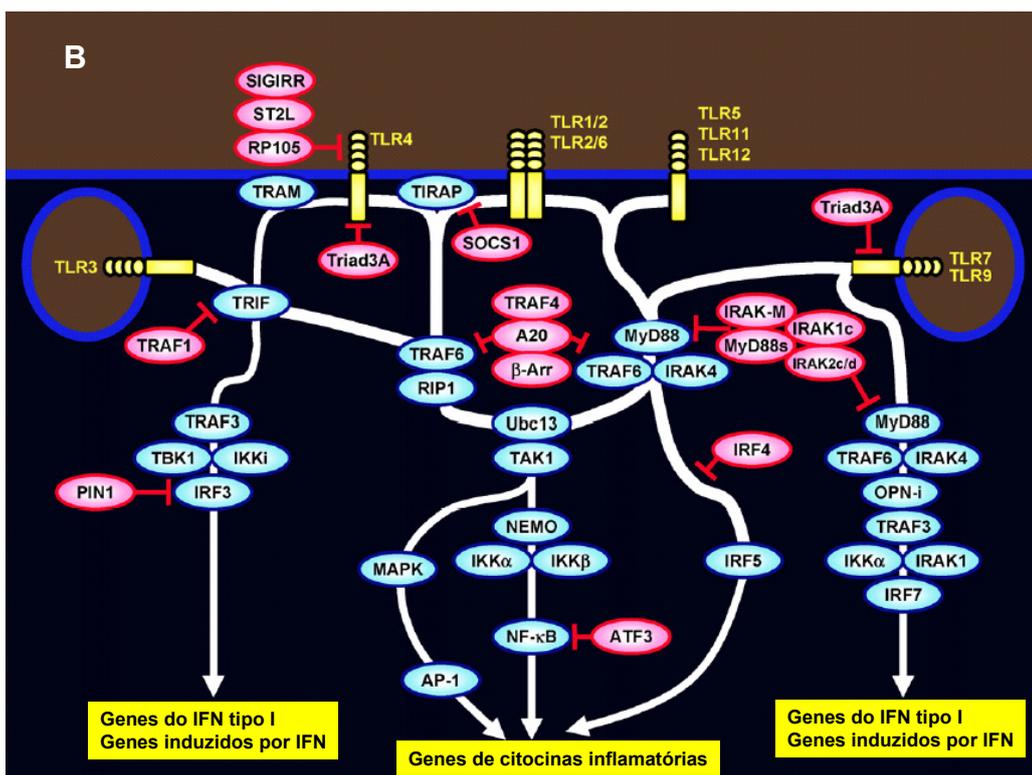
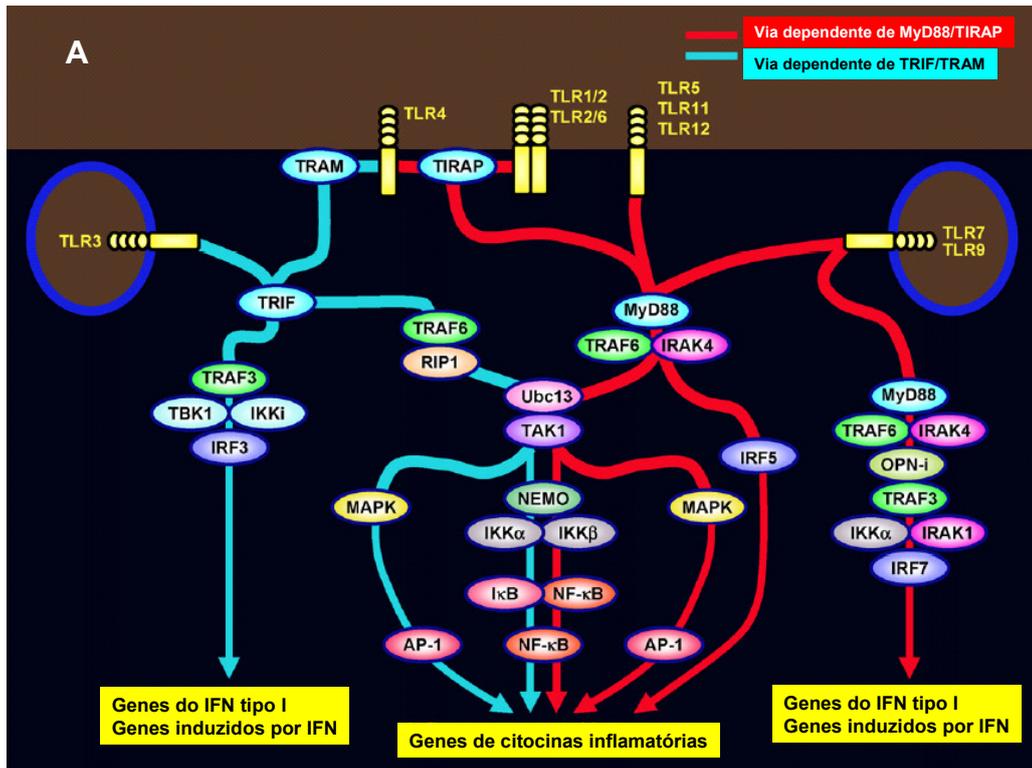
único TLR com via de sinalização totalmente independente de MyD88. Para recrutar a proteína TRIF, o TLR4 necessita de uma outra proteína adaptadora que é a TRAM (*TRIF-related adapter molecule*), a qual não é necessária para a via TLR3. Assim, a TRAM é uma molécula específica da via de ativação TLR4 independente de MyD88 (Verstak et al. 2007; Kawai & Akira 2007).

A ativação dos TLR deve ser finamente regulada para que não haja uma resposta inflamatória deletéria ao organismo. Alguns reguladores já existem constitutivamente, enquanto outros são induzidos após a ativação celular, gerando uma alça de retro-alimentação negativa. Os TLR2 e TLR4 podem ser secretados naturalmente, assim, na forma solúvel no micro-ambiente (sTLR2 e sTLR4), competem com os TLR nas membranas celulares, diminuindo a sinalização. Receptores transmembrânicos, tais como RP105, ST2L e SIGIRR (*single immunoglobulin IL-1R-related molecule*), interferem com a sinalização TLR. O RP105 impede a ligação entre o LPS e o TLR4/MD2, inibindo o reconhecimento específico deste PAMP (Kawai & Akira 2007); o ST2L, o qual é expresso na membrana celular somente após ativação, sequestra MyD88 e Mal do domínio TIR do TLR4, inibindo o início da cascata de ativação (Brint et al. 2004); e o SIGIRR interage com TLR4, 5 e 9, com TRAF6 e IRAK, dificultando o recrutamento destas últimas moléculas para o domínio TIR dos TLR (Wald et al. 2003). Várias moléculas, presentes intracelularmente, interferem com as etapas iniciais da via sinalização TLR, entre elas podem ser citadas a IRAK-M, que inibe a interação IRAK-1/TRAF6; e as diferentes isoformas de IRAK1 e 2, o MyD88 na forma solúvel, e os TRAF1 e 4, os quais inibem o recrutamento de MyD88, TRAF6 e a ativação das IRAK (Liew et al. 2005; Kawai & Akira 2007).

O TRAF6 é uma molécula essencial na via de ativação dos TLR e ele pode ser regulado de várias maneiras, uma delas envolve as β -arrestinas, que são proteínas ubiquamente expressas, multifuncionais, envolvidas na dessensibilização de receptores e ligação a várias moléculas sinalizadoras. Após ativação com LPS, a β -arrestina interage com o TRAF6, prevenindo sua auto-ubiquitinação e ativação dos fatores de transcrição NF κ B e AP-1 (Wang et al. 2006). A ligação de ubiquitina ao TRAF6 é essencial para a sua atividade, assim, outra forma de regular o TRAF6 é retirar a ubiquitina dele, o que é feito pela cisteína protease A20 (Kawai & Akira 2007).

Após ativação via TLR2 ou TLR4, há ativação da enzima PI3K (*phosphatidylinositol 3-kinase*), que cataliza a fosforilação de lipídios inositol na membrana celular, gerando fosfatidilinositol 3, 4, 5-trifosfato e 3,4-bifosfato, que modulam as funções de várias enzimas. A ativação desta via pode regular negativamente as respostas inflamatórias disparadas por TLR (Guha & Mackman 2002; Fukao & Koyasu 2003). Um dos mecanismos da inibição via PI3K pode envolver a Tollip (*Toll-interacting protein*). A Tollip possui um domínio de ligação para fosfatidilinositol gerado pela atividade da PI3K, adquirindo capacidade inibitória do sinal do TLR via inibição da IRAK1 (Li et al. 2004).

Outras formas de controlar o sinal TLR são: a degradação de moléculas importantes para a sinalização, o controle da expressão dos TLR e o controle da morte ou sobrevivência celular. Podem ser ressaltados aqui, a atividade da ligase Triad3A, que causa a degradação de TLR4 e 9 por uma via dependente de proteassomo; a atividade da SOCS1 (*supressor of cytokine signaling 1*), a qual se associa a Mal fosforilada, causando a adição de ubiquitina e subsequente degradação desta molécula adaptadora; a ação de citocinas, tais como o TGF β 1 (*transforming growth factor β 1*), que inibe a expressão de TLR4 e induz degradação de MyD88; e a ativação de domínios de morte das proteínas adaptadoras (MyD88 e Mal) que ativam caspase-8, causando a morte da célula ativada (Liew et al. 2005; Mansell et al. 2006; Kawai & Akira 2007). Uma visão geral das vias de sinalização dos TLR é mostrada na Figura 1A, bem como a regulação da sinalização, é mostrada na Figura 1B.



Kawai & Akira, *Seminars in Immunology* 19 (2007): 24-32

Figura 1. Sinalização via TLR (A) e regulação negativa da via de sinalização TLR (B). Em A, as vias dependente de MyD88/Mal/Tirap e dependente de TRIF/TRAM, levam à ativação dos fatores de transcrição $\text{NF-}\kappa\text{B}$ e AP-1, bem como aos IRFs, respectivamente. Em B, as vias de controle da sinalização. Siglas e descrição, no texto acima.

Portanto, uma resposta adequada dos componentes celulares da imunidade inata, para garantir proteção contra agentes infecciosos e uma resposta inflamatória controlada, deve contar com a ativação dos TLR e subsequente regulação das vias de sinalização. Quaisquer perturbações no controle destas vias podem ser responsáveis pela patogenia da sepse, choque séptico ou doenças inflamatórias crônicas. Uma das principais citocinas pró-inflamatórias liberadas após a ativação dos leucócitos, via TLR, é o TNF, cujas propriedades serão descritas em seguida.

1.2. O Fator de Necrose Tumoral (TNF)

O TNF foi descrito em 1975 como um fator solúvel no soro capaz de provocar a necrose de células tumorais (Carswell et al. 1975). O TNF é uma citocina pró-inflamatória com efeitos pleiotrópicos, que possui importantes funções, tais como a indução de outras citocinas e mediadores lipídicos da inflamação, de proliferação, diferenciação celular e apoptose. O TNF é induzido por vários estímulos, incluindo microrganismos, mediadores lipídicos, imune complexos, células tumorais e citocinas. PAMPs microbianos, atuando em TLR, induzem a produção de TNF, que é uma citocina produzida rapidamente e que induz uma cascata de mediadores inflamatórios (Bemelmans et al. 1996; Togbe et al. 2007; Tracey et al. 2008).

Existem três diferentes classes de TNF, o TNF, a linfotoxina (LT) α e a LT $\alpha\beta$. O TNF existe em duas formas, solúvel e ligado à membrana celular. A forma solúvel é liberada das células após a clivagem enzimática do seu precursor ligado à membrana. A enzima responsável por esse processo é a TACE (do inglês, *TNF-alpha-converting enzyme*). Ambas as formas são biologicamente ativas. As células que expressam na membrana ou secretam TNF são principalmente os macrófagos e monócitos ativados, linfócitos, mastócitos, granulócitos, fibroblastos, células NK (*Natural Killer*) e células epiteliais (Beutler & Cerami 1989; Tracey et al. 2008).

As atividades biológicas do TNF são mediadas pela sua interação com seus receptores específicos, os quais fazem parte de uma superfamília de proteínas. O TNF pode exercer seus efeitos pela interação com dois subtipos de receptores (TNFR), que são o TNFR1 (p55 ou CD120a), constitutivamente

expresso em todas as células, com exceção dos eritrócitos, e o TNFR2 (p75 ou CD120b), que é geralmente induzido e preferencialmente expresso em células endoteliais e em células hematopoéticas. Esses receptores são proteínas transmembrânicas tipo I, com um a cinco motivos ricos em cisteína no seu domínio extracelular e um domínio de morte intracitoplasmático, porém o TNFR2 não possui o domínio de morte. A interação do TNF com o TNFR pode levar, alternativamente, à ativação de NF κ B, que controla a expressão de genes de mediadores inflamatórios, ou à ativação de uma via de caspases, causando apoptose. Assim, a sinalização via TNFR1 pode levar à ativação celular ou à apoptose, enquanto a sinalização via TNFR2 não leva diretamente à apoptose, mas pode cooperar com o TNFR1 para induzi-la (Warzocha 1995; Gupta, 2002; Tracey et al. 2008).

Tem sido sugerido que o TNF na forma solúvel interage preferencialmente com TNFR1, enquanto que a forma associada à membrana interage preferencialmente com o TNFR2 (MacEwan 2002). Além da ativação da via NF κ B, o TNF/TNFR1 ativa a via das MAPK, JNK e p38, gerando o fator de transcrição AP-1. Também ativa a via da PI3K, que ativa a quinase Akt, que juntamente com a MAPK ERK, está geralmente associada à sobrevivência e proliferação celular. Portanto, os TNFR ativam genes inflamatórios, controlam a proliferação e morte celular, podendo ser postulado, de maneira geral, que o TNFR1 está associado com funções citotóxicas e pró-inflamatórias, causando injúria tecidual, enquanto o TNFR2 promove a ativação, migração e proliferação celular, atuando no reparo tecidual e angiogênese (Aggarwal 2003; Bradley 2008).

Os dois TNFR são expressos na superfície da maioria das células e ambos são liberados da membrana, após ativação celular, como moléculas solúveis de ligação ao TNF, servindo como reguladores das ações do TNF. Outra forma de controle dos efeitos do TNF é a internalização dos receptores após sua estimulação (Bemelmans et al. 1996; MacEwan 2002).

A transdução dos sinais dos TNFR é responsável pelas várias atividades do TNF no processo inflamatório, nas respostas imunes contra agentes infecciosos e contra tumores. O TNF é um importante mantenedor da homeostasia do sistema imune, controlando a hematopoese, e a proliferação de células T e B. Além disto, o TNF é importante para o desenvolvimento dos órgãos linfóides e a maturação dos centros germinativos (Tracey et al. 2008).

Na imunidade natural, as células residentes nos tecidos respondem rapidamente aos estímulos exógenos produzindo TNF, que ativa várias células locais para expressão de genes inflamatórios. As células endoteliais passam a expressar moléculas de adesão para leucócitos, produzem prostaciclina que é vasodilatadora, condições necessárias para a chegada dos leucócitos ao foco inflamatório. O TNF induz a liberação de quimiocinas que auxiliam neste recrutamento de leucócitos e induz expressão de proteínas pro-coagulantes, levando à formação de trombo (Bradley 2008). Os leucócitos ativados pelo TNF produzem espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, essenciais para a eliminação de microrganismos (Liew et al 1990; Megyeri et al. 1995; Tracey et al. 2008). Desta forma, a ativação de células do sistema imune pelo TNF é essencial para o controle das infecções. Tal importância tem sido confirmada em modelos experimentais, como o de Pfeffer et al. (1993), que geraram um camundongo deficiente em TNFR1, o qual foi altamente suscetível à infecção por *Listeria monocytogenes*. Uma função do TNF na eliminação de patógenos também foi demonstrada na tuberculose experimental, onde a deficiência de TNF, ou a sua neutralização, favoreceu o crescimento da micobactéria (Jacobs et al. 2007). O uso de agentes bloqueadores do TNF na clínica para tratamento de doenças inflamatórias crônicas, tais como a artrite reumatóide e a doença de Crohn, aumenta o risco de infecções, ressaltando a relevância do TNF no combate às infecções (Tracey et al. 2008).

O TNF, apesar de suas propriedades na resistência contra as infecções, quando produzido sistemicamente, ou cronicamente em um tecido, está associado à patogênese de doenças inflamatórias graves, incluindo artrite reumatóide, esclerose múltipla, doenças inflamatórias intestinais, alergias, rejeição de enxertos e choque séptico (Strieter et al. 1993; Kollias et al. 2002; Jean-Baptiste, 2007; Bradley 2008).

Durante a resposta inflamatória, os sinais transduzidos pelos receptores celulares levam à produção de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF, e também aos mediadores lipídicos da inflamação, como o fator ativador plaquetário (PAF, *Platelet-activating factor*). Dubois et al (1989) demonstrou que o PAF pode mediar os efeitos do TNF. Em seguida, será descrito com mais detalhes o PAF e suas interações com o TNF.

1.3. O Fator Ativador de Plaquetas

A ativação celular é acompanhada pela remodelagem dos lipídios de membrana devido à ativação de lipases, gerando lipídios bioativos, denominados de mediadores lipídicos da inflamação (Serhan et al. 1996), dentre estes, o PAF. O PAF foi descrito em 1972 como um produto dos basófilos sensibilizados pela imunoglobulina E (IgE), após exposição ao antígeno específico, e recebeu essa denominação devido a sua capacidade de induzir a agregação plaquetária (Benveniste et al. 1972). No entanto, o PAF pode ser produzido por diversos tipos celulares e têm várias ações, além da agregação plaquetária, descoberta inicialmente. O PAF (1-O-alkil-2-acetil-sn-glicero-3-fosfolina) pode ser produzido por monócitos, macrófagos, PMN, eosinófilos, basófilos, plaquetas, mastócitos, células do endotélio vascular e linfócitos e, estas e outras células podem sofrer ação deste fosfolípido (Roubin et al. 1982).

O PAF é principalmente sintetizado após um estímulo inflamatório e esta via recebe a denominação de via da remodelagem. Após o estímulo, um precursor inativo na membrana da célula (alkil-acil-glicerol-3-fosforilcolina) é clivado pela enzima fosfolipase A₂ (PLA₂) citosólica (cPLA₂α), levando à formação do liso-PAF, que sofre acetilação, pela ação da enzima acetil-transferase, dando origem ao PAF (Serhan et al. 1996). O PAF gerado é hidrolisado pela PAF-acetilhidrolase (PAF-AH), voltando a liso-PAF, o qual pode incorporar ácido araquidônico (AA) e ser re-integrado à membrana celular (Prescott et al. 2000). Como o PAF possui amplo espectro de ação e as células são sensíveis a baixas quantidades de PAF, a ação do PAF é rigorosamente controlada desde a sua síntese, a expressão dos seus receptores e a sua rápida degradação pela enzima PAF-AH. Existem três isoformas desta enzima: a PAF-AH do plasma também chamada de PLA₂G7, e duas isoformas intracelulares, a PAF-AH II e a PAF-AH Ib. Estas enzimas hidrolisam o grupamento acetil do PAF, dando origem a dois produtos, o liso-PAF e a lisofosfatidilcolina (Faria Neto et al. 2005), os quais são re-utilizados na remodelagem da membrana celular. Os monócitos humanos secretam PAF-AH plasmática e aumentam esta secreção quando se diferenciam em macrófagos, sendo estes considerados fontes fisiológicas de PAF-AH plasmática (Elstad et al. 1989). Esta hidrolase também é produzida por neutrófilos humanos e sua inibição pode causar acúmulo de PAF (Chen et al. 2007).

Elstad et al. (1989) estudaram a liberação de PAF por monócitos humanos e demonstraram que essa liberação é dependente da temperatura, sugerindo um mecanismo de liberação ativa, e também dependente da concentração de albumina, que pode servir como uma molécula receptora. O PAF pode ser liberado em uma vesícula secretora ou associado a uma proteína endógena. Stewart et al. (1990) demonstraram que após a ativação de macrófagos e PMN é gerado PAF. Em macrófagos estimulados com fMLP (*f-met-leu-phe*), a geração do PAF atingiu um pico em 5 min, sendo detectável até 60 min após o estímulo. Em PMN, o pico da produção foi com 60 min. A maioria do PAF sintetizado permaneceu associada à célula, indicando um possível papel deste mediador como um segundo mensageiro dentro das células.

O PAF é um mediador lipídico com um amplo espectro de ação pró-inflamatória, promovendo quimiotaxia para leucócitos, agregação plaquetária, secreção granular e geração de espécies reativas do oxigênio, aumento da permeabilidade vascular, leucocitose e aderência de leucócitos ao endotélio vascular. Além disso, o PAF está envolvido em processos alérgicos, cicatrização de feridas, aterosclerose, angiogênese, apoptose e reprodução (Stewart et al., 1990; Stafforini et al. 2003). As ações do PAF envolvem sinalização intercelular e autócrina, sendo mais conhecido seu papel na sinalização do sistema vascular e na inflamação. No entanto, também é conhecido que o PAF transmite informações entre células do sistema nervoso central, endócrino e gastrointestinal. A função mais bem caracterizada do PAF é a mediação de interações celulares na resposta inflamatória, envolvendo células endoteliais e vários tipos de leucócitos, exercendo seus efeitos a curtas distâncias, podendo circular e agir de modo endócrino, causando ativação de plaquetas, células endoteliais, PMN e monócitos (Prescott et al. 2000).

Os efeitos do PAF podem ser bloqueados por antagonistas, indicando que o PAF age pela interação com receptores específicos. Honda et al. (1991), clonaram o receptor para o PAF (PAFR) em células de cobaia e foi demonstrado que o mesmo pertence à família de receptores acoplados a proteína G (GPCR, *G protein-coupled receptor*). Müller et al. (1993) isolaram o DNA do PAFR nos leucócitos humanos e caracterizaram a sua expressão fenotípica e atividade funcional nos leucócitos. Brown et al. (2006) demonstraram que PAFR usa exclusivamente a proteína G_i para mediar efeitos de motilidade celular e pode

usar as proteínas G_i e G_q para estimular atividades secretórias. A ligação do PAF a seu receptor induz a ativação da fosfolipase C (PLC), que hidrolisa fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP_2), gerando dois segundos mensageiros, o diacilglicerol (DAG) e o 1, 4, 5 trifosfato inositol (IP_3), que irão mediar à ativação da proteína kinase C (PKC) e a liberação de cálcio intracelular, respectivamente. O aumento de cálcio intracelular aciona várias enzimas dependentes de Ca^{++} , que contribuem para os efeitos do PAF na célula (Chao & Olson 1993). O PAF também ativa a via das MAPK (Honda et al. 1994; Franklin et al. 1995), a via da PI3K (Ko et al. 2005) e além da via de sinalização envolvendo proteínas G, o PAF ativa a via Tyk2/Jak2 tirosina-quinase/STAT1 (Lukashova et al.2001), que é uma via importante para a indução de NO em macrófagos (Han et al. 2006).

Os GPCR são finamente regulados nas células, este processo é crítico para a homeostase fisiológica. Dentre os mecanismos de regulação desses receptores estão a dessensibilização, que envolve o desacoplamento das proteínas G e a internalização dos receptores, que pode ser reversível pela remoção dos agonistas; a redução do número de receptores na membrana; a endocitose mediada por clatrin; a ubiquitinação e degradação mediada por proteassoma (Zastrow, 2001). Assim como os demais receptores acoplados a proteína G, os PAFR são regulados pela ligação do agonista. Os sinais induzidos pelo PAF são atenuados pela repetida ou prolongada (horas) exposição das células ao PAF, sendo este fenômeno denominado de dessensibilização (Takano et al. 1994). Imediatamente após a ligação do agonista, o receptor torna-se desacoplado das proteínas G e rapidamente fosforilado por quinases, sendo posteriormente endocitados. A endocitose do PAFR é dependente de β arrestinas, que se associam ao PAFR após ativação pelo agonista, de maneira independente de ativação da proteína G (Chen et al. 2002). Após a endocitose, a degradação do PAFR pode ocorrer via proteassomo, a qual é dependente de ubiquitinação, bem como via lisossomos (Dupré et al. 2003). Assim, adicionalmente à ação das PAF-AH, a dessensibilização dos receptores é também um meio de controle das ações do PAF.

Ao ser produzido, o PAF participa como um segundo mensageiro celular para a liberação de eicosanóides (prostaglandinas e leucotrienos), ânion superóxido (Stewart et al. 1990), porém, por si só, o PAF não é capaz de induzir a liberação de citocinas, tais como o TNF e a IL-8. No entanto, a sensibilização

prévia (*priming*) das células com o PAF potencializa a liberação destas citocinas induzidas por um estímulo subsequente (Arbabi et al. 1999, Cuschieri et al. 2005) Além da potencialização da produção de citocinas, a pré-sensibilização das células com PAF, aumenta a produção de espécies reativas de oxigênio (Megyeri et al. 1995; Brown et al. 2004). Os mecanismos da pré-sensibilização pelo PAF não estão completamente elucidados, mas acredita-se que envolva o aumento de fosfatidil inositol, de cálcio intracelular, p38 MAPK, PKC e serina proteases (O'Flaherty et al. 1990; Megyeri et al. 1995; Brown et al. 2004; Cuschieri et al. 2005).

Embora as propriedades pró-inflamatórias do PAF sejam bem conhecidas, a sua participação na imunidade natural contra infecções tem sido pouco estudada. O PAF, assim como o TNF, também parece ser importante para a atividade microbida de macrófagos. Foi demonstrado em experimentos *in vivo* e *in vitro*, que o PAF é importante para o controle da infecção murina pelo protozoário *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, sendo a atividade microbida do PAF associada à produção de NO (Lonardoni et al. 2000; Rosa et al. 2001; Santiago et al. 2006). Em infecções por bactérias Gram negativas e Gram positivas o PAF é um mediador que promove aumento da produção de TNF (Ogatta et al. 2004), importante para a eliminação dos microrganismos (Soares et al. 2002). Estudos recentes indicam que bactérias Gram positivas, nas quais o LTA é um PAMP que ativa TLR2, o PAF é produzido e ativa a via Jak2/STAT1, induzindo a produção de NO, um potente agente microbida (Han et al. 2006).

A produção de PAF sistemicamente ou nos tecidos, similar ao que ocorre com o TNF, pode causar danos teciduais. O PAF induz hipotensão e falência cardíaca, bem como hiperreatividade brônquica e lesão pulmonar (Chang et al. 1987). Muitas das ações do PAF são compartilhadas pelo TNF e vice-versa, sendo algumas de suas interações nas infecções e doenças inflamatórias, descritas abaixo.

1.4. As interações entre PAF e TNF

O TNF pode estimular a produção de PAF (Camussi et al. 1987) e o PAF também pode aumentar a produção de TNF por células ativadas (Yamada et al. 1999). Dubois et al. (1989) avaliaram a influência do PAF na produção de TNF por macrófagos alveolares de ratos, demonstrando que a presença do PAF aumentou de duas a três vezes a quantidade de TNF produzida pelos macrófagos alveolares estimulados com muramildipeptídeo, um PAMP de micobactérias. O PAF é capaz de induzir a produção de TNF também em monócitos humanos (Ruis et al. 1991). Degenais et al. (1997) demonstraram que o TNF aumenta a expressão de PAFR em monócitos humanos após 1 h de estimulação das células, os quais persistiram aumentados por até 24 h. Nestas células, a produção de IL-6, em resposta ao PAF, foi significativamente maior do que nas células não tratadas com TNF, sugerindo uma importante interação entre TNF e PAF nos monócitos humanos durante processos inflamatórios. O pré-tratamento com antagonistas de PAF ou com anticorpo anti-TNF reduz a ativação do fator de transcrição NF κ B nas células intestinais de rato, induzida pelo LPS, mostrando que o efeito do LPS é dependente da produção endógena de PAF e/ou TNF (Plaen et al. 2000).

Sun et al. (1990) demonstraram que os efeitos do LPS e do TNF na indução de choque e injúria tecidual em ratos foram mediados pelo PAF, uma vez que o tratamento desses animais com antagonista de PAF, resultou na supressão dos efeitos induzidos pelo LPS e pelo TNF. A administração de PAF em várias espécies de animais induz hipotensão severa, choque e morte, pois o PAF aumenta a permeabilidade vascular e o extravasamento de plasma para o interstício. A injeção de LPS em camundongos resulta na produção de PAF, que atinge seu pico em 5-10 min. Após a injeção, foram observados sintomas semelhantes ao do choque séptico e coagulação intravascular disseminada, que causam a morte. Esses efeitos do LPS foram prevenidos pelo pré-tratamento dos animais com antagonista de PAF, mostrando que os efeitos do LPS são mediados pelo PAF (Han et al. 1999). Em uma infecção com a bactéria Gram-negativa *Klebsiella pneumoniae*, o uso de antagonista de PAF diminuiu a produção de TNF nos animais infectados, similar ao ocorrido em camundongos com deficiência de receptores para o PAF, mostrando que o PAF é importante para a produção de TNF induzida por *K. pneumoniae* (Soares et al. 2002). Estes estudos apontam um importante e bem estabelecido papel do PAF como um mediador dos efeitos

do LPS e de bactérias Gram negativas na produção de TNF. Nestes modelos animais, o uso de antagonistas de PAF tem resultado em um aumento da sobrevivência dos animais por inibir os efeitos deletérios do LPS (Fletcher et al. 1990).

Um aumento da sobrevivência de camundongos tratados com antagonista de PAF ou deficientes no PAFR foi observado quando estes animais sofreram sepse polimicrobiana. Neste estudo foi observada uma redução nos níveis de TNF e IL-6 nos animais deficientes de PAFR e naqueles que receberam antagonista de PAF, porém, também mostraram que o PAF inibiu o recrutamento de neutrófilos para o local de infecção (Moreno et al. 2006). Para o LPS, um PAMP de bactérias Gram negativas, está bem definido que muitas das suas ações, incluindo a produção de TNF são moduladas pelo PAF, especialmente em modelos animais. Como mostrado por Ruggiero et al. (1994), a administração de ST 899, um antagonista do PAFR, antes do desafio com LPS, reduziu a mortalidade dos animais e os níveis de TNF no soro.

Em humanos, no entanto, o uso de antagonistas de PAF em ensaios clínicos não tem mostrado similares resultados aos modelos animais, em relação à diminuição da taxa de mortalidade dos pacientes com sepse ou choque séptico. Suputtamongkol et al. (2000), demonstraram que o uso de lexipafant, um antagonista do PAFR, em pacientes com sepse severa, embora diminuísse os níveis de TNF no soro dos pacientes, não resultou em melhora nas análises clínicas ou bioquímicas, sendo a taxa de mortalidade similar entre o grupo tratado e o grupo placebo. Resultados parecidos foram observados com o uso de outro antagonista, denominado BB-882, em que o tratamento com este composto não resultou em melhorias no estado hemodinâmico, função respiratória ou falência de órgãos, nem na sobrevivência dos pacientes, que tinham sepse por bactérias Gram negativa, Gram positiva ou sepse mista (Vincent et al. 2000).

Tendo em vista a importância do PAF nas síndromes inflamatórias, uma alternativa terapêutica foi o uso da enzima PAF-AH recombinante. Bulger et al. (2002) demonstraram que o pré-tratamento com PAF-AH reduz a produção de TNF por macrófagos murinos estimulados com LPS, e este efeito foi dependente da concentração de PAF-AH e pode ser observado também com a administração de PAF-AH até duas horas após a estimulação com LPS. Gomes et al. (2006), demonstraram que os níveis da PAF-AH estão reduzidos em pacientes com sepse, e que a administração desta enzima em camundongos com sepse ou

inflamação sistêmica induzida pelo LPS, reduz a inflamação e a morte dos animais. Opal et al. (2004), em um estudo clínico fase III, mostraram que a administração de PAF-AH em pacientes com sepse foi bem tolerada, porém não resultou na redução da mortalidade desses pacientes.

1.5. A conexão TLR – PAF - TNF na ativação celular por PAMPs bacterianos

Poucos estudos têm avaliado a interação entre TLR e mediadores lipídicos, especialmente o PAF. A ativação de TLR4 em macrófagos induz fosforilação de cPLA2, com conseqüente liberação de ácido araquidônico, o qual é o substrato para geração de prostaglandinas, leucotrienos e tromboxano, importantes mediadores lipídicos da inflamação (Qi & Shelhamer 2005). Em paralelo, o LPS também induz PAF, sendo sua ação por meio de ligação ao TLR4, no entanto, para outros TLR esta ação é menos conhecida. Foi demonstrado que PGN e zimozan, agonistas de TLR2, induzem a geração de cisteinil-leucotrienos em mastócitos humanos (McCury et al. 2003). Recentemente, Hattermann et al. (2007) demonstraram que, além de leucotrienos e prostaglandinas, um agonista de TLR8 também leva à produção de PAF por neutrófilos humanos.

A modulação da produção do TNF pelo PAF tem sido bem avaliada em modelos com LPS/TLR4, como os referidos acima na sessão 1.4. No entanto, pouco se sabe a respeito da modulação da produção de TNF pelo PAF, quando o estímulo é um PAMP de bactéria Gram positiva ou de micoplasma. Os PAMPs destas bactérias são especialmente ligantes de TLR2, como já exposto anteriormente, e o acionamento de TLR2 é importante para a resistência à infecção, como tem sido demonstrado para infecção por *Staphylococcus aureus* (Takeuchi et al. 2000) ou por *Streptococcus pneumoniae* (Echchannaoui et al. 2002). Apesar das vias de sinalização similares entre TLR4 e TLR2, vários experimentos mostram respostas celulares diferentes quando estes TLR são acionados (Re & Strominger 2001; Agrawal et al. 2003). Bactérias Gram positivas e Gram negativas mostram distintos perfis de citocinas induzidas em monócitos humanos (Hessle et al. 2000; Hessle et al. 2005) e parecem afetar diferentemente a via das MAPK nestas células (Rabehi et al. 2001). As bactérias inteiras, devido aos seus vários PAMPs, podem utilizar diferentes TLR simultaneamente, levando à diferentes respostas.

A participação do PAF na modulação da produção do TNF induzida por agonistas de TLR2 foi avaliada em macrófagos murinos (Han et al. 2006), porém não foi estudada em humanos. Assim, uma avaliação comparativa entre os efeitos nas vias de ativação por TLR2 e TLR4 em células humanas pode contribuir para o aumento do conhecimento das interações entre TLR, mediadores lipídicos e TNF durante as respostas às infecções. Assim, é de interesse avaliar a participação do PAF na produção do TNF induzida por PAMPs de bactéria Gram positiva e de micoplasma, em comparação com os de bactéria Gram negativa, bem como naquela induzida por bactérias inteiras. Tal estudo é necessário para ampliar o conhecimento da relevância da via TLR2/PAF/TNF na imunidade natural e resistência às infecções, bem como em doenças inflamatórias que envolvam esta via de ativação celular.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL:

- Avaliar a participação do PAF na produção de TNF induzida por agonistas de TLR2 e por bactéria Gram positiva (*Staphylococcus aureus*) em hemoculturas humanas.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Extrair as LAMPf
- Avaliar a atividade biológica das LAMPf em macrófagos murinos Raw267.4: capacidade de induzir NO e TNF.
- Avaliar a indução de TNF nas culturas de sangue periférico humano estimuladas com agonistas de TLR2 (Pam₃Cys ou LAMPf) e de TLR4 (LPS).
- Avaliar a modulação da produção de TNF pós ativação das células sanguíneas com Pam₃Cys, LAMPf ou LPS, pelo PAF endógeno e pelo PAF exógeno.
- Avaliar a modulação da expressão de TLR2 em monócitos e granulócitos do sangue periférico tratados com PAF.
- Avaliar a modulação da produção de TNF após ativação das células sanguíneas com bactéria Gram positiva (*S. aureus*) ou Gram negativa (*Escherichia coli*), pelo PAF endógeno e pelo exógeno.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Aspectos éticos e doadores

O presente projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Médica Humana e Animal do Hospital das Clínicas (HC) da Universidade Federal de Goiás (UFG). Após leitura e assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido, foram colhidos cerca de 10 mL de sangue periférico, de indivíduos saudáveis doadores de sangue (Banco de Sangue do HC/UFG), triados mediante realização de um hemograma para confirmação dos padrões hematológicos de normalidade, para a inclusão no estudo.

3.2. Obtenção dos micoplasmas

A massa de *M. fermentans* PG18 foi preparada pelo Dr. Jorge Timenesky, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil. Os micoplasmas foram mantidos congelados em fase exponencial de crescimento a -70°C até o momento da obtenção das lipoproteínas (LAMPf). Os micoplasmas foram descongelados e subcultivados em meio SP4 e então expandidos até 1.500 mL. Em seguida, foram mantidos a 37°C em aerobiose por 3 a 5 dias. Após o crescimento, as culturas de micoplasmas foram testadas para a hidrólise de arginina, produção de colônias tipo “ovo frito”, em meio SP4 sólido (Tully et al.1995), e após alteração do pH (acidificação), foi retirada uma alíquota das culturas para a comprovação da espécie de micoplasma, por meio do teste de inibição do crescimento por anticorpos específicos. Cerca de 1.500 mL de cultura, em fase exponencial de crescimento, foram centrifugados a 13.000 g por 30 min a 4°C, para a obtenção dos micoplasmas a serem utilizados na extração das lipoproteínas (Clyde Jr. et al. 1983).

3.3. Extração das Lipoproteínas

Para a extração das lipoproteínas de membrana, o método escolhido foi o fracionamento de fase com detergente Triton X-114, baseado em Wang *et al.* (1992), com algumas modificações. Os micoplasmas foram ressuspensos em 40 mL de PBS (salina tamponada com fosfato, pH 7,4, contendo timerosal 0,025%) e centrifugados a 20.000 g, por 30 min, a 4°C, por duas vezes

consecutivas, para a retirada dos componentes do meio de cultura. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento, ressuspendido em 4,0 mL de tampão de extração (Solução Tris HCl 50 mM; NaCl 150 mM; EDTA 1 mM, pH 8,0). A esta suspensão foi adicionado 1,0 mL de Triton X-114 (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, EUA) a 10% em água bidestilada (concentração final de 2% de detergente) e a preparação foi submetida de seis a oito ciclos de sonicação por 1 min a uma potência de 100 watts (desruptor de células UNIQUE), com intervalos de 5 min, em banho de gelo. Em seguida, foram acrescentados 5 mL de Triton X-114 a 10% e 20 mL do tampão de extração (concentração final de 2% de detergente). Após incubação por 3 h, a 4°C, sob agitação, a mistura foi centrifugada a 20.000 g, por 30 min, a 4°C, para retirada de resíduos. O sobrenadante foi submetido à extração por partição de fase, sendo incubado a 30°C por 5 min e centrifugado a 2.500 g por 5 min (30°C). Duas fases se formaram, sendo a fase aquosa superior descartada. À fase inferior (detergente) foi adicionado igual volume de tampão de extração gelado e a mistura foi submetida novamente à partição de fase, por duas vezes, como descrito anteriormente. A fase detergente foi tratada com etanol absoluto para a precipitação das LAMPf (Rawadi & Roman 1996). Para isto, ao volume final da fase detergente foi acrescentado igual volume de tampão de extração e duas vezes e meio o volume de etanol absoluto (Synth, São Paulo, Brasil). A solução foi incubada a -20°C por 20 a 22 h, sendo em seguida centrifugada a 50.000 g, por 1 h, a 4°C. O sobrenadante foi descartado e as LAMPf, no sedimento, foram solubilizadas em PBS e foram adicionados inibidores de protease, na concentração de 0,1% (Protease Inhibitor Cocktail, Sigma). A quantificação das LAMPf foi realizada usando o kit BCA Protein Assay (Pierce, Rockford, IL, EUA), conforme instrução do fabricante. A solução foi alíquotada e estocada a -20°C até o momento do uso.

3.4. Eletroforese em gel de poliacrilamida: Lipoproteínas de micoplasma.

Para a avaliação do perfil eletroforético, as LAMPf foram submetidas a uma eletroforese em gel de poliacrilamida, sob condições redutoras, após diluições em tampão de amostra com 2 β -mercaptoetanol a 1% (SDS-PAGE; Laemmli 1970), sendo utilizado um gel de corrida a 10% e gel de empilhamento a 3%. O gel foi preparado com uma solução de Bis-Acrilamida 30% (28,42g de acrilamida –Bio Rad, Hercules, CA, EUA; 1,58g de bis–acrilamida - Gibco BRL, Grand Island, NY,

EUA) em água destilada, solução Tris - Base (Sigma) a 0,75 M, pH 8,8, para o gel de corrida; e para o gel de empilhamento foi usada uma solução Tris a 1,0 M, pH 6,8 e SDS a 10% (USB™, Cleveland, OH, EUA); persulfato de amônio a 10% (APS, Sigma) e tetrametiletilenodiamina (TEMED, Sigma). A eletroforese foi realizada, utilizando o sistema Mini-Protean®3cell (Bio Rad). As amostras das LAMPf foram diluídas em água deionizada tipo I, sendo acrescidas do tampão de amostra 4 vezes concentrado (Tris- HCL pH 6,8, Glicerol 20%, SDS 4%, Azul de bromofenol 0,03%) e 2β-mercaptoetanol a 1%. Foi usado um padrão de baixo peso molecular: 192; 102; 58, 49; 30; 20 e 15 KDa (Bio Rad) para a determinação das massas moleculares das LAMPf. Após a aplicação das amostras, o gel foi submetido a uma corrente elétrica inicial de 60 V até a entrada das amostras no gel de corrida, sendo em seguida a corrente aumentada para 100 V. O tempo total para a separação das proteínas foi de aproximadamente 130 min. Após este período, o gel foi corado pela coloração de nitrato de prata. Para efetuar a coloração, primeiramente o gel foi fixado por 15 min (metanol 50%, ácido acético 12%; formaldeído 0,3% em água deionizada). Em seguida, o gel foi lavado três vezes com etanol 50% por 10 min, tratado com tiosulfato de sódio 0,02%, lavado por três vezes com água deionizada, depois corado com solução de nitrato de prata 0,2% por 10 min, sendo em seguida, lavado com água novamente. A solução reveladora foi adicionada (carbonato de sódio 0,6%; tiosulfato de sódio 0,0004%, formaldeído 0,3%) até a visualização das bandas. A reação foi encerrada com solução contendo metanol 50% e ácido acético 12% em água deionizada.

3.5. Cultura de Linhagens celulares RAW 264.7 e L929

As linhagens de células murinas, RAW 264.7 (macrófagos) e L929 (fibroblastos) foram cultivadas em garrafas de 75 cm² (Corning Costar, NY, EUA) em meio D-MEM ou RPMI-1640 (Gibco) respectivamente, suplementados com Hepes 10 mM, penicilina 100 U/mL e estreptomicina 100 mg/L. No momento do uso, o meio foi suplementado com 5% de Soro Fetal Bovino (SFB, Gibco), 11 mM de bicarbonato de sódio e 2 mM de L-glutamina, sendo assim, considerado meio completo. As células foram mantidas a 37°C, em atmosfera úmida a 5% CO₂, sendo repicadas de duas a três vezes por semana. Para as células L929, a monocamada de células era lavada com meio RPMI 1640 sem suplementos e em

seguida, as células eram tratadas com uma solução de tripsina 0,25% (Sigma), a 37°C, até desprenderem do frasco de cultura. Após a tripsinização, as células eram transferidas para um tubo plástico de 50 mL (Corning Costar) contendo 10 mL de meio completo e, em seguida eram centrifugadas a 500 g, por 10 min., à 15°C. As células eram então, ressuspensas em meio completo e cultivadas novamente.

3.6. Cultivo dos macrófagos RAW 264.7 com agonistas de TLR2 ou TLR4.

As células Raw267.4 foram distribuídas 5×10^4 em 200 μ L de meio completo em placas de 96 poços de fundo chato (Corning Costar). Após 24 h de incubação (37°C, 5% CO₂), o meio foi substituído e as células foram estimuladas com diferentes concentrações de LAMPf, LPS (*E. Coli*, sorotipo 0111:B4, Sigma) ou Pam₃Cys SKKKK (EMC, Tübingen, Alemanha) na ausência ou na presença de 50 U/mL de IFN γ recombinante murino (Sigma). Em alguns experimentos, os agonistas foram tratados com sulfato de polimixina B (PMB, Sigma) na concentração de 10 μ g/mL, por 30 minutos antes da estimulação das células. O sobrenadante das culturas foi colhido em diferentes intervalos de tempo para as dosagens de TNF e nitritos.

3.7. Determinação das concentrações de nitritos

As concentrações de nitritos, presentes nos sobrenadantes das culturas, foram determinadas por uma reação padrão utilizando reagente de Griess. Brevemente, 50 μ L dos sobrenadantes das culturas foram incubados com 50 μ L de reagente de Griess (sulfanilamida 1% dihidroclorato de N-1-naftilenodiamina 0,1%/ ácido fosfórico 2,5%) por 10 min, a temperatura ambiente. A absorbância foi detectada por um leitor de microplacas (Multskam, Thermo Labsystems, Shanghai, China), nos filtros de 550 e 620 nm. As concentrações de nitritos foram determinadas a partir de uma curva padrão de nitrito de sódio. Os resultados são expressos em μ M de NO₂⁻ obtidos de dosagens realizadas em duplicatas.

3.8. Bioensaio para detecção de TNF murino

A linhagem de fibroblasto murino L929 foi usada para quantificar o TNF na sua atividade citotóxica. As células foram distribuídas em placas de 96 poços de fundo chato (Costar) na concentração de $3,5 \times 10^4$ /100 μ L de meio RPMI 1640 completo e cultivadas por 24 h, a 37°C, em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Após este período, 100 μ L das amostras, em diluição seriada a 1/2 e 10 μ L de Actinomicina D (Sigma) foram adicionados aos poços, e as placas foram incubadas novamente por 18 h. Após este período, a citotoxicidade foi visualizada pela coloração por cristal violeta (0,5% em ácido acético 30%) por 10 min. Em seguida, as placas foram lavadas em água corrente e deixadas secar à temperatura ambiente. Um volume de 100 μ L de metanol absoluto foi adicionado e a absorbância (620 nm) foi medida em um leitor de microplacas (Multskam, Thermo Labsystems). Uma unidade de TNF foi definida como a recíproca da diluição que induziu 50% de lise das células. Os resultados são expressos em U/mL de TNF, não tendo sido determinado qual tipo de TNF estava sendo produzido.

3.9. Preparação das Bactérias

As bactérias *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) utilizada no experimento foram doadas pela Dra. Fabiana Pimenta (Setor de microbiologia, IPTSP, UFG, Goiás, Brasil). As cepas estavam armazenadas a -20°C, foram repicadas em caldo triptcase soja (TSB) e incubadas a 37°C, por 24 h. A cultura de *E. coli* foi repicada em agar MacConkey (meio de cultura seletivo para bastonetes Gram negativos) e o *S. aureus*, em agar manitol salgado (seletivo para estafilococos), para obter colônias isoladas e confirmar a pureza dos microrganismos. As placas foram incubadas a 37°C, por 24 h, e as colônias desenvolvidas foram submetidas à coloração de Gram e repicadas em agar nutriente, sendo novamente incubadas a 37°C por adicionais 24 h. A suspensão bacteriana foi preparada em PBS de acordo com a escala 4 de MacFarland ($1,2 \times 10^9$ bactérias/mL). Após a quantificação, as suspensões bacterianas foram centrifugadas (500 g, 10 min, 10°C), sendo o sobrenadante descartado e o sedimento ressuspendido em 2 mL de PBS. Em seguida, as

bactérias foram mortas por exposição ao calor (100°C, 30 min). A suspensão de bactérias foi mantida em geladeira até o momento do uso.

3.10. Hemoculturas com agonistas de TLR e tratamentos com PAF ou antagonista de PAF.

As amostras de sangue foram colhidas em tubos contendo heparina (Vacuette, greiner bio-one, Brasil). O sangue foi diluído 1:2 em meio de cultura RPMI 1640 completo, constituindo um volume final de 300 µL. As culturas foram adicionadas de LAMPf, LPS ou Pam₃Cys nas concentrações de 1, 0,1 ou 0,01 µg/mL, ou com *S. aureus* ou *E. coli* nas concentrações de 10⁸, 10⁷, 10⁶ ou 10⁵ bactérias/mL, sendo os tubos fechados e incubados, sob agitação leve (37°C). Após os períodos de 1 h, 3 h, 6 h ou 24 h de incubação, o sangue diluído foi centrifugado (5 min, 500 g) e o sobrenadante foi colhido e congelado a -20°C até o momento da dosagem de TNF, pelo ensaio imunoenzimático (ELISA). Estabelecido o melhor tempo e as concentrações dos agonistas, foi avaliado o efeito dos PAF endógeno e do exógeno na indução do TNF. Para isto, as culturas foram tratadas com WEB2170, um antagonista de PAF tieno-triazolodiazepínico (Boheringer Ingelheim, Alemanha, gentilmente doado pela Dra. Sônia Jancar, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil) em diferentes concentrações, por 30 min antes da estimulação, ou acrescidas de PAF nas concentrações de 10⁻⁶, 10⁻⁸, 10⁻¹⁰ ou 10⁻¹² M, no momento da adição dos agonistas de TLR, 3 h ou 30 min antes ou 10 min depois.

Para avaliar a expressão de TLR2 nos granulócitos e monócitos do sangue, antes e após a ativação com PAF, 100 µL de sangue foram cultivados com PAF nas doses de 10⁻⁸ e 10⁻¹⁰ M, sob leve agitação, a 37°C, por 3 h antes da marcação para a citometria de fluxo, descrita abaixo.

3.11. Citometria de Fluxo

Para avaliar a expressão dos receptores TLR2 nos monócitos e granulócitos, 100 µL de sangue, na ausência ou na presença de PAF, foram incubados com anticorpos anti-CD14-PE (mIgG2a, Clone M5E2, BD-Pharmingen, EUA), anti-TLR2-FITC (mIgG2a, clone TL2.1 IMGENEX, San Diego, CA, EUA) ou isótipo controle (mIgG2a, anti-rat-FITC, BD-Pharmingen), todos na concentração

final de 10 µg/mL. Após 30 minutos de incubação a 4°C, as hemácias foram lisadas com 1 mL de solução de lise (BD FACS™ lysing solution) diluída 1:10, por 15 min a 4°C. Posteriormente, as células foram lavadas com 1 mL de PBS e centrifugadas (500 g, 5 min, 4°C). As células foram ressuspensas em PBS-paraformaldeído 1%. Os tubos foram mantidos a 4°C até o momento da aquisição. As aquisições foram feitas em um citômetro de fluxo (FACSCalibur-BD), sendo adquiridos 10.000 eventos para a análise dos granulócitos, e 5.000 eventos na janela das células CD14+, para a análise dos monócitos. As análises foram realizadas no programa Cell Quest-Pro (versão 5.1.1, 2003, EUA).

3.12. Dosagem de TNF Humano por ELISA

O TNF foi detectado no sobrenadante das hemoculturas pelo ELISA (do inglês, *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*). Primeiramente, as placas foram sensibilizadas com 100 µL de anticorpo anti-TNF (1 µg/mL, clone B 154.9) por incubação durante 1 h e 30 min, a 37°C. Em seguida, as placas foram lavadas com PBS TWEEN 20 (0,05%) três vezes e incubadas novamente com 200 µL de uma solução de bloqueio contendo PBS e 3% de SFB, por 40 min. Após este período, as placas foram lavadas novamente e 80 µL do sobrenadante das culturas foram aplicados em duplicatas, sendo as placas incubadas por 24 h, a 4°C. Posteriormente, as placas foram lavadas três vezes com PBS TWEEN 20 e 80 µL do segundo anticorpo (Clone B157.7 anti-TNF biotinilado, 1 µg/mL) foram adicionados. Após 1 h de incubação à temperatura ambiente, as placas foram lavadas três vezes e foram acrescentados 50 µL de conjugado estreptoavidina-peroxidase (Sigma; 1:2000). Após 40 min de incubação, à temperatura ambiente, as placas foram lavadas com PBS TWEEN 20, por cinco vezes, e 80 µL de solução substrato (OPD 5 mg e peróxido de hidrogênio (30%) 1:1000 diluídos em tampão citrato-fosfato, pH 5,1) foram adicionados aos poços. Após 25 min (temperatura ambiente), para finalizar a reação, foram acrescentados 20 µL de solução de ácido sulfúrico 2 N. A leitura da densidade óptica foi feita em um leitor de microplacas (Multskam, Thermo Labsystems) com filtro de 492 e 620 nm como referência. A concentração do TNF foi determinada de acordo com uma curva padrão, com limite de detecção de 50 pg/mL.

3.13 Análises Estatísticas

Os dados de nitritos foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM), sendo comparados por meio de teste *t* de Student. Os dados de TNF foram apresentados como valores individuais e medianas (mínimo e máximo) e quartis (25% - 75%), sendo comparados por meio de teste *t* não pareado de Mann Whitney ou teste *t* pareado de Wilcoxon, comparando grupos tratados versus não tratados com PAF ou antagonista de PAF. Foi utilizado o Graph Pad PRISM software versão 4.0 (San Diego, CA, EUA). O nível de significância foi estabelecido em $p < 0,05$.

4. Resultados

4.1 Avaliação da atividade biológica das lipoproteínas de *Mycoplasma fermentans*.

Entre os agonistas de TLR usados nos experimentos deste estudo, o Pam₃Cys (agonista de TLR2/TLR1) e o LPS (agonista de TLR4) foram adquiridos comercialmente, mas as LAMPf de *M. fermentans* foram preparadas no laboratório de Imunidade Natural do IPTSP/UFG. Assim, inicialmente, foi analisado o perfil eletroforético das LAMPf, sua capacidade de ativar macrófagos murinos e uma possível contaminação com LPS. A análise do perfil eletroforético das LAMPf mostrou que pelo menos 20 proteínas com diferentes massas moleculares podem ser identificadas na preparação, havendo um predomínio de LAMPf entre 49 e 102 KDa. As LAMPf com aproximadamente 49, 30 ou 20 KDa são as que apresentam maiores concentrações na preparação (Fig. 2).

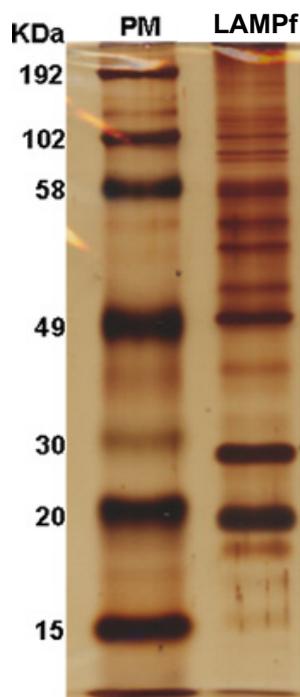


Figura 2. Perfil eletroforético das LAMPf de *Mycoplasma fermentans* PG 18. As LAMPf de *M. fermentans* PG 18 foram extraídas das membranas, usando detergente Triton X 114, e foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 10%). À esquerda o padrão de massa molecular (PM) e à direita as LAMPf (1 µg/mL).

Lipoproteínas e lipopeptídeos de micoplasmas induzem a produção de NO e TNF (Mühlradt et al. 1994), interagindo com o TLR2/TLR6 (Takeuchi et al. 2001). Portanto, foi avaliado se as LAMPf induziriam a produção de NO e TNF em uma linhagem de macrófagos murinos, a RAW 264.7. Os macrófagos foram cultivados com diferentes concentrações das LAMPf, na ausência ou na presença de 50 U/mL de IFN γ . Após 48 h de cultura, como pode ser observado na Figura 3A, a concentração das LAMPf que significativamente induziu a produção de NO foi a de 1 μ g/mL (LAMPf: $10,8 \pm 2,8 \mu\text{M NO}_2^-$ vs Meio: $1,1 \pm 0,3 \mu\text{M NO}_2^-$, n = 7, p < 0,05). O IFN γ agiu sinergisticamente com as LAMPf, aumentando significativamente a produção de NO (1 μ g/mL de LAMPf + IFN γ : $34,2 \pm 6,5 \mu\text{M NO}_2^-$ vs LAMPf: $10,8 \pm 2,8 \mu\text{M NO}_2^-$, n = 7, p < 0,05).

Como agonista de TLR4, o LPS foi utilizado nas mesmas concentrações estabelecidas para as LAMPf. O LPS induziu significativamente a produção de NO, de maneira dependente da concentração (Fig. 3B). A menor concentração de LPS (0,01 μ g/mL) induziu uma produção de NO similar àquela induzida pela maior concentração de LAMPf (1 μ g/mL). O Pam₃Cys, um lipopeptídeo triacilado, que interage com o heterodímero TLR2/TLR1 (Takeuchi et al. 2002), também induziu a produção de NO, de maneira dependente da concentração (Fig. 3C). A presença de IFN γ aumentou significativamente a produção de NO induzida pelo LPS e pelo Pam₃Cys (Fig. 3B e 3C). A partir destes experimentos, as concentrações dos agonistas a serem usadas nos próximos experimentos foram: LAMPf 1 μ g/mL, LPS e Pam₃Cys 0,1 μ g/mL.

Para excluir a possibilidade de contaminação das LAMPf com LPS, os agonistas, nas concentrações acima citadas, foram incubados por 30 minutos, antes de serem adicionados as culturas, com sulfato de polimixina B (PMB), uma substância que se liga ao LPS impedindo-o de ligar-se ao seu receptor (Morrison & Jacobs 1976). A Figura 4 mostra que a presença de PMB não alterou a indução de NO pelas LAMPf, nem pelo Pam₃Cys, e eliminou a produção de NO induzida pelo LPS, demonstrando que a preparação das LAMPf estava livre de contaminação pelo LPS.

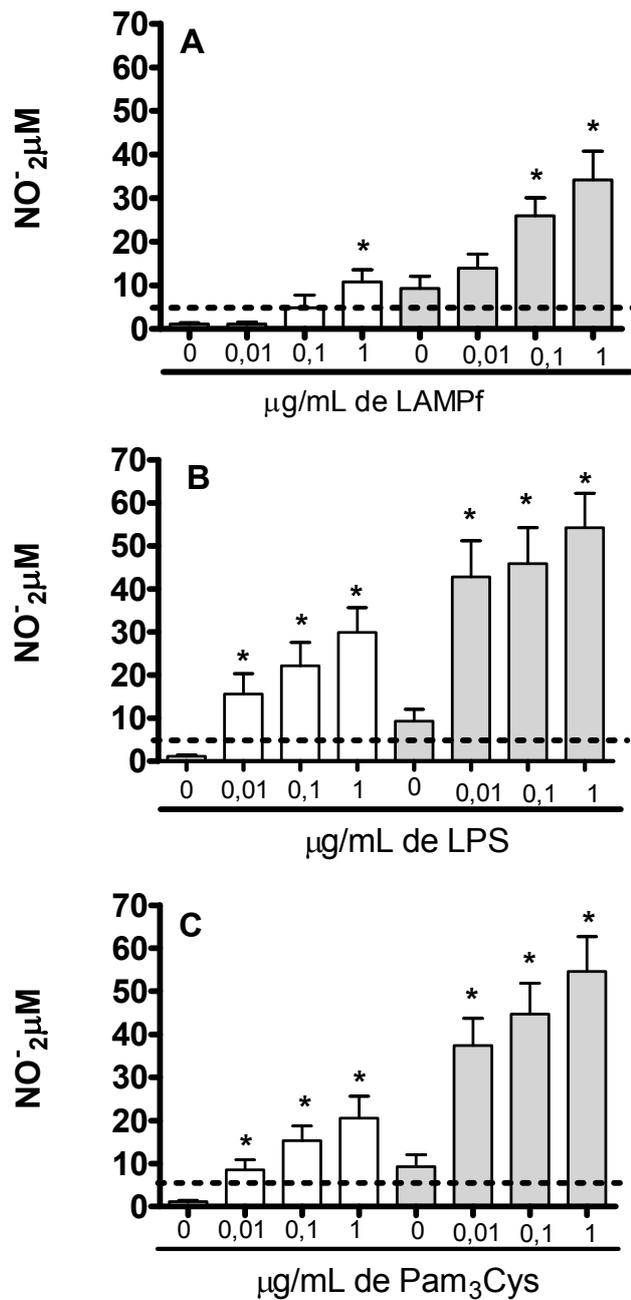


Figura 3. LAMPf e agonistas de TLR2 (Pam₃Cys) e TLR4 (LPS) induzem NO em macrófagos murinos RAW 264.7. Macrófagos RAW 264.7 (5×10^4 células/poço), cultivados com LAMPf (A), LPS(B) ou Pam₃Cys(C), em diferentes concentrações, na ausência (colunas vazias) ou na presença de IFN_γ 50 U/mL (colunas preenchidas). Após 48 h de incubação, os sobrenadantes foram colhidos, para dosagem de nitritos, usando a reação padrão de Griess. A linha horizontal representa o limite de detecção de nitritos (5 µM). São apresentadas as médias \pm EPM (n = 7 experimentos). *p < 0,05 (Teste t de Student, comparando meio vs agonista e IFN_γ vs IFN_γ + agonista).

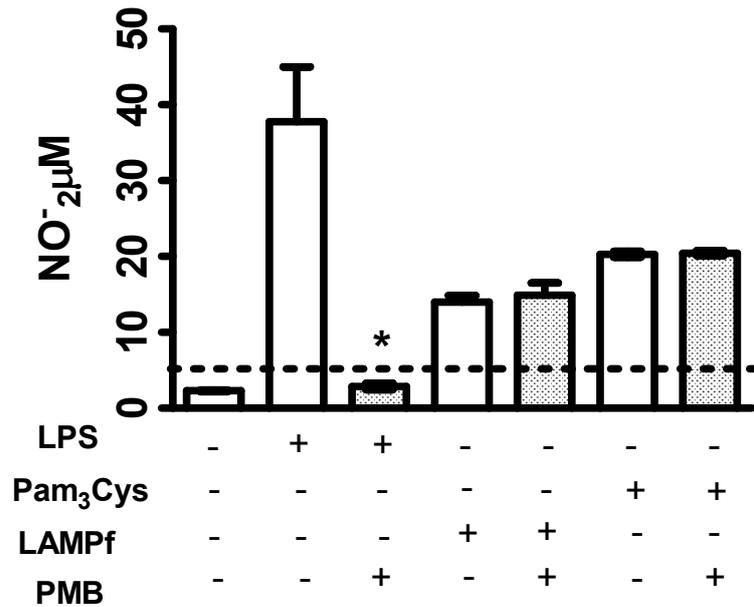


Figura 4. O tratamento com sulfato de polimixina B (PMB) não altera a produção de NO induzida pelas LAMPf. Macrófagos RAW 264.7 (5×10^4 células/poço), foram cultivados com 0,1 µg/mL de LPS, 0,1 µg/mL de Pam₃Cys ou 1 µg/mL de LAMPf, sendo tratados (colunas preenchidas) ou não (colunas vazias) com 10 µg/mL de PMB. Após 48 h de incubação, os sobrenadantes foram colhidos para dosagem de nitrito, usando a reação padrão de Griess. A linha tracejada representa o limite de detecção de nitritos (5 µM). São apresentadas as médias \pm EPM (n = 5 experimentos). * p < 0,05 (Test t de Student, comparando sem tratamento com PMB vs tratamento com PMB).

Os macrófagos RAW 264.7 foram incubados com LAMPf, LPS ou Pam₃Cys, na ausência ou na presença de IFN γ , para avaliar a indução de TNF. Os sobrenadantes das culturas foram colhidos após 6 ou 24 h de incubação, e a presença de TNF foi determinada pelo bioensaio com fibroblastos murinos L929. Como pode ser observado na Figura 5, as LAMPf são capazes de induzir TNF (8 U/mL), porém em níveis inferiores àqueles obtidos com LPS (40 U/mL) ou Pam₃Cys, 16 U/mL), após 6 h de incubação. Não houve diferença estatisticamente significativa entre a produção de TNF obtida após 6 ou 24 h de incubação. A presença de IFN γ juntamente com os agonistas, somente induziu um aumento significativo na produção de TNF induzida pelo Pam₃Cys, após 6 h e 24 h de incubação. Os resultados obtidos demonstram que as LAMPf são capazes de ativar os macrófagos murinos a produzir NO e TNF.

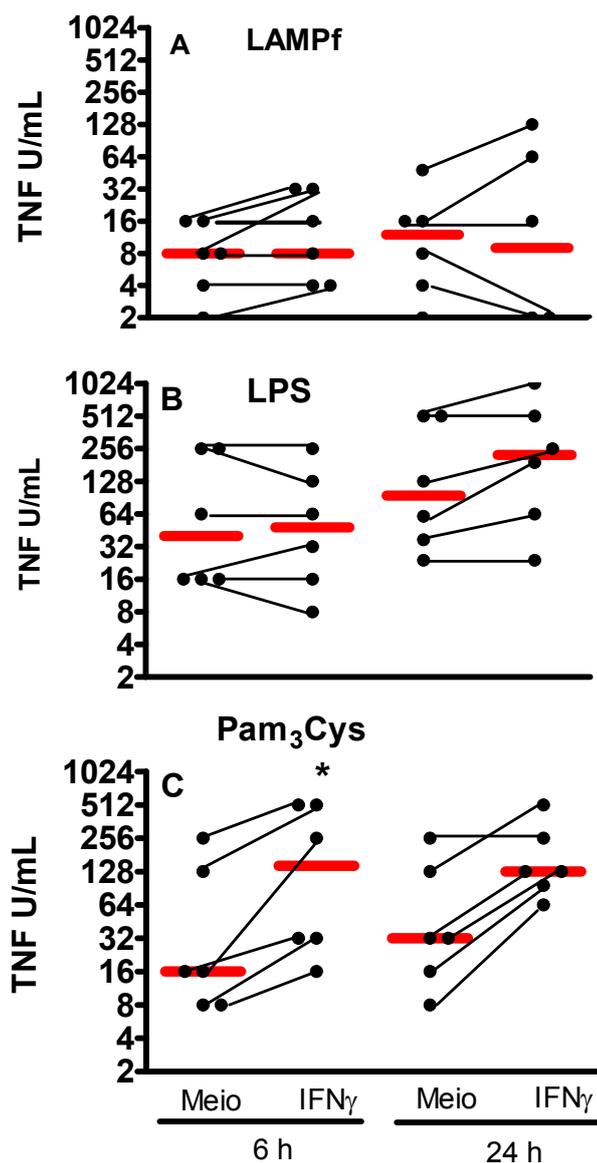


Figura 5. As LAMPf e agonistas de TLR4 (LPS) e TLR2 (Pam₃Cys) induzem a produção de TNF, em macrófagos murinos RAW 264.7. Macrófagos Raw 267.4 (5×10^4 /poço) foram cultivados com LAMPf (1 μ g/mL, A), LPS (0,1 μ g/mL, B), ou Pam₃Cys (0,1 μ g/mL, C), na ausência (meio) ou na presença de IFN γ (50 U/mL). Após os períodos de 6 ou 24 h de incubação, os sobrenadantes foram colhidos para dosagem de TNF pelo bioensaio com fibroblastos L929. Nos sobrenadantes das células não estimuladas não foi detectado TNF. São apresentados os valores individuais de 6 experimentos. As linhas vermelhas representam a mediana. * p < 0,05 (Teste t pareado de Wilcoxon, comparando células tratadas com IFN γ vs não tratadas).

4.2 Indução de TNF por agonistas de TLR2 e de TLR4 em hemoculturas humanas.

Os agonistas de TLR foram adicionados às hemoculturas humanas para o estudo da produção de TNF induzida em células humanas. Para estabelecer o curso temporal da produção de TNF, as hemoculturas foram incubadas com os agonistas (1 $\mu\text{g/mL}$), sob leve agitação, por 1, 3, 6 ou 24 h. O Pam₃Cys e o LPS induziram significativamente a produção de TNF nas hemoculturas (Pam₃Cys: 280 pg/mL, de 0 a 481; LPS: 530 pg/mL, de 319 a 1.304 pg/mL), enquanto a estimulação com as LAMPf induziu concentrações muito baixas (96 pg/mL, de 0 a 110 pg/mL). O pico da produção de TNF induzida pelo Pam₃Cys ou pelo LPS foi obtido após 6 h de incubação, havendo diminuição da concentração do TNF após 24 h de incubação com esses agonistas de TLR2 ou TLR4 (Fig. 6).

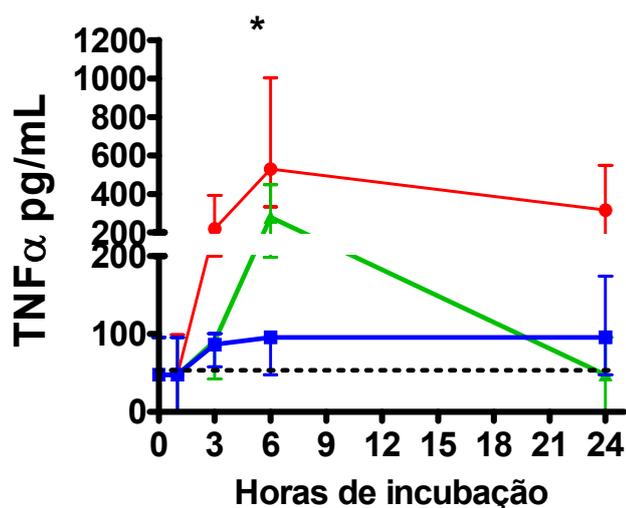


Figura 6. Curso temporal da produção de TNF α induzida por agonistas de TLR2 e TLR4 nas hemoculturas humanas. O sangue dos doadores foi diluído 1:2 em meio de cultura e as células foram estimuladas com Pam₃Cys (verde), LPS (vermelho), ou LAMPf (azul), na concentração de 1 $\mu\text{g/mL}$. Os sobrenadantes foram colhidos, após diferentes períodos de incubação, e a concentração de TNF α foi determinada por ELISA. A linha tracejada representa o limite de detecção do ensaio. São apresentadas as medianas e os quartis 25 - 75% (n = 3) * p < 0,05 (teste t Mann Whitney, comparando agonistas vs controle).

Em seguida, foi avaliada a curva concentração-resposta aos agonistas, dosando o TNF após 6 h de incubação. Assim, o sangue diluído foi incubado com diferentes concentrações dos agonistas de TLR2 ou TLR4. A Figura 7 mostra que a concentração de 100 ng/mL de LPS ou Pam₃Cys induziu produção máxima de TNF nas hemoculturas e que, acima desta concentração, não há alteração significativa na produção de TNF. No entanto, as LAMPf não induziram produção significativa de TNF nas hemoculturas até a concentração de 1 µg/mL. Assim, a concentração de LAMPf foi aumentada. Na concentração de 2,5 µg/mL, as LAMPf induziram significativamente a produção de TNF (387 pg/mL, de 125 a 618 pg/mL; Fig. 7 – inserto).

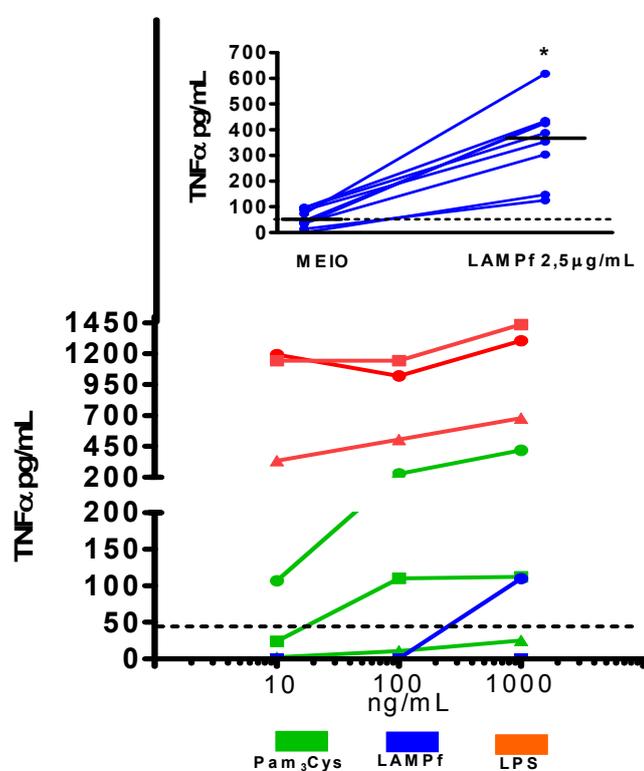


Figura 7. A produção de TNF α nas hemoculturas humanas induzida por agonistas de TLR2 ou TLR4 é dependente da concentração dos agonistas.

O sangue dos doadores foi diluído 1:2 em meio de cultura e as células foram estimuladas com Pam₃Cys (verde), LAMPf (azul) ou LPS (vermelho), em diferentes concentrações, sob agitação, por 6 h. Os sobrenadantes foram colhidos e a concentração de TNF α foi determinada por ELISA. São apresentadas as curvas individuais de três doadores. No inserto acima é mostrada a indução de TNF α em hemoculturas tratadas com 2,5 µg/mL de LAMPf (n = 10). A linha tracejada representa o nível de detecção do ensaio e as linhas horizontais representam as medianas. * p < 0,05 (Teste t Mann Whitney, comparando hemoculturas tratadas com LAMPf vs controles).

Portanto, as concentrações dos agonistas de TLR para os demais experimentos ficaram assim estabelecidas: Pam₃Cys e LPS 100 ng/mL e LAMPf 2,5 µg/mL. Nestas concentrações, todos os agonistas induziram significativa produção de TNF, porém o LPS (1.112 pg/mL, de 330 a 3.045 pg/mL, n = 27, p < 0,05) induziu maiores quantidades desta citocina do que o Pam₃Cys (298 pg/mL, de 42 a 793, n = 27, p < 0,05) e as LAMPf (370 pg/mL, de 117 a 900, n = 17, p < 0,05) Nas hemoculturas sem tratamentos o TNF não foi detectado ou as concentrações foram muito baixas (31 pg/mL, de 0 a 96 pg/mL, n = 27, Fig. 8).

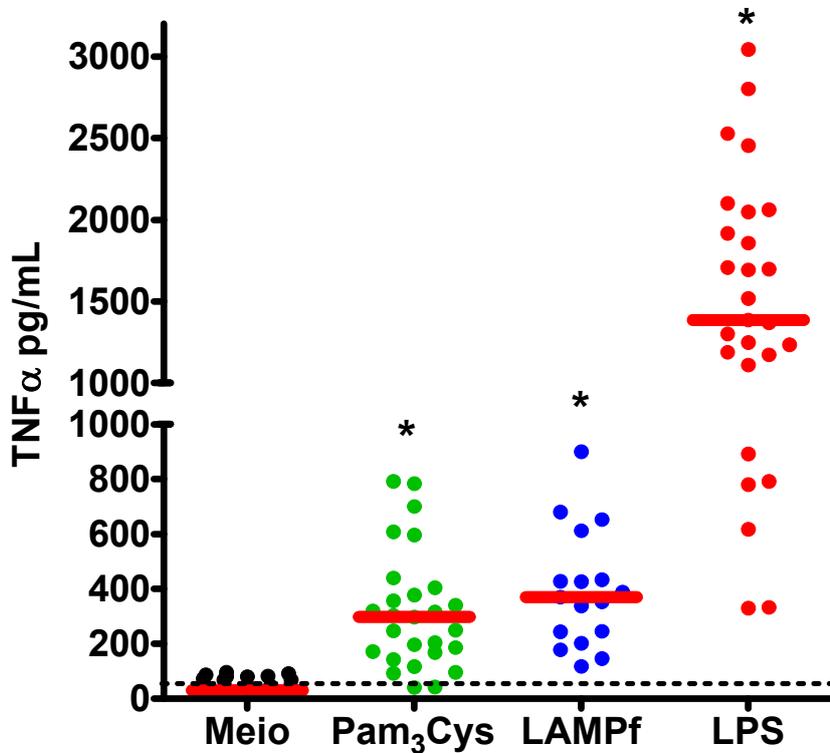


Figura 8. Agonistas de TLR2 induzem uma menor produção de TNF α do que agonista de TLR4 em hemoculturas humanas. O sangue dos doadores foi diluído 1:2 em meio de cultura e foi cultivado na ausência (preto) ou na presença de Pam₃Cys (0,1 µg/mL, verde), LAMPf (2,5 µg/mL, azul) ou LPS (0,1 µg/mL, vermelho). Após 6 h de incubação, os sobrenadantes das culturas foram colhidos e a concentração de TNF α foi determinada por ELISA. A linha tracejada representa o limite de detecção do ensaio (50 pg/mL). São apresentados os resultados individuais e as medianas (n = 27, Pam₃Cys ou LPS; n = 17, LAMPf). *p < 0,05 (Teste t Mann Whitney, comparando hemoculturas tratadas vs controles e tratados com Pam₃Cys ou LAMPf vs LPS).

4.3. Produção de TNF induzida pelos agonistas de TLR2 ou TLR4: modulação pelo PAF.

Para analisar a modulação da produção de TNF pelo PAF endógeno, induzido pelos agonistas de TLR2 ou de TLR4 nas hemoculturas, as mesmas foram pré-tratadas por 30 min com um antagonista do receptor do PAF, o WEB2170, em diferentes concentrações. Em seguida, as hemoculturas foram estimuladas com os agonistas por 6 h. O tratamento das hemoculturas estimuladas com Pam₃Cys, com o composto WEB2170, causou um significativo aumento na produção de TNF nas concentrações de 5×10^{-7} ou 5×10^{-6} M (Fig. 9 A). Na Figura 9B estão representadas as variações individuais da produção de TNF induzida pelo Pam₃Cys, na ausência ou na presença de WEB2170 na concentração de 5×10^{-6} M (Pam₃Cys: 316 pg/mL, de 48 a 784 pg/mL vs Pam₃Cys + WEB2170 5×10^{-6} M: 401 pg/mL, de 113 a 1.008 pg/mL, n = 17 p < 0,05). Nas hemoculturas estimuladas com LAMPf, o pré-tratamento com WEB2170 não alterou significativamente a produção de TNF, embora em algumas hemoculturas houvesse um evidente aumento (n = 17; Fig. 9C e 9D). Em nenhuma das concentrações do WEB2170 usadas houve alteração significativa da produção de TNF induzida pelo LPS (Fig. 9E). A Figura 9F mostra a variação individual da produção de TNF em hemoculturas tratadas com o antagonista de PAF na concentração de 5×10^{-6} M (n = 18), indicando que o tratamento com WEB2170, na maioria das hemoculturas avaliadas, pouco alterou as concentrações de TNF obtidas.

O WEB2170 antagoniza o PAF que será produzido rapidamente após a ativação dos TLR e os experimentos com este antagonista indicaram que o PAF produzido após a sinalização via TLR pode ter efeito modulatório negativo na produção de TNF. Além disto, é conhecido que o PAF exerce seu efeito potencializador da produção de citocinas por meio da pré-sensibilização das células (Arbabi et al. 1999). Portanto, para o estudo da ação do PAF exógeno, o PAF foi adicionado às hemoculturas nas concentrações de 10^{-8} M ou 10^{-10} M, em diferentes tempos antes da estimulação com agonistas de TLR, juntamente ou 10 minutos após a ativação das células com estes agonistas.

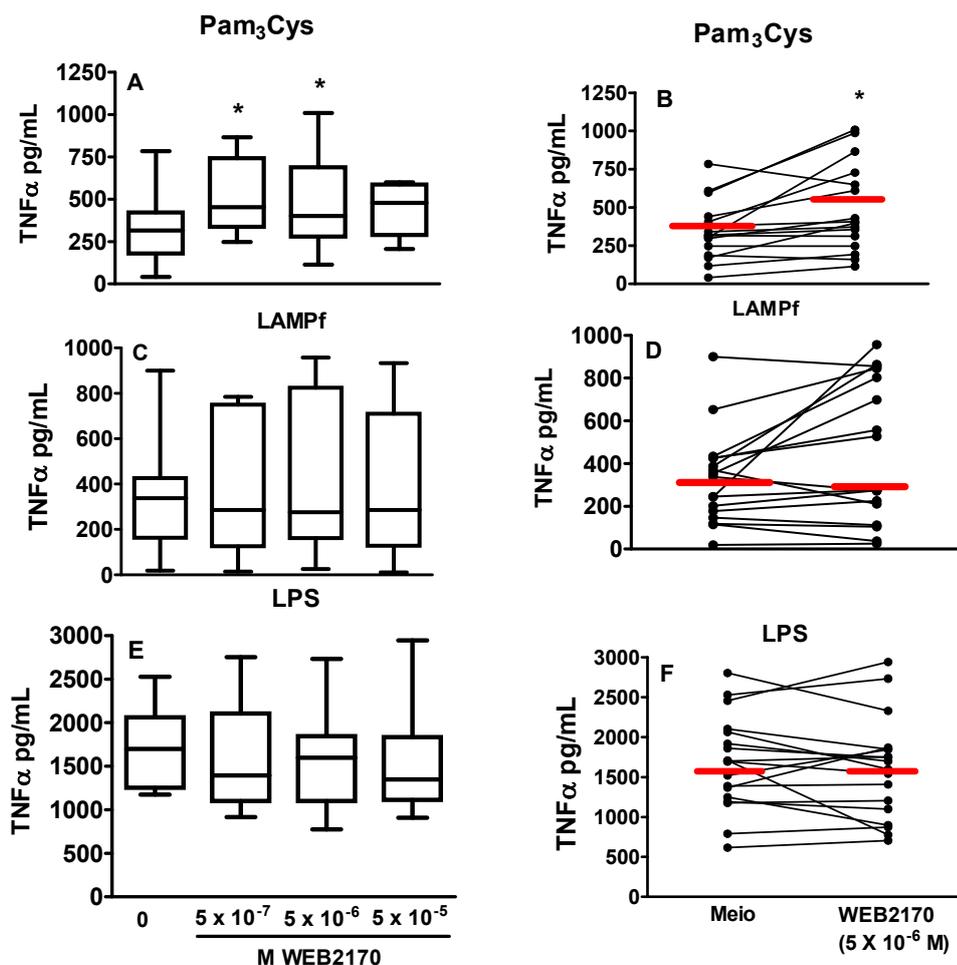


Figura 9. Antagonista de PAF aumenta a produção de $TNF\alpha$ induzida por agonista de TLR2 (Pam_3Cys). O sangue dos doadores foi diluído 1:2 em meio de cultura e cultivado na ausência ou na presença de WEB2170, em diferentes concentrações, 30 min antes da estimulação com os agonistas de TLR2 (Pam_3Cys 0,1 $\mu g/mL$, A, n = 17; ou LAMPf 2,5 $\mu g/mL$, C, n = 17) ou agonista de TLR4 (LPS 0,1 $\mu g/mL$, E, n = 18). Após 6 h, os sobrenadantes foram colhidos e a concentração de $TNF\alpha$ foi determinada por ELISA. Em A, C e E são apresentadas as medianas, quartis (25% a 75%) e os valores mínimo e máximo. Em B, D e F são apresentados os valores individuais e as medianas. * $p < 0,05$ (Teste t pareado de Wilcoxon, meio vs WEB2170).

A Figura 10A mostra que o pré-tratamento com PAF 10^{-8} M por 3 h ou 30 minutos antes da adição de Pam_3Cys aumentou significativamente a produção de TNF. A adição simultânea do PAF com o Pam_3Cys ou 10 minutos após a adição deste agonista não alterou significativamente a produção de TNF (Fig. 10A, n = 7). Em todos os momentos avaliados, a adição de PAF 10^{-8} M induziu um significativo aumento na produção de TNF nas hemoculturas estimuladas com as LAMPf (Fig 10B, n = 7, $p < 0,05$). Assim como para o Pam_3Cys , o pré-tratamento com o PAF

10^{-8} M das hemoculturas por 3 h ou 30 minutos aumentou significativamente a produção de TNF nas hemoculturas estimuladas com LPS (Fig 10C, $n = 7$, $p < 0,05$).

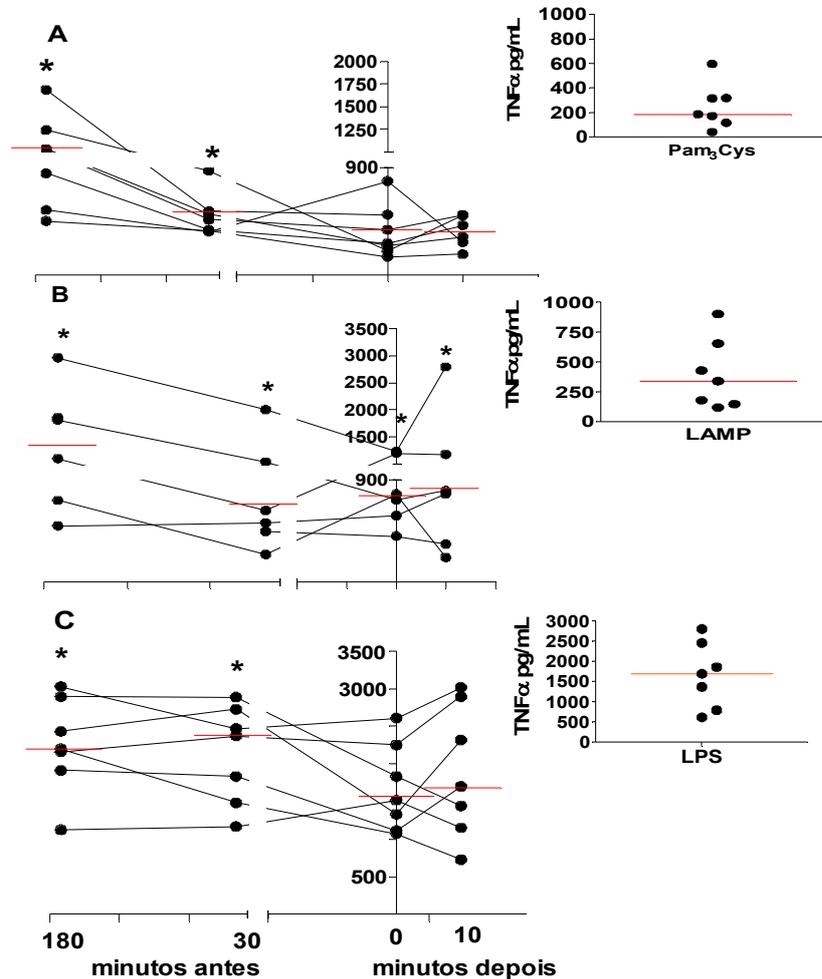


Figura 10. Os efeitos do PAF na produção de TNF α induzido por agonistas de TLR são dependentes do momento em que o PAF age nas células. O sangue dos doadores foi diluído 1:2 em meio de cultura e tratado com PAF 10^{-8} M em diferentes momentos antes, junto ou após a adição dos agonistas de TLR (Pam₃Cys 0,1 μ g/mL, A; LAMPf 2,5 μ g/mL, B; LPS 0,1 μ g/mL, C). Após 6 h, os sobrenadantes foram colhidos e a concentração de TNF α foi determinada por ELISA. São apresentados os valores individuais e as medianas (em vermelho, $n = 7$). Nos insertos de cada gráfico, são apresentados os dados das hemoculturas não tratadas com PAF. * $p < 0,05$ (Teste t pareado de Wilcoxon, comparando hemoculturas tratadas com PAF vs não tratadas).

Resultados similares foram obtidos com PAF 10^{-10} M (dados não mostrados). Estes resultados indicam que a pré-sensibilização celular com o PAF por 3 h é

mais eficaz para aumentar a produção de TNF induzida por agonista de TLR2 ou TLR4.

Em seguida, foi avaliado o efeito da concentração de PAF na produção de TNF, sensibilizando as células por 3 h com o PAF antes da adição dos agonistas de TLR. O pré-tratamento com PAF, em todas as concentrações, aumentou significativamente a produção de TNF induzida pelo Pam₃Cys (Fig. 11A), sendo a concentração de 10⁻⁸ M a que melhor induziu este aumento (Pam₃Cys: 310 pg/mL, de 42 a 792 pg/mL vs Pam₃Cys + PAF 10⁻⁸ M: 827 pg/mL, de 278 a 3.572, n = 18, p < 0,05, Fig. 11B). Apenas em duas hemoculturas avaliadas não houve aumento da produção do TNF (Fig. 11B). O tratamento com o PAF nas concentrações de 10⁻¹⁰ e 10⁻⁸ M, antes da estimulação com LAMPf, induziu um aumento significativo na produção de TNF (n = 18, p < 0,05, Fig. 11C). A Figura 11D mostra a variação individual da produção de TNF induzida pelas LAMPf nas hemoculturas pré-tratadas com PAF 10⁻⁸ M (LAMPf: 291 pg/mL, de 19 a 900 pg/mL vs LAMPf + PAF 10⁻⁸ M: 801 pg/mL, de 31 a 2.961 pg/mL n = 17, p < 0,05). O pré-tratamento com o PAF não alterou significativamente a produção de TNF nas hemoculturas estimuladas com LPS quando o número de hemoculturas avaliadas foi aumentado (n = 18, Fig. 11E). A Figura 11F mostra a variação individual obtida (LPS: 1.697 pg/mL, de 613 a 2803 pg/mL vs LPS + PAF 10⁻⁸ M: 1663 pg/mL, de 655 a 3.054). Pode ser observado que apenas três hemoculturas mostram aumento da produção de TNF.

Devido à alta variabilidade individual nas respostas, o número de amostras avaliadas para o pré-tratamento com o PAF e aquelas tratadas simultaneamente com o PAF e os agonistas de TLR foi aumentado. A Figura 12 representa os resultados obtidos, confirmando que o pré-tratamento com o PAF é mais eficaz que o tratamento simultâneo com o PAF para aumentar a produção de TNF induzida por agonistas de TLR2 (Fig. 12A, 12B, 12C, 12D). Para os agonistas de TLR4, o tratamento com o PAF não alterou significativamente a produção de TNF, independente do tempo (Fig. 12E e 12F).

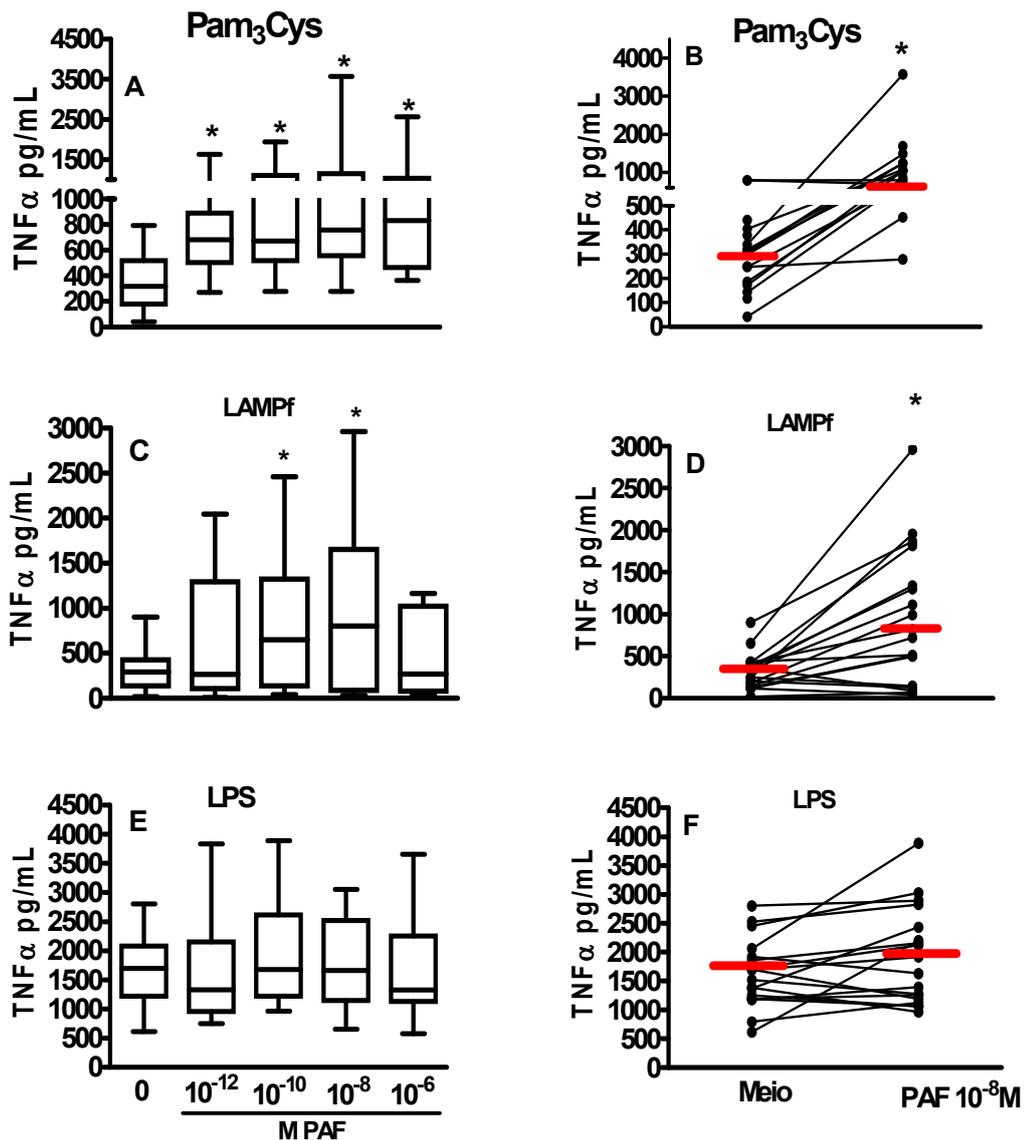


Figura 11. PAF exógeno, de maneira dependente da concentração, aumenta a produção de $TNF\alpha$ induzida por agonistas de TLR2. O sangue dos doadores foi diluído 1:2 em meio de cultura e foi tratado com PAF em diferentes concentrações por 3 h. Após este período, as culturas foram estimuladas com agonistas de TLR2 (Pam₃Cys 0,1 μ g/mL, A; ou LAMPf 2,5 μ g/mL, C) ou agonista de TLR4 (LPS 0,1 μ g/mL, E). Após 6, h a concentração de $TNF\alpha$ foi determinada por ELISA. Em A, C e E são apresentadas as medianas, quartis (25% -75%) e valores mínimo e máximo. Em B, D e F são apresentados os valores individuais e as medianas (vermelho), sem (meio) e com o tratamento com PAF 10⁻⁸ M. * $p < 0,05$ (Teste *t* pareado de Wilcoxon, tratados com PAF vs não tratados, n = 18)

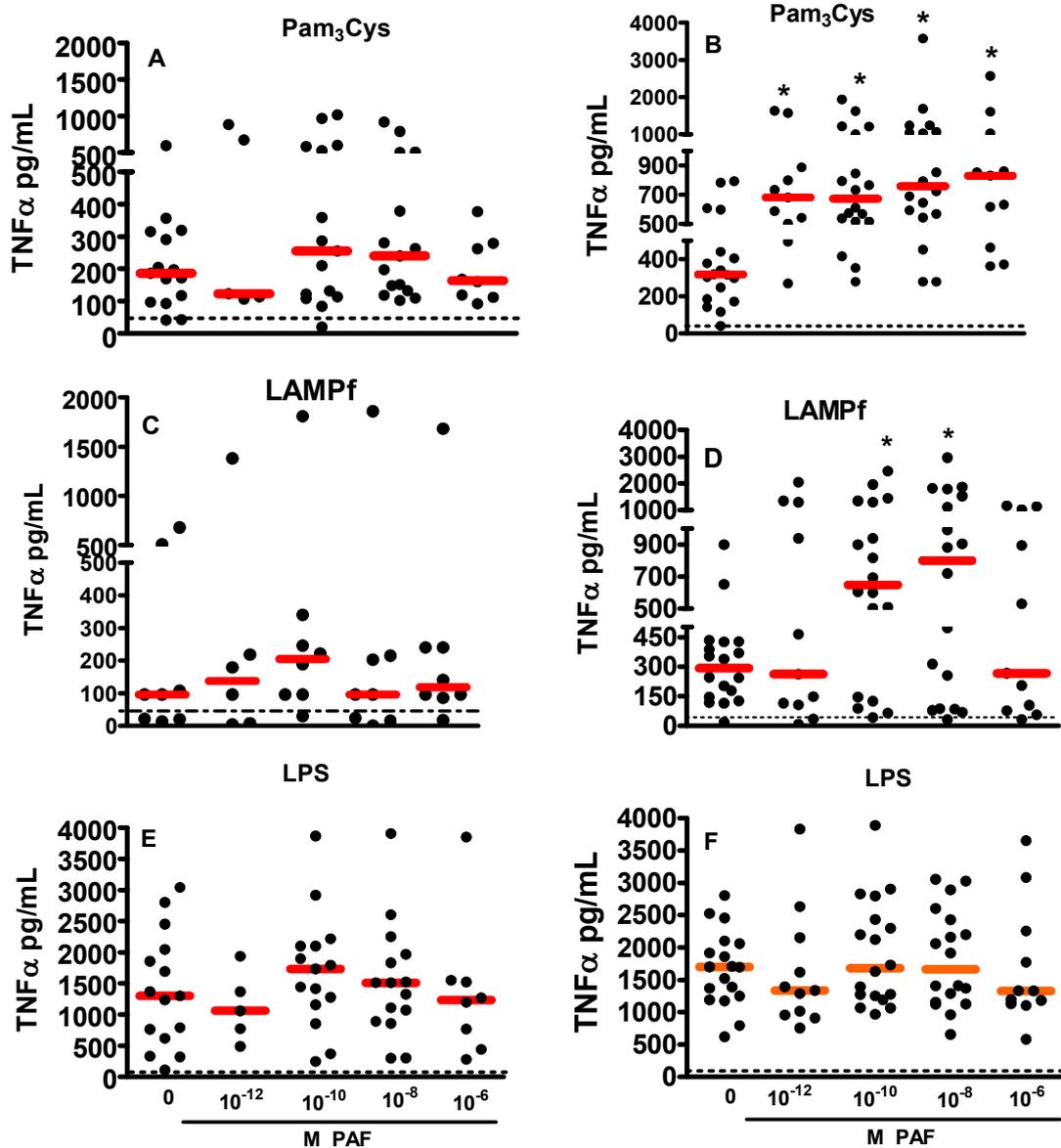


Figura 12. Pré-estimulação com PAF é mais eficiente para aumentar a produção de TNF α induzido por agonistas de TLR2 do que a estimulação simultânea com o agonista. O sangue dos doadores foi diluído 1:2 em meio de cultura e foi estimulado com Pam₃cys (0,1 μ g/mL, A, n = 15 e B, n = 18), LAMPf (2,5 μ g/mL C, n = 8 e D, n = 18) ou LPS (0,1 μ g/mL, E, n = 15 e F, n = 18) Em A, C e E, as hemoculturas foram tratadas ou não com PAF, em diferentes concentrações, adicionado juntamente com os agonistas de TLR. Em B, D e F, as culturas foram pré-tratadas ou não com PAF, em diferentes concentrações, 3 h antes da adição dos agonistas de TLR. Após 6 h, a concentração de TNF α foi determinada por ELISA. São apresentados os valores individuais e as medianas (vermelho). A linha pontilhada representa o limite de detecção do TNF α no ELISA (50 pg/mL). *p < 0,05 (Teste t pareado de Wilcoxon).

Uma possibilidade para o aumento da produção de TNF, induzida pelo Pam₃Cys ou pelas LAMPf após o pré-tratamento com o PAF, seria o aumento da expressão dos TLR2 nos polimorfonucleares (PMN) e/ou nos monócitos do sangue.

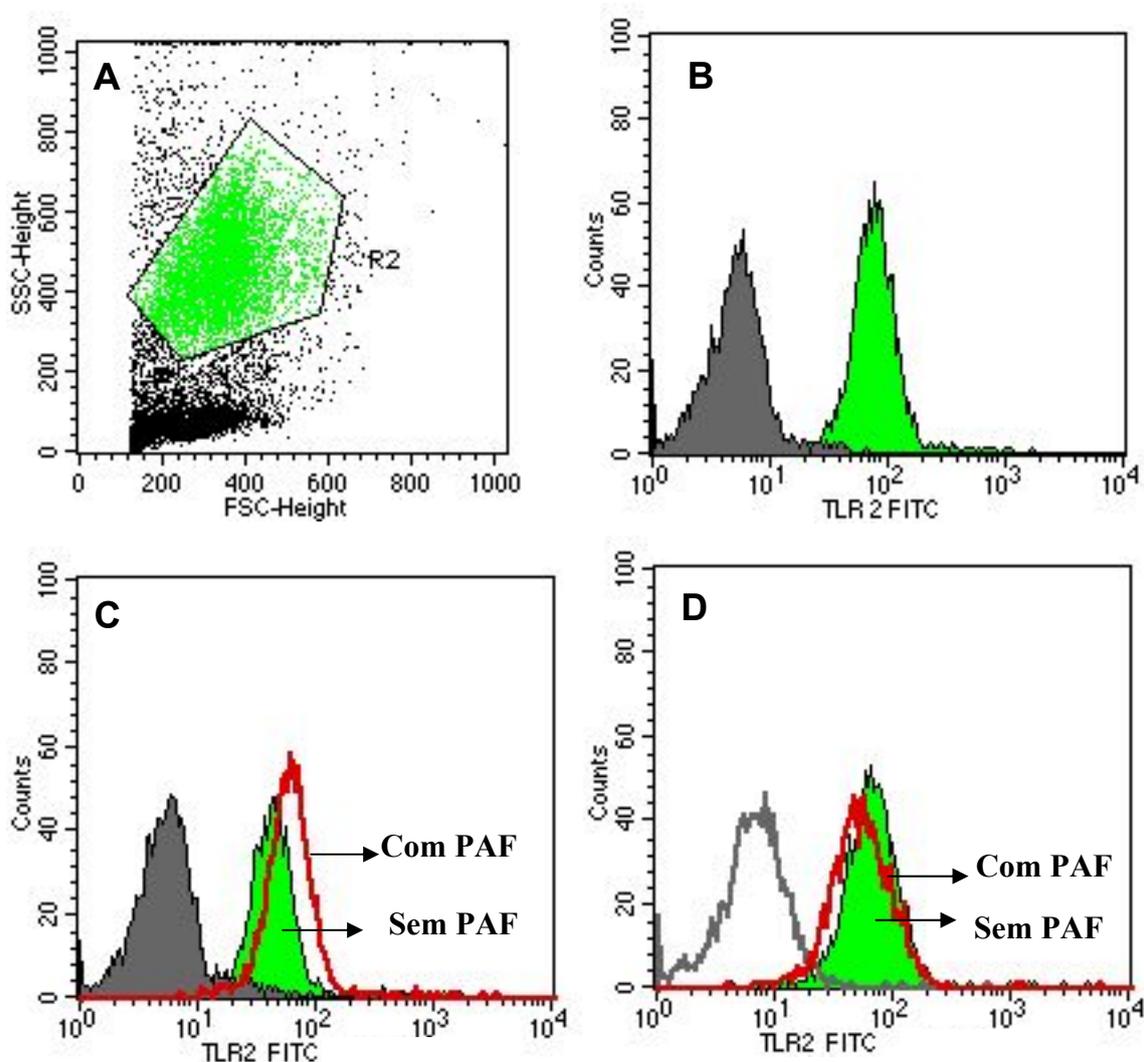


Figura 13. A pré-estimulação com PAF não altera a expressão de TLR2 em granulócitos. O sangue foi estimulado com PAF nas concentrações de 10^{-8} ou 10^{-10} M, por 3 h, a 37°C , sob agitação. Após a incubação, as células foram tratadas com anticorpos com anti-TLR2/FITC ou anticorpo isótipo controle. Em A, é mostrada a janela da população dos granulócitos (verde). Em B, os granulócitos expressando TLR2 (verde); em cinza, o controle isotípico. Em C e D são apresentadas as expressões de TLR2 nas células pré-tratadas com PAF nas concentrações de 10^{-8} ou 10^{-10} M, respectivamente (verde). A linha vermelha representa a expressão de TLR2 nas células não tratadas e em cinza, o controle isotípico. As figuras são representativas de 3 experimentos.

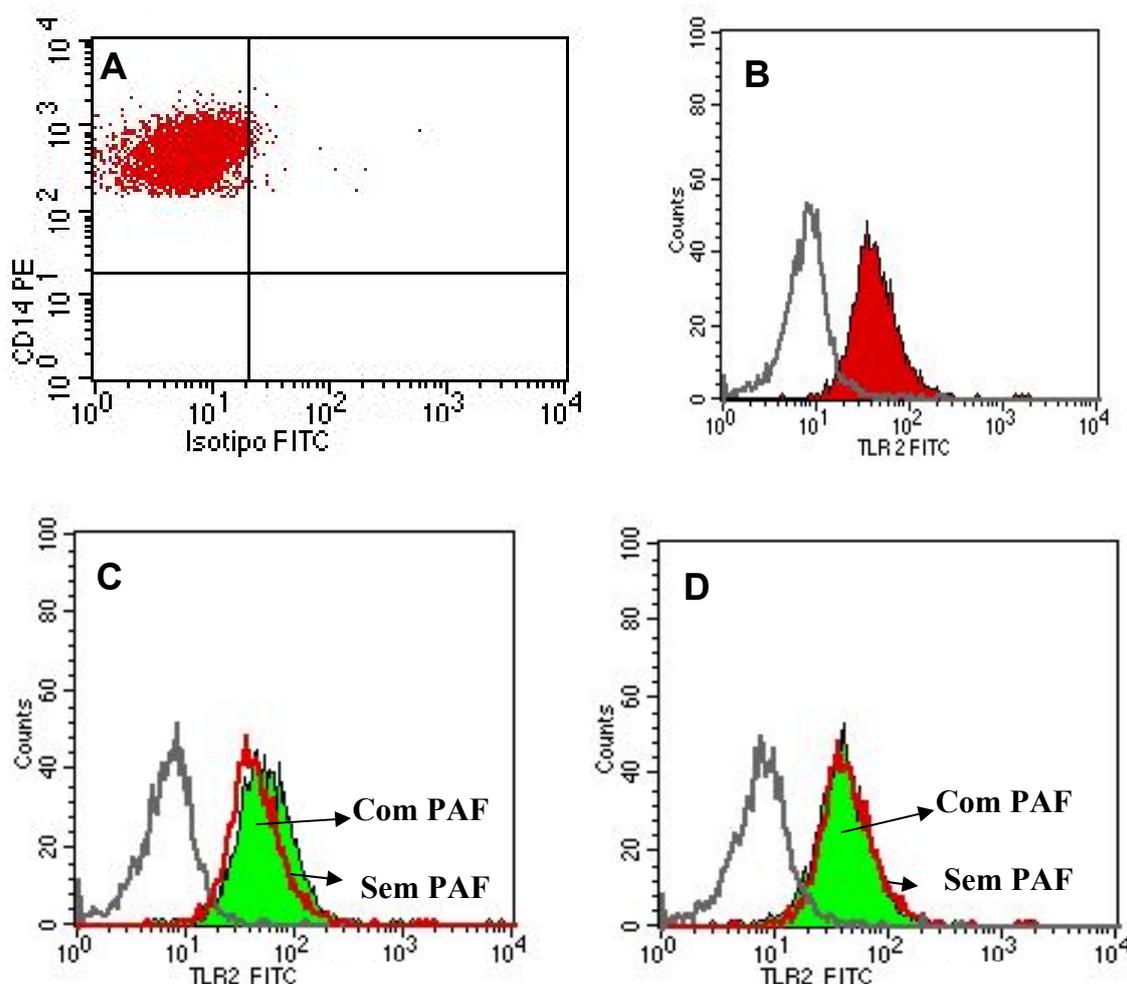


Figura 14. A pré-estimulação com PAF não altera a expressão de TLR2 em monócitos. O sangue foi estimulado com PAF nas concentrações de 10^{-8} ou 10^{-10} M, por 3 h, a 37°C , sob agitação. Após a incubação, as células foram incubadas com anticorpos anti-CD-14/PE, anti-TLR2/FITC ou isotipo controle. Em A, é mostrada a população das células $\text{CD}14^{+}$. Em B, os monócitos $\text{CD}14^{+}$ expressando TLR2 (vermelho). Em C e D é apresentada a expressão de TLR2 nas células pré-tratadas com PAF (verde) nas concentrações de 10^{-8} ou 10^{-10} M, respectivamente. A linha vermelha representa a expressão de TLR2 nas células não tratadas. A linha cinza representa o controle isotípico em B, C e D. As figuras são representativas de 3 experimentos.

A análise da expressão de TLR2 nos PMN (Fig. 13) ou nos monócitos $\text{CD}14^{+}$ (Fig. 14), por citometria de fluxo, mostrou que não há alteração significativa na expressão desse receptor após incubação do sangue por 3 h com o PAF nas concentrações de 10^{-8} ou 10^{-10} M. A intensidade média da fluorescência (IMF) para TLR2 nos granulócitos das hemoculturas não tratadas com PAF foi de 74 (de 60,8 a 79), sendo após 3 h de tratamento com PAF 10^{-8} M de 64 (de 48,3 a 74,3) e quando a dose foi diminuída para 10^{-10} M, a mediana foi de 55,7 (de 52 a 58).

Nos monócitos não tratados com o PAF a mediana da IMF foi de 54,4 (de 47,3 a 59,8) e após a estimulação com PAF 10^{-8} M a mediana da IMF foi de 64,01 (de 62,5 a 67,03). Após tratamento com PAF na concentração de 10^{-10} M, a mediana foi de 72,03 (de 52,9 a 71,07).

4.4 Produção de TNF induzida por bactérias Gram positiva (*Staphylococcus aureus*) ou Gram negativa (*Escherichia coli*) em hemoculturas e sua modulação pelo PAF.

Após a análise da produção do TNF pelos PAMPs bacterianos e sua modulação pelo PAF nas hemoculturas, a produção de TNF induzida por bactérias inteiras e sua modulação pelo PAF também foi avaliada. Para isto, inicialmente, o sangue diluído foi cultivado com *S. aureus* ou *E. coli* na concentração de 10^7 bactérias/mL e para estabelecer o curso temporal da produção de TNF, as hemoculturas foram incubadas por 3, 6 ou 24 h. Assim como para os PAMPs, após 6 h houve o pico de produção de TNF induzido pelas bactérias, sendo a produção de TNF induzido por *E. coli* significativamente mais elevada do que a induzida por *S. aureus* (*E. coli*: 6.216 pg/mL, de 3.836 a 8.255 pg/mL vs *S. Aureus*: 655 pg/mL, de 460 a 2.972 pg/mL, 6 h de incubação, n = 3, p < 0,05, Fig. 15A e 15C). Em seguida, foi realizada a curva concentração-resposta com as bactérias, após 6 h de incubação, a qual mostrou que a produção de TNF induzida é dependente da concentração das bactérias (Fig. 15B e 15D). Para *S. Aureus*, a concentração de 10^7 bactérias/mL, a qual induziu 655 pg/mL de TNF (de 460 a 2.972 pg/mL) foi escolhida para os demais experimentos, enquanto para *E. coli*, a concentração de 10^6 bactérias/mL (2.302 pg/mL, 1.324 a 5.360 pg/mL de TNF) foi a escolhida para os experimentos subseqüentes.

A modulação da produção do TNF pelo PAF foi avaliada nas hemoculturas estimuladas com as bactérias. O tratamento com WEB2170 (Fig.16A) na concentração de 5×10^{-6} M (30 min) reduziu a produção de TNF induzida pelo *S. aureus* (*S. aureus*: 718 pg/mL, de 507 a 3.064 pg/mL vs WEB2170 + *S. aureus*: 603 pg/mL, de 369 a 2.489 pg/mL, n = 10, p < 0,05). A Figura 16B mostra a variação individual da produção de TNF induzida por *S. aureus*, na ausência ou na presença de WEB2170 5×10^{-6} M. O pré-tratamento com WEB2170 em

nenhuma das concentrações testadas alterou significativamente a produção de TNF induzida pela *E. coli* nas hemoculturas (Fig. 16C e D, n = 10).

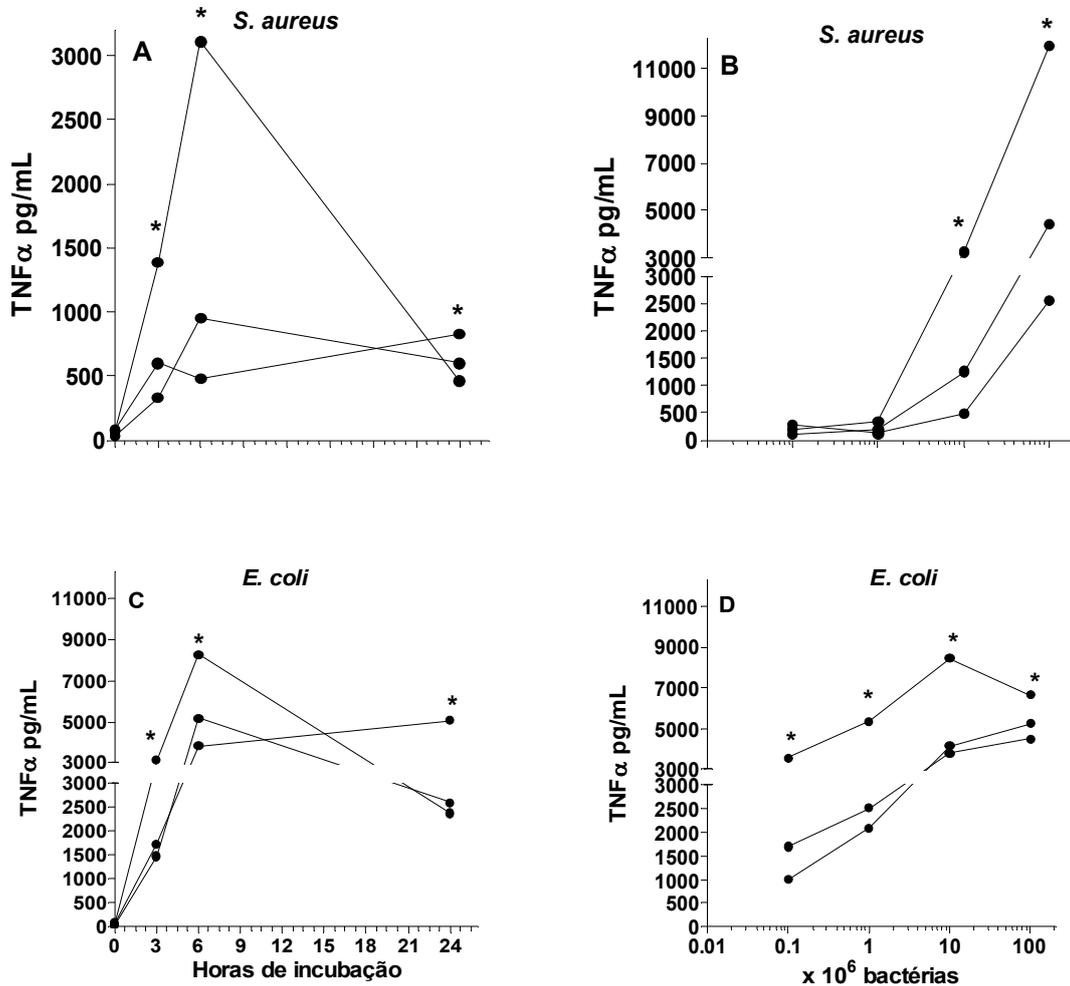


Figura 15. *Staphylococcus aureus* ou *Escherichia coli* induzem altos níveis de TNF α nas hemoculturas, de maneira dependente do tempo e da concentração bacteriana. O sangue dos doadores foi diluído 1:2 em meio de cultura e incubado com *S. aureus* (A) ou *E. coli* (C) na concentração 1 x 10⁷ bactérias/mL, ou com diferentes concentrações de *S. aureus* (B) ou *E. coli* (D), por 6 h, 37°C, sob agitação. Após os períodos de incubação, os sobrenadantes foram colhidos e a produção de TNF α foi avaliada por ELISA. O limite de detecção do ensaio foi de 50 pg/mL de TNF α (hemoculturas controles: 59 pg/mL, de 35 a 83 pg/mL). São apresentadas as curvas individuais de 3 doadores. *p < 0,05 (Teste t Mann Whitney, comparando controles vs tratados com bactérias).

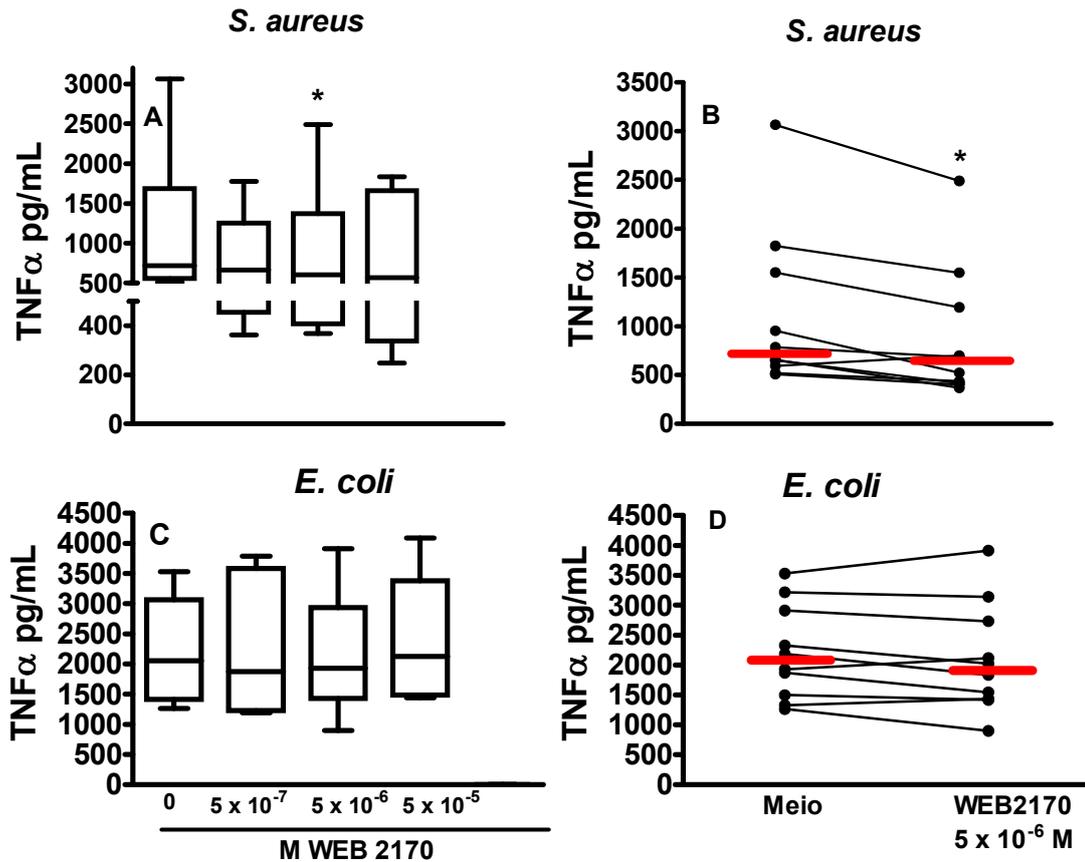


Figura 16. Antagonista de PAF diminui a produção de TNF α induzida por *S. aureus*. O sangue dos doadores foi diluído 1:2 em meio de cultura e pré-tratado ou não com WEB2170, em diferentes concentrações, por 30 min (A e C) antes da estimulação com *S. aureus* (10^7 bactérias/mL, A e B) ou *E. coli* (10^6 bactérias/mL, C e D). Após 6 h de incubação, os sobrenadantes foram colhidos para a dosagem de TNF α por ELISA. Em A e C são apresentadas as medianas, os quartis (25% - 75%) e os valores mínimo e máximo e em B e D são apresentados os valores individuais e as medianas (vermelho). * $p < 0,05$ (teste t pareado de Wilcoxon, comparando tratados vs controles não tratados, $n = 10$).

O pré-tratamento das hemoculturas com o PAF por 3 h, em diferentes concentrações, não alterou significativamente a produção de TNF nas hemoculturas estimuladas com *S. aureus* (Fig. 17A e 17B, $n = 12$). Como pode ser visto na Figura 17B, houve aumento em algumas hemoculturas em que o PAF foi adicionado na concentração de 10^{-8} M, no entanto, na maioria das hemoculturas, o tratamento com o PAF não alterou a produção de TNF induzida pelo *S. aureus*. Nas hemoculturas estimuladas com *E. coli* foi observada uma grande variação no efeito do PAF na produção do TNF, mostrando desde uma

ausência de efeito, a uma diminuição ou aumento da produção de TNF (Fig. 17C e 17D).

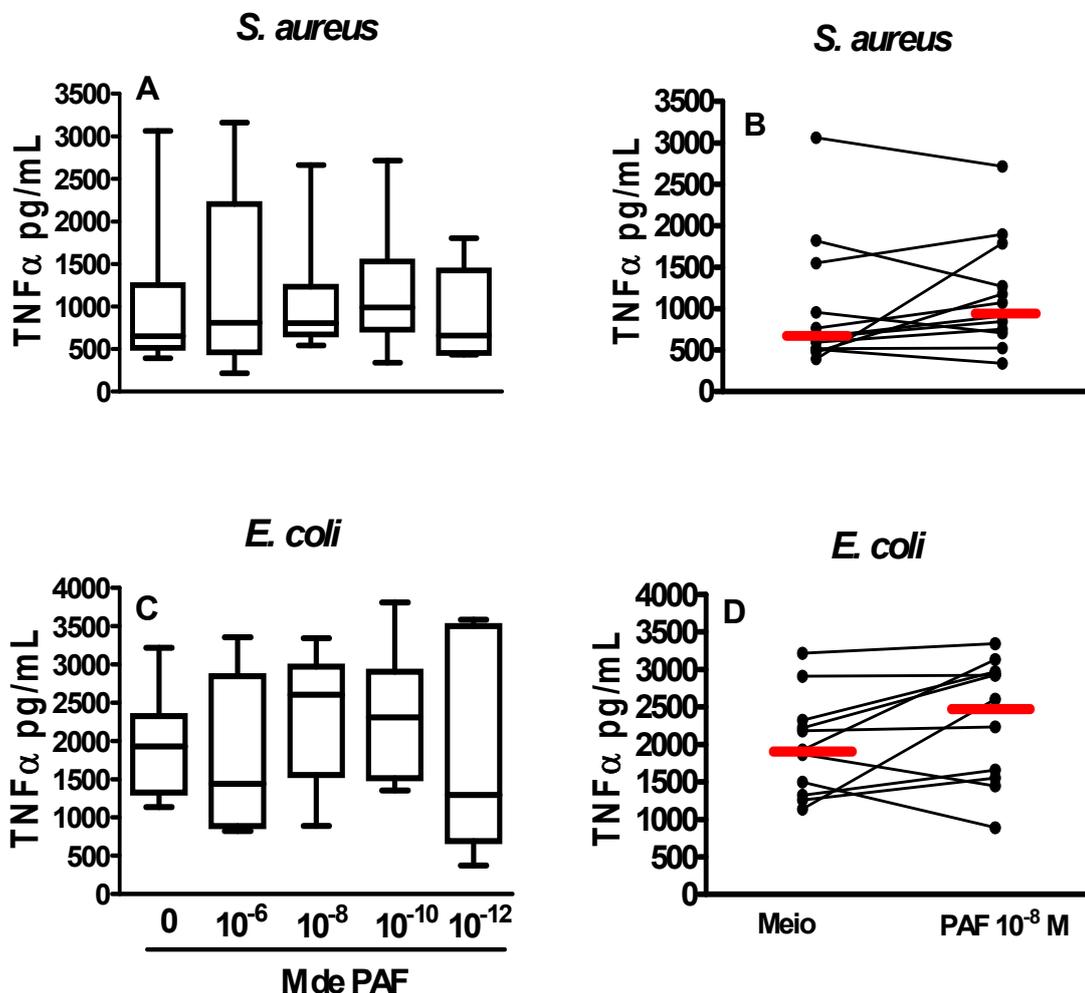


Figura 17. Avaliação da modulação da produção de TNF induzida por bactérias Gram positivas ou Gram negativas pelo PAF exógeno. O sangue dos doadores foi diluído 1:2 em meio de cultura e pré-tratado ou não com PAF, em diferentes concentrações por 3 h (A e C) antes da estimulação com *S. aureus* (10^7 bactérias/mL, A e B) ou *E. coli* (10^6 bactérias/mL, C e D). Após 6 h de incubação, os sobrenadantes foram colhidos para a dosagem de TNF α por ELISA. Em A e C são apresentadas as medianas, os quartis (25% - 75%) e os valores mínimo e máximo (n = 11). Em B e D são apresentados os valores individuais e as medianas (vermelho)

5. Discussão

No presente trabalho foi demonstrado que o PAF modula a produção de TNF em hemoculturas humanas ativadas com agonistas de TLR2. Os agonistas de TLR2 utilizados foram as LAMPf de *M. fermentans* PG18 e o Pam₃Cys. As LAMPf foram extraídas das membranas de *M. fermentans* PG18, e a sua atividade biológica foi, inicialmente, avaliada em ensaios de ativação de macrófagos murinos RAW 264.7. As LAMPf, isoladamente, induziram a produção de NO, na concentração de 1 µg/mL, e na presença de IFN_γ, na concentração de 0,1 µg/mL. Os resultados são similares aos obtidos por Mühlradt & Frisch (1994), que demonstraram que um material de alta massa molecular (MDHM, *M. fermentans derived high molecular-weight material*) foi capaz de induzir TNF e NO, quando adicionado juntamente com IFN_γ, em macrófagos peritoneais murinos. No presente trabalho, as LAMPf também induziram a produção de TNF nas culturas de células RAW 264.7, concordando com os resultados previamente publicados por Rawadi et al. (1998). Estes autores demonstraram que as LAMPf induzem a produção de TNF em macrófagos murinos RAW 264.7 na concentração de 1 µg/mL, e a concentração de LPS que induziu níveis similares a esta concentração de LAMPf foi a de 0,1 µg/mL, assim como em nossos experimentos com estas células. Nós mostramos que o tratamento das LAMPf com PMB não interferiu com a sua atividade biológica, indicando que a preparação estava livre de LPS contaminante, e como esperado, a polimixina B inibiu a produção de NO induzida pelo LPS. Ribeiro-Dias et al. (1999) avaliaram a indução de NO por produtos de micoplasma e demonstraram que a PMB não altera a atividade indutora de NO pelos produtos de micoplasma, e que o NO induzido pelo LPS é bloqueado pelo tratamento do LPS com a PMB. Estes resultados são compatíveis com a ausência de LPS na membrana de micoplasma (Smith et al. 1976) e também demonstram que durante a preparação não houve significativa contaminação das LAMPf com esse PAMP.

O outro agonista de TLR2 utilizado foi o Pam₃Cys, um lipopeptídeo triacilado sintético, conhecido por interagir com TLR2 em associação com TLR1 (Takeuchi et al., 2002). O uso deste agonista sintético foi imprescindível para garantir uma ligação específica em TLR2, uma vez que não se pode excluir a

possibilidade de que a nossa preparação de LAMPf contenha agonistas de outros TLRs. No presente trabalho, foi demonstrado que o Pam₃Cys é capaz de induzir a produção de NO e de TNF nas culturas de células RAW 264.7, como já previamente demonstrado por Hauschildt et al. (1990) em macrófagos derivados da medula. Como agonista de TLR4, nós usamos o LPS (de *E. coli*), o principal PAMP para este TLR e cujas propriedades biológicas são bem conhecidas, entre elas a indução de NO e TNF. Assim, nós confirmamos a indução de NO e TNF pelo LPS nas culturas de células RAW 264.7, já demonstrada por outros autores (Stuehr & Marletta 1987; Kelly et al. 1991), e estabelecemos as concentrações dos três PAMPs a serem usadas nos experimentos subseqüentes. Diferente do LPS e das LAMPf, para os quais, o tratamento das células Raw267.4 com IFN γ não alterou significativamente a produção de TNF, o Pam₃Cys apresentou maior capacidade de indução de TNF quando as células foram tratadas, simultaneamente, com IFN γ . Estes dados sugerem que o Pam₃Cys sinergiza com IFN γ para a indução de TNF.

Em seguida, utilizando os dois agonistas de TLR2 (LAMPf e Pam₃Cys) e o agonista de TLR4 (LPS), foi avaliada a produção de TNF nas hemoculturas humanas. A hemocultura foi escolhida por ser um modelo simples de ativação de leucócitos, sem necessidade de exaustivas purificações das células, o que facilita a avaliação da ativação das mesmas sem manipulações, as quais poderiam alterar o seu funcionamento. Nas hemoculturas, a concentração de 1 μ g/mL de LAMPf foi insuficiente para induzir a produção de TNF, havendo necessidade de aumentar a concentração 2,5 vezes para atingir indução significativa da produção de TNF. Para o nosso conhecimento, não há relatos publicados sobre a ativação de hemoculturas com lipoproteínas de micoplasma. Assim, mostramos pela primeira vez que, em baixas concentrações, as LAMPf não induzem significativa produção de TNF em hemoculturas humanas, mas que quantidades elevadas destas lipoproteínas são capazes de induzir a produção dessa citocina, ao se ligarem a leucócitos no sangue periférico. A presença de micoplasma em leucócitos circulantes tem sido descrita, mostrando que eles se disseminam via hematogênica (Waites et al. 1993), para atingir os locais onde se instalarão para causar doenças, como por exemplo, nos tratos respiratório e geniturinário, bem como nas articulações (Clyde 1993; Luttrell 1994). Nestes locais, os micoplasmas

são potencialmente pró-inflamatórios por meio da indução de TNF, IL-1 β e NO (Rawadi & Roman-Roman 1996), causando doenças inflamatórias crônicas (Luttrell 1994; García-Porrúa et al. 2005; Johnson et al. 2000). Pode ser especulado que, devido a necessidade de altas concentrações de LAMPf para ativar os leucócitos do sangue periférico a produzirem TNF, pequenas quantidades de micoplasmas transportados aderidos às membranas destas células sejam insuficientes para ativá-las, não havendo, portanto, indução de significantes alterações na produção de citocinas e/ou outros mediadores inflamatórios pelos micoplasmas no sangue. Sendo assim, a septicemia ou morte por choque séptico induzidos por micoplasmas raramente ocorre, e quando é descrita, os pacientes são imunodeficientes (Yechourun et al. 1992).

O Pam₃Cys (0,1 μ g/mL), induziu altos níveis de TNF nas hemoculturas humanas após 6 h de incubação, com queda dos níveis em 24 h, diferente do LPS, que induziu altos níveis de TNF mesmo com 24 h de cultura. Nossos resultados apontam que o período de 6 h de estimulação foi o pico da produção de TNF para os três agonistas de TLR utilizados. Ainda, após 24 h de incubação, quantidades significantes desta citocina foram detectadas apenas em culturas estimuladas com LPS. A indução de TNF em hemoculturas ativadas com agonistas purificados de TLR foi previamente demonstrada por Belge et al. (2002) e Ojeda et al. (2002), usando Pam₃Cys e LPS, respectivamente. A avaliação da produção de TNF nas hemoculturas humanas estimuladas por diferentes agonistas de TLR2 ou de TLR4 mostra que a indução via TLR4 é mais potente na indução de TNF (Farina et al. 2004), como foi aqui demonstrado.

A rápida produção de TNF tem sido demonstrada em diferentes modelos de ativação celular. Janský et al. (2003) mostraram que nas células mononucleares do sangue periférico, o LPS induziu um pico na produção de TNF dentro de 4 h, a qual permaneceu estável até 24 h. Farina et al. (2004) demonstraram a rápida indução de TNF por diferentes agonistas de TLR2 e de TLR4 (4h), por meio de citometria de fluxo, mostrando a expressão intracelular do TNF. A queda nos níveis do TNF, nos sobrenadantes das culturas, é explicada pela degradação desta citocina em cultura, bem como pela internalização da citocina após interação com seus receptores presentes nas membranas celulares (MacEwan 2002) e o seqüestro pelos TNFR solúveis (Bemelmans et al. 1996). A

manutenção dos níveis do TNF em cultura, portanto, depende de uma prolongada estimulação, que parece ser mais efetiva com o LPS. Apesar das LAMPf e Pam₃Cys serem agonistas de TLR2, a necessidade de uma maior concentração de LAMPf do que de Pam₃Cys para induzir TNF nas hemoculturas, pode ser explicada pelo fato de que as LAMPf constituem uma preparação de diversas lipoproteínas, e algumas delas poderiam acionar outros receptores, induzindo sinais inibitórios. Ou, alternativamente, diferentes LAMPf induziriam diferentes quantidades de TNF e no geral, a concentração ficaria baixa, como demonstrado por Kostyal et al. (1994). Estes autores detectaram frações das LAMPs que possuem diferenças na sua capacidade de induzir TNF em monócitos humanos, sendo a fração de 48 KDa, a fração que melhor induziu a produção desta citocina. Mühlradt et al. (1997) isolaram um lipopeptídeo, a partir do MDHM, com atividade estimuladora de macrófagos, e o denominaram de MALP-2 (*2-kDa macrophage-stimulatory activity*), sendo este lipopeptídeo ativo em concentrações tão baixas quanto 20 pg/mL. Assim, produtos purificados das LAMPf e, altamente ativadores, poderiam gerar níveis de TNF similares àqueles obtidos com o Pam₃Cys. Pode ainda ser especulado que, como as LAMPf utilizam TLR6 dimerizado com o TLR2, e o Pam₃Cys utiliza TLR2 dimerizado com TLR1, diferenças na sinalização poderiam ser geradas, indicando diferenças nas vias de sinalização de TLR2/TLR6 ou TLR2/TLR1, embora tenha sido demonstrado que o TLR2 é quem sinaliza nestes heterodímeros (Buwitt-Beckmann et al. 2006).

Os resultados do presente trabalho sugerem que a indução da produção de TNF nas hemoculturas humanas, via TLR2 é mais sensível à modulação pelo PAF do que a via do TLR4. Os dados mostram que o tratamento das hemoculturas com WEB2170 tende a aumentar a produção de TNF induzida pelo Pam₃Cys e pelas LAMPf, indicando que o PAF produzido no momento da ativação celular com esses PAMPs, pode diminuir a produção de TNF. No entanto, o pré-tratamento das hemoculturas com PAF provocou um aumento na produção de TNF induzida tanto pelo Pam₃Cys quanto pelas LAMPf. Os dados mostram que para aumentar a produção de TNF, o PAF deve ser usado 30 min a 3 h antes da ativação das células com o agonista triacilado Pam₃Cys, mas com as LAMPf, que possuem lipídios diacilados, o PAF pode ser adicionado independente do momento em que a célula será ativada com o agonista de TLR2. Estes resultados sugerem diferenças na sinalização via TLR2/TLR6 e

TLR2/TLR1. Os efeitos do PAF, como um sensibilizador de células para uma mais potente ativação celular frente a estímulos subseqüentes, são bem conhecidos (Megyeri et al. 1995, Liu et al., 1998; Arbabi et al. 1999; Brown et al, 2004; Cushieri et al. 2005).

Houve uma elevada variação na produção de TNF das diversas hemoculturas pré-tratadas com WEB2170 e ativadas com LPS. Embora nas hemoculturas de alguns doadores avaliados, o tratamento com WEB2170 tenha causado uma leve diminuição ou mesmo um aumento da produção do TNF, no geral, este tratamento não alterou significativamente a produção de TNF induzida pelo LPS. Estes resultados indicam o PAF produzido imediatamente após a ativação do TLR4, agindo em um tempo muito próximo quando esta via de sinalização é disparada, parece não contribuir significativamente para a indução de TNF. De acordo, a adição de PAF, simultaneamente com o LPS, também não alterou, significativamente, a produção do TNF. Os dados sugerem que o PAF endógeno não exerce uma ação modulatória significativa na produção de TNF induzida pela via de sinalização de TLR4. Estes resultados, contrastam com os dados da literatura, nos quais o uso de antagonistas de PAF reduziu a produção de TNF. Ogata et al. (2004), utilizando um modelo semelhante ao apresentado no presente trabalho, mostraram que o tratamento das hemoculturas humanas com um antagonista do PAFR diminui a produção do TNF induzida por LPS, indicando que o PAF é importante para a produção desta citocina induzida via TLR4. Uma possível explicação para os diferentes resultados encontrados poderia ser a classe do antagonista de PAF utilizado, já que diferenças estruturais destes compostos podem gerar diferentes resultados, uma vez que eles podem ser antagonistas neutros (nenhum efeito na ativação), agonistas parciais ou agonistas inversos dos PAFR. Os GPCR existem nas conformações inativa e ativa, em equilíbrio. Os ligantes dos GPCR que estabilizam a conformação inativa são conhecidos como agonistas inversos. Foi demonstrado que o WEB2086, que é estruturalmente similar ao WEB2170, da classe de tieno-triazoldiazepínicos (Casals-Stenzel et al. 1987; Heuer et al. 1990), é um agonista inverso do PAFR, diminuindo a geração basal de fosfatos de inositol (Dupré et al. 2003). No presente trabalho, foi utilizado o WEB2170, enquanto no estudo de Ogata et al (2004), o antagonista utilizado foi o TCV 309, que é um derivado de nicotinamida

com atividade antagonista do PAF mais potente do que o WEB2086. Pode ser especulado que diferenças no mecanismo de ação e na potência dos compostos antagonistas de PAF podem gerar resultados conflitantes da modulação da produção de TNF pelo PAF quando a via de indução é o TLR4.

Em modelos animais tem sido demonstrado que o uso de antagonistas de PAF reduz significativamente a produção de TNF induzida por LPS, tanto *in vivo* em camundongos, quanto em ensaios *in vitro*, usando macrófagos peritoneais murinos, eliciados com tioglicolato (Ogata et al.1993). Ruggiero et al. (1994), também observaram que a administração de antagonistas de PAF no modelo de choque induzido pelo LPS, reduziu significativamente os níveis de TNF no soro dos camundongos. Cushieri et al. (2002) mostraram que a ação do PAF para aumentar a resposta ao LPS pode ser dependente da aderência da célula. Desta forma, a ação do PAF seria efetiva em macrófagos residentes nos tecidos ou aderidos às placas de cultura, mas não em monócitos circulantes, como avaliado no presente trabalho. Diferente das nossas condições de cultura, que estavam sob agitação contínua durante os períodos de incubação, Ogata et al. (2004) mostraram uma inibição da produção de TNF pelo antagonista de PAF, o TCV-309, em hemoculturas humanas em placas de 24 poços, incubadas sob condições estáticas, o que pode ter permitido a aderência dos leucócitos.

Embora a importância do PAF na produção de TNF induzida pelo LPS esteja bem demonstrada nos estudos com animais, estudos clínicos com os antagonistas de PAF em pacientes com sepse bacteriana não mostram um papel protetor destes compostos, a despeito da diminuição da produção de TNF (Suputtamongkol et al. 2000; Vincent et al. 2000). Apesar disto, o uso do TCV 309, embora não diminua a letalidade do choque séptico, diminui a disfunção de órgãos e a morbidade, frequentemente associadas ao choque ou à síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS, *systemic inflammatory response syndrome*) (Poeze et al. 2000).

Nossos dados indicam que o PAF endógeno, produzido imediatamente após estimulação do TLR2, pode inibir a produção de TNF, enquanto o PAF atuando nas células antes da ativação com o agonista de TLR2 aumenta a produção do TNF. Estes efeitos foram muito variados em hemoculturas ativadas com o agonista de TLR4. As vias de sinalização transduzidas pelo PAFR podem regular negativamente as vias de ativação TLR quando acionadas

simultaneamente ou muito próximas. Uma regulação cruzada entre as vias de TLR e GPCR foi recentemente demonstrada por Loniewski et al. (2007). Estes autores mostraram que as vias de TLR2 e TLR4 diminuem a expressão de β arrestina-2, as de TLR2, TLR4 e TLR7 diminuem a expressão de quinases associadas aos GPCR (GRK5 e 6) e as dos TLR2, TLR3, TLR4 e TLR7 aumentam a expressão de GRK2. As β -arrestinas e GRKs regulam a dessensibilização dos GPCR, controlando suas repostas, assim, uma diminuição destas moléculas pode aumentar a sinalização via GPCR durante a resposta imune inata. O PAF produzido após a estimulação celular via TLR2 ou TLR4 age de maneira autócrina ou parácrina nas células, requerendo o recrutamento de β -arrestinas para sinalização e posterior internalização dos PAFR (McLaughlin et al 2006). Portanto, pode ser especulado que o recrutamento de β -arrestina pelo PAFR pode inibir a ativação da via TLR, uma vez que a β -arrestina associando-se ao TRAF-6 inibe a via TLR (Wang et al. 2006). Outra possibilidade é a fosforilação da Tollip pelos fosfatidil inositol trifosfato oriundo da atividade da enzima PI3K após ativação do PAFR, que inibe IRAK1 na via TLR (Li et al. 2004; Ko et al. 2005).

Por outro lado, a sensibilização prolongada das células com o PAF antes da ativação com os agonistas de TLR2 poderia aumentar a produção de TNF induzida pelos agonistas de TLR2 por pelo menos dois mecanismos: a ativação de vias bioquímicas relevantes para a via do TLR e a dessensibilização dos PAFR. Os efeitos do PAF para a pré-estimulação ou sensibilização celular não são ainda bem compreendidos, mesmo para o LPS, que tem sido bastante estudado (Bulger et al. 2002). Acredita-se que o efeito pré-estimulador do PAF seja dependente da aderência celular (Cuschieri et al. 2002). O PAFR é acoplado a proteína G e sua estimulação aumenta os níveis de cálcio intracelular e o metabolismo de inositol fosfato (Ishii et al. 2002). O aumento de cálcio induz a ativação de cinase II dependente de cálcio/calmodulina (CaMK II), importante para os efeitos de pré-estimulação das células pelo PAF, para aumentar as repostas ao LPS (Cuschieri et al. 2005). O efeito de pré-estimulação do PAF para a ativação pelo LPS é mediado pela fosforilação de MAPK, as ERK1/2 quinase e JNK quinase, aumento de atividade NFkB e AP-1, de maneira dependente da CaMK II (Cuschieri et al. 2005). Se estes efeitos são similarmente

mediados na via do TLR2 ainda merece investigação, no entanto. Os nossos dados sugerem que a ativação via PAFR para a sensibilização das células ao estímulo de agonistas de TLR2 pode ocorrer independente de aderência celular, pois os leucócitos produziram mais TNF em resposta à sensibilização com o PAF e ativação com agonistas de TLR2 em hemocultura, sob agitação. A outra hipótese para explicar porque os efeitos do PAF são mais eficazes na sensibilização celular prolongada em relação ao PAF próximo a ativação do TLR, seria o fato de que exposição prolongada ao PAF causar a dessensibilização dos receptores, por fosforilação, internalização e diminuição da expressão dos PAFR (Takano et al. 1994; Ishii et al. 1998; Chen et al. 2002; Dupré et al. 2003). Desta forma, quando o TLR for ativado e o PAF for produzido não haverá sinalização no PAFR neste momento, evitando a sinalização negativa do PAFR para a via TLR.

A modulação da expressão de TLR2 em granulócitos e monócitos em hemocultura ativada por LPS, após curtos períodos (uma a três horas) de incubação, tem sido descrita (Mirlashari & Lyberg 2003; Hadley et al. 2005). Uma possibilidade para explicar o aumento da produção do TNF pelos leucócitos, após pré-tratamento com PAF, no presente trabalho, poderia ser o aumento na expressão de TLR2. No entanto, não houve alteração significativa na expressão de TLR2 após tratamento com o PAF por três horas, indicando que o aumento na produção de TNF, induzido pelo pré-tratamento com PAF não foi mediado pelo aumento dos TLR2. Estes experimentos também foram realizados após duas horas de incubação das hemoculturas com o PAF, mostrando resultados similares (dados não mostrados). Assim, eventos de sinalização bioquímica induzida pelo PAF, como sugerido acima, atuando sinergicamente com o Pam₃Cys ou as LAMPf, devem ser responsáveis pelo aumento da produção do TNF.

Como os efeitos de agonistas de TLR purificados podem ser diferentes dos efeitos causados pelas bactérias inteiras durante as infecções, devido ao acionamento de diferentes receptores pelos diferentes PAMPs presentes nas bactérias, nós decidimos avaliar também o efeito modulatório do PAF na produção do TNF induzido por bactérias Gram negativa ou Gram positiva. As concentrações de TNF presentes nas hemoculturas ativadas com *E. coli* foram significativamente mais elevadas do que aquelas das hemoculturas ativadas com *S. aureus*. Estes dados estavam de acordo com os resultados obtidos com os PAMPs destas bactérias, o LPS de *E. coli* e o lipopeptídeo Pam₃Cys,

representando lipoproteína de bactéria Gram positiva. Similares resultados foram obtidos com diferentes cepas de *E. coli* ou *S. aureus* por Ogata et al. (2004).

Quando as hemoculturas foram tratadas com WEB2170 e estimuladas com *S. aureus*, foi observada uma redução significativa dos níveis de TNF em um aparente contraste aos efeitos do WEB2170 quando as hemoculturas foram estimuladas com o PAMP Pam₃Cys. Estas diferenças podem ser explicadas pela presença de vários PAMPs constituintes do *S. aureus* que acionam diferentes receptores de reconhecimento de PAMPs, gerando resultados diferentes daqueles dos agonistas purificados de TLR2. Além disto, Lemjabbar & Basbaum_ (2005) mostraram que o LTA de *S. aureus* pode agir como um agonista de PAFR, assim o bloqueio desses receptores com o WEB2170 poderia reduzir a capacidade indutora de TNF de *S. aureus*, independente de sua indução de PAF.

No presente trabalho, não foi observada alteração significativa na produção de TNF em hemoculturas tratadas com o WEB2170 e estimuladas com *E. coli*, de acordo com os resultados obtidos com o LPS. Embora, possa ser observado que o efeito do WEB2170 na produção de TNF em hemoculturas cultivadas com *E. coli* foi mais homogêneo do que nas culturas ativadas com LPS. Ogata et al. (2004) demonstraram que o tratamento de hemoculturas com antagonista de PAF, reduz significativamente a produção de TNF induzida pelo LPS, pelas toxinas de bactérias Gram-positivas e pela estimulação com bactérias inteiras *E. coli* ou *S. aureus*. Estes autores utilizaram cepas diferentes das bactérias e elas estavam vivas, assim, possivelmente produtos secretados pelas bactérias podem ter também influenciado os resultados. Para um estudo com PAMP das paredes das bactérias, estas devem estar mortas, impedindo que toxinas secretadas interfiram nos resultados. O *S. aureus* produz superantígeno, as enterotoxinas, que ativam simultaneamente linfócitos e monócitos do sangue periférico, de maneira independente de TLR, causando o choque tóxico (Thomas et al. 2007). Portanto, nós usamos bactérias mortas, para garantir que somente o efeito dos PAMPs presentes nas paredes bacterianas estivesse presente.

O pré-tratamento com o PAF, em nenhuma das concentrações analisadas, alterou significativamente a produção de TNF nas hemoculturas estimuladas com *S.aureus* ou *E.coli*, no presente estudo. Embora aqui possa ser observado que houve uma grande variabilidade nas respostas. As variações das respostas individuais de cada hemocultura foram grandes, tanto na produção de TNF em

resposta aos agonistas de TLR, quanto nas respostas aos tratamentos com antagonista de PAF ou PAF. Tendo em vista que os PAFR existem em estado inativo e ativo, como outros GPCR, sendo ativados por pequenas quantidades de PAF, que sua via de sinalização é finamente regulada por mecanismos de dessensibilização e que o momento da sinalização do PAF em relação à via de sinalização TLR é fundamental para a modulação desta última via pelo PAF, tal variação pode ser esperada. Outros fatores que podem causar variação nas respostas são a heterogeneidade das populações celulares existentes na hemocultura, o estado de ativação inicial destas células e os níveis de PAF-AH induzidos pelos agonistas, os quais controlam as concentrações de PAF no plasma.

Os resultados do presente trabalho demonstram que a ativação da hemocultura é um método sensível para determinar a produção de TNF em resposta a agonistas de TLR e para avaliar a modulação de sua produção pelo PAF, servindo de triagem para estudos com células isoladas. Além de permitir a avaliação das respostas dos leucócitos aos agonistas de TLR, a ativação de uma hemocultura pode simular uma situação de sepse ou SIRS. Este método também permite a fácil avaliação da expressão dos TLR simultaneamente em PMN e monócitos. Nessas hemoculturas duas fontes principais de TNF α poderiam ser os neutrófilos e os monócitos. No entanto, Xing & Remick (2005) demonstraram que os neutrófilos produzem substâncias antiinflamatórias quando acionados no sangue periférico, tais como o receptor solúvel para o TNF e o antagonista do receptor da IL-1. Os monócitos, portanto, devem ser a principal fonte de TNF nas hemoculturas. Belge et al. (2002) avaliaram a produção de TNF em hemoculturas estimuladas com Pam₃Cys e demonstraram que no sangue há uma população de monócitos caracterizada pelo fenótipo CD14⁺CD16⁺DR⁺⁺, que representa 10% da população de monócitos e é a responsável pela maior produção de TNF induzida pelo Pam₃Cys. Nós não avaliamos as subpopulações de monócitos do sangue responsáveis pela produção de TNF, portanto, nossos dados refletem a resposta da população total de leucócitos presentes no sangue.

Os efeitos do PAF na inflamação localizada ou sistêmica têm sido profundamente estudados, no entanto, o papel do PAF na resposta imune inata às infecções é pouco conhecido. Como o PAF por si só não ativa completamente

as células para a produção de citocinas ou quimiocinas, mas é capaz de potencializar a ação das células para a produção destas e de moléculas microbidas, como as espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, o PAF pode funcionar como uma molécula de alarme para a imunidade inata, sinalizando a presença de patógenos e sensibilizando as células para responderem mais eficazmente aos estímulos microbianos subsequentes. Trabalhos recentes vêm demonstrando a importância do PAF ou do PAFR nas infecções por bactérias Gram positivas (Rijneveld et al. 2004; Zhang et al. 2005; Han et al. 2006; Fillon et al. 2006). Entre estes, apenas o trabalho de Han et al. (2006) apresenta um estudo sobre o envolvimento do PAF na produção de NO e TNF em macrófagos ativados por agonista de TLR2. Os resultados obtidos no presente trabalho mostram que o PAF pode ser um importante mediador na resposta imune inata contra bactérias Gram positivas.

6. CONCLUSÕES

6.1 Conclusão geral:

Os resultados deste estudo mostram que, em hemoculturas humanas estimuladas com agonistas de TLR2 (Pam₃Cys ou LAMPf), o pré-tratamento com o PAF aumenta a produção de TNF pelos leucócitos e este aumento não é via modulação da expressão do TLR2.

6.2. Conclusões específicas:

- As LAMPf induzem TNF e NO em culturas de macrófagos murinos RAW 264.7, sendo a produção de NO significativamente aumentada pelo tratamento com IFN γ .
- Os agonistas de TLR2 (Pam₃Cys e LAMPf) e TLR4 (LPS) induzem TNF em hemoculturas humanas, sendo que o PAF endógeno, produzido após a sinalização via TLR2 (Pam₃Cys) pode inibir a produção do TNF; os efeitos do PAF são dependentes do momento em que o PAF age nas células.
- A pré-estimulação (por 3h ou 30 minutos) dos leucócitos do sangue periférico com PAF aumenta significativamente a produção de TNF induzida por agonistas de TLR2 (Pam₃Cys e LAMPf).
- A pré-estimulação dos leucócitos (3 h) com PAF não altera significativamente a expressão de TLR2, seja em neutrófilos ou em monócitos (CD14⁺).
- *S. aureus* induz TNF nas hemoculturas humanas, o qual é positivamente modulado pelo PAF endógeno, porém, o PAF exógeno não altera significativamente a produção de TNF.
- Há uma grande variabilidade individual da produção de TNF por hemoculturas humanas em resposta aos agonistas de TLR e ao PAF endógeno ou exógeno, o que pode explicar a dificuldade do sucesso terapêutico com antagonistas do PAF na sepse ou SIRS, como tem sido descrito em vários ensaios clínicos.

7. REFERÊNCIAS*

Aggarwal B B 2003. Signalling pathways of the TNF superfamily a double-edged sword. *Nat Rev.* 3: 745-755.

Akira S 2000. Cutting Edge: Preferentially the R-Stereoisomer of Mycoplasmal lipopeptide macrophage-activating lipopeptide-2 activates immune cells through a toll-like receptor-2 and MyD88-dependent signaling pathway. *J Immunol* 164: 557-557.

Akira S 2003. Toll-like receptor signaling. *J Biol Chem* 278: 38105-38108.

Albiger B, Dahlberg S, Henriques-Normark B, Normark S 2007. Role of the innate immune system in host defence against bacterial infections: focus on the Toll-like receptor. *J Intern Med* 261(6):511-528

Arbabi S, Rosengart M R, Garcia I, Jelacic S, Maier R V 1999. Priming interleukin 8 production: role of platelet-activation factor and p38. *Arch Surg* 134: 1348-1353.

Belge K U, Dayyani F, Horelt A, Siedlar M, Frankenberger M, Frankenberger B, Espevik T, Ziegler-Heitbrock L 2002. The proinflammatory CD14⁺ CD16⁺ DR⁺⁺ monocytes are a major source of TNF. *J Immunol.* 168 (7): 3536-3542.

Beutler B, Cerami A 1989. The biology of cachectin/TNF- α primary mediator of the host response. *Annu Rev Immunol* 7: 625-655.

Bemelmans M H, Greve J W, Gouma D J, Buurman W A 1996. Increased concentrations of tumour necrosis factor (TNF) and soluble TNF receptors in biliary obstruction in mice; soluble TNF receptors as prognostic factors for mortality. *Gut* 38(3):447-453.

Benveniste J, Henson P M, Cochrane C G 1972. Leukocyte-dependent histamine release from rabbit platelets: the role of IgE, basophils and platelet activating factor. *J Exp Med.* 136: 1356-1377.

Bradley J. 2008. TNF-mediated inflammatory disease. *J Pathol* 214(2):149-160.

Brint E K, Xu D, Liu H, Dunne A, McKenzie A N, O'Neill L A, Liew F Y 2004. ST2 is an inhibitor of interleukin 1 receptor and Toll-like receptor 4 signaling and maintains endotoxin tolerance. *Nat Immunol* 5(4): 373-379.

* Referências de acordo com as normas da Revista Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.

Brown G E, Stewart M Q, Bissonnette S A, Elia A E, Wilker E, Yaffe M B 2004. Distinct ligand-dependent roles for p38 MAPK in priming and activation of the neutrophil NADPH oxidase. *J Biol Chem* 279(26): 27059-27068.

Brown S L, Jala V R, Raghuwanshi S K, Nasser M W, Haribabu B, Richardson R M 2006. Activation and regulation of platelet-activation factor receptor: role of G_i and G_q in receptor-mediated chemotactic, and cross-regulatory signals. *J Immunol* 177: 3242-3249.

Bulger E M, Arbabi S, Garcia I, Maier R V 2002. The macrophage response to endotoxin requires platelet activating factor. *Shock*. 17: 173-179.

Buwitt-Beckmann U, Heine H, Wiesmüller K-H, Jung G, Brock R, Akira S, Ulmer A J 2006. TLR1-and TLR6-independent recognition of bacterial lipopeptides. *J Biol Chem* 281 (14): 9049-9057.

Camussi G, Bussolino F, Salivido G, Baglione C 1987. tumor necrosis factor/cachectin stimulates peritoneal macrophages, polymorphonuclear neutrophils and vascular endothelial cells to synthesize and release platelet-activating factor. *J Exp Med* 166: 1390-1404.

Carswell E A, Old I J, Kassel R L, Green S, Fiore N, Williamson B 1975. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci* 72: 3366-3370.

Casals-Stenzel J, Muacevic G, Weber K 1987. Pharmacological actions of WEB 2086, a new specific antagonist of platelet activation factor. *J Pharmacol Exp Ther* 241(3): 974-981.

Chambaud I, Wroblewski H, Blanchard A 1999. Interactions between mycoplasma lipoproteins and the host immune system. *Trends Immunol* 7: 493-499.

Chang S W, Feddersen C O, Henson P M, Voelkel N F 1987. Platelet-activating factor mediates hemodynamic changes and lung injury in endotoxin-treated rats. *J Clin Invest* 79(5): 1498-509.

Chao W, Olson M S 1993. Platelet-activating factor: receptors and signal transduction. *Biochem. J.* 292: 617-629.

Chen Z, Dupré D J, Gouill C L, Rola-Pleszczynski M, Staňková J 2002. Agonist-induced internalization of platelet-activation factor receptor is dependent on arrestins but independent of G-protein activation. *J Biol Chem.* 277(9): 7356-7362.

Chen L Y, Zuraw B L, Zhao M, Liu F T, Huang S, and Pan Z K 2003. Involvement of protein tyrosine kinase in Toll-like receptor 4-mediated NF-

kappa B activation in human peripheral blood monocytes. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 284: 607-613.

Chen J, Yang L, Foulks J M, Weyrich A S, Zimmerman G A, Marathe G K, McIntyre T M 2007. Intracellular PAF catabolism by acetylhydrolase counteracts continual PAF synthesis. *J Lipid Res*. No prelo.

Curschieri J, Bulger E, Garcia I, Jeletic S, Maier R V 2005. Calcim/Calmodulin-dependent kinase II is required for platelet-activating factor priming. *Shock*. 23(2): 99-106

Clyde Jr. W A 1983. Clinical overview of typical *Mycoplasma pneumoniae* infections. *Clin Infect Dis* 17 (Suppl 1): S32 –36.

Cuschieri J, Gourlay D, Bulger E, Garcia I, Jelacic S, Maier R V 2002. Platelet-activating factor priming of inflammatory cell activity requires cellular adherence. *Surgery* 132: 157-166

Curschieri J, Bulger E, Garcia I, Jeletic S, Maier R V 2005. Calcim/Calmodulin-dependent kinase II is required for platelet-activating factor priming. *Shock* 23(2): 99-106

Dagenais P, Thivierge M, Parent J L, Stankova J, Rola-Pleszczynski M 1997. Augmented expression of platelet-activating factor receptor gene by TNF-alpha through transcriptional activation in human monocytes. *J Leukoc Biol* 61(1): 106-112.

Dubois C, Bissonnette E, Rola-Pleszczynski M 1989. Platelet-activating factor (PAF) enhances tumor necrosis factor production by alveolar macrophages. *J Immunol* 143 (3): 964-970.

Dupré D J, Chen Z, Le Guill C, Thériault C, Parent J L, Rola-Pleszczynski M, Stankova J 2003. Trafficking, ubiquitination, and down-regulation of the human platelet-activating factor receptor. *J Biol Chem* 278(48): 48228-4835.

Echchannaoui H, Frei K, Schnell C, Leib S L, Zimmerli W, Landmann R 2002. Toll-like receptor 2-deficient mice are highly susceptible to *Streptococcus pneumoniae* meningitis because of reduced bacterial clearing and enhanced inflammation. *J Infect Dis* 186: 798-806.

Elson G, Dunn-Siergrist I, Daubeuf B, Pugin J 2007. Contribution of Toll-like receptors to the innate immune response to Gram-negative and Gram-positive bacteria. *Blood* 109: 1574-1583

Elstad M R, Prestcott S M, McIntyre T M, Zimmerman G A 1989. Synthesis and release of platelet-activating factor by stimulated human mononuclear phagocytes. *J Immunol* 140 (5): 1618-1624.

Faria Neto H C C, Stafforini D M, Prescott S M, Zimmerman G A 2005. Regulatory inflammation through the anti-inflammatory enzyme platelet-activating factor- acetylhydrolase. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1(100): 83-91.

Farina C, Theil D, Semlinger B, Hohlfeld R 2004. Distinct responses of monocytes to toll-like receptor ligands and inflammatory cytokines. *Int Immunol* 16(6): 799-809.

Fillon S, Soulis K, Rajasekaran S, Benedict-Hamilton H, Radin J N, Orihuela C J, E I Kasmi K C, Murti G, Kaushal D, Gaber M W, Weber J R, Murray P J, Tuomanen E I 2006. Platelet-activating factor receptor and innate immunity: uptake of gram-positive bacterial cell wall into host cells and cell-specific pathophysiology. *J Immunol* 177(9): 6182-6191.

Fitzgerald K A, Palsson-McDermott E M, Bowie A G, Jefferies C A, Mansell A S, Brady G, Brint E, Dunne A, Gray P, Harte M T, McMurray D, Smith D E, Sims J E, Bird T A, O'Neill L A 2001. Mal (MyD88-adaptor-like) is required for Toll-like receptor-4 signal transduction. *Nature* 413:78-83.

Fletcher J R, DiSimone A G, Earnest M A 1990. Platelet-activating factor receptor antagonist improves survival and attenuates eicosanoid release in severe endotoxemia. *Ann Surg* 211(3): 312-316.

Flo T H, Halaas O, Torp S, Ryan L, Lien E, Dybdahi B, Sundan A, Espevik T 2001. Differential expression of toll-like receptor 2 in human cells. *J Leukoc Biol* 69: 474-480.

Franklin R A, Tordai A, Mazer B, Terada N, Lucas J, Gelfand E W 1995. Platelet activating factor activates MAPK and increases in intracellular calcium via independent pathways in B lymphocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 209(3): 1111-1118.

Fukao T, Koyasu S 2003. PI3K and negative regulation of TLR signaling. *Trends Immunol.* 24(7): 358-363.

García-Porrúa C, Blanco F J, Hernández A, Atanes A, Galdo F, Moure R, Alonso A 1997. Septic arthritis by *Mycoplasma hominis*: a case report and review of the medical literature. *Ann Rheum Dis* 56: 699-700.

Gomes R N, Bozza F A, Amâncio R T, Japiassú A M, Vianna R C S, Larangeira A P, Gouvêa J M, Bastos M S, Zimmerman G A, Stafforini D M, Prescott S M, Bozza P T, Castro-Faria-Neto H C 2006 Exogenous platelet-activating factor acetylhydrolase reduces mortality in mice with systemic inflammatory response syndrome and sepsis. *Shock* 26 (1): 41-49.

Guha M, Mackman N 2002. The phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway limits lipopolysaccharide activation of signaling pathways and expression of inflammatory mediators in human monocytic cells. *J Biol Chem.* 277(35): 32124-3232

Gupta S 2002. A decision between life and death during TNF α -induced signaling. *J Clin Immunol* 22(4): 185-194.

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

Hadley J S, Wang J E, Foster S J, Thiernemann C, Hinds C J 2005. Peptidoglycan of *Staphylococcus aureus* upregulates monocyte expression of CD14, Toll-like receptor 2 (TLR2), and TLR4 in human blood: Possible implications of priming of lipopolysaccharide signaling. *Infect Immun* 73(11): 7613-7619.

Han S J, Choi J H, Ko H M, Yang H W, Choi I W, Lee H K, Lee O H, Im S Y 1999. Glucocorticoids prevent NF κ B activation by inhibiting the early release of platelet-activating factor in response to lipopolysaccharide. *Eur J Immunol* 29: 1334-1341.

Han S H, Kim J H, Seo H S, Martin M H, Chung G H, Michalek S M, Nahm M H 2006. Lipoteichoic acid-induced nitric oxide production depends on the activation of platelet-activating factor receptor and Jak2. *J Immunol* 176(1): 573-579.

Hattermann K, Picard S, Borgeat M, Leclerc P, Pouliot M, Borgeat P 2007. The Toll-like receptor 7/8-ligand resiquimod (R-848) primes human neutrophils for leukotriene B₄, prostaglandin E₂ and platelet-activating factor biosynthesis. *FASEB J.* 21(7):1575-7585.

Hauschildt S, Hoffmann P, Beuscher H U, Dufhues G, Heinrich P, Wlesmuller K H, Jung G, Bessler W G. 1990. Activation of bone marrow-derived mouse macrophages by bacterial lipopeptide: cytokine production, phagocytosis and Ia expression. *Eur J Immunol* 20(1): 63-68.

Hessle C, Andersson B, Wold A E 2000. Gram-positive bacteria are potent inducers of monocytic interleukin-12 (IL-12) while Gram-negative bacteria preferentially stimulate IL-10 production. *Infect Immun* 68(6): 3581-3586.

Hessle C, Andersson B, Wold A E 2005. Gram-positive and Gram-negative bacteria elicit different patterns of pro-inflammatory cytokines in human monocytes. *Cytokine* 30: 311-318

Heuer H O, Casals-Stenzel J, Muacevic G, Weber K H 1990. Pharmacologic activity of beprafant (WEB 2170), a new and selective tetraazepinoic antagonist of platelet activating factor. *J Pharmacol Exp Ther.* 255(3): 962-968.

Honda Z, Nakamura M, Miki I, Minami M, Watanabe T, Seyanma Y, Okado H, Tho H, Ito K, Miyamoto T, Shimizu T 1991. Cloning by functional expression of

platelet-activating factor receptor from guinea-pig lung. *Nature* 349(6307): 342-346.

Honda Z, Takano T, Gotoh Y, Nishida E, Ito K, Shimizu T 1994. Transfected platelet-activating factor receptor activates mitogen-activated protein (MAP) kinase and MAP kinase kinase in Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem* 269(3): 2307-2315.

Hume D A, Underhill D M, Sweet M J, Ozinsky A O, Liew F Y, Aderem A 2001. Macrophages exposed continuously to lipopolysaccharide and other agonists that act via toll-like receptors exhibit a sustained and additive activation state. *BMC Immunol* 2: 2172-2183.

Ishii S, Nagase T, Shimizu T 2002. Platelet-activating factor receptor. *Prostaglandins Lipid Med* 68: 599-609.

Jacobs M, Togbe D, Cecile F, Samarina A, Allie N, Botha T, Carlos D, Parida S K, Grivennikov S, Nedospasov D, Monteiro A, Bert M L, Quesniaux V, Ryffel B 2007. Tumor necrosis factor is critical to control tuberculosis infection. *Microbes Infect* 9: 623-628

Janský L, Reymanová P, Kopecký J 2003. Dynamics of cytokine production in human peripheral blood mononuclear cells stimulated by LPS or Infected by *Borrelia*. *Physiol Res* 52: 593-598.

Jean-Baptiste E 2007. Cellular Mechanisms in Sepsis. *J Intens Care Med* 22: 63-71.

Johnson S, Sidebottom D, Bruckner F, Collins D 2000. Identification of *Mycoplasma fermentans* in synovial fluid samples from arthritis patients with inflammatory disease. *J Clin Microbiol* 38 (1): 90-93.

Jones B W, Means T K, Heldwein K A, Keen M A, Hill P J, Belisle J T, Fenton M J. 2001. Different Toll-like receptor agonists induce distinct macrophage responses. *J Leukoc Biol* 69:1036-1044.

Kawai T, Akira S 2007. TLR signaling. *Semin Immunol* 19(1):24-32.

Kelly N M, Young L, Cross A S 1991. Differential induction of tumor necrosis factor by bacteria expressing rough and smooth lipopolysaccharide phenotypes. *Infect Immun* 59(12): 4491-4496.

Khan M A, Kang J, Steiner T S 2004. Enterohaggative *Escherichia coli* flagellin-induced interleukin-8 secretion requires Toll-like receptor 5-dependent p38 MAP kinase activation. *Immunology* 112: 651-660.

Ko M, Kang J, Park S J, Bai S, Im S 2005. Platelet-activation factor induces matrix metalloproteinase-9 expression through Ca^{2+} - or PI3K - dependent

signaling pathway in a human vascular endothelial cell line. *FEBS Letters*. 579: 6451-6458.

Kollias G, Kontoyiannis D 2002. Role of TNF/TNFR in autoimmunity: specific TNF receptor blockade may be advantageous to anti-TNF treatments. *Cytokine Growth Factor Rev* 13(4): 315-321.

Kostial D A, Bulter G H, Beezhold D H 1994. A 48-Kilodalton *Mycoplasma fermentans* membrane protein induces cytokines secretion by human monocytes. *Infect Immun* 62(9): 3793-3800.

Kurt-Jones E A, Mandell L, Whitney C, Padgett A, Gosselin K, Newburger P E, Finberg R 2002. Role of Toll-like receptor 2 (TLR2) in neutrophil activation: GM-CSF enhances TLR2 expression and TLR2-mediated interleukin 8 responses in neutrophil. *Blood*. 100: 1860-1868.

Lemjabbar H, Basbaum C. 2002. Platelet-activating factor receptor and ADAM10 mediate responses to *Staphylococcus aureus* in epithelial cells. *Nat. Med.* 8: 41-46.

Li T, Hu J, Li L 2004. Characterization of tollip protein upon lipopolysaccharide challenge. *Mol Immunol* 44: 85-92.

Lien E, Sellati T J, Yoshimura A, Flo T H, Raehadi G, Finberg R W, Carrol J D, Espevik T, Ingalls R R, Radolf J D, Golenbock D T 1999. Toll-like receptor 2 functions as a pattern recognition receptor for diverse bacterial products. *J Biol Chem* 274(47): 33419-33425.

Liew F Y, Xu D, Brint E K, O'Neill L A 2005. Negative regulation of toll-like receptor-mediated immune responses. *Nat Rev Immunol* 5(6): 446-458.

Liew F Y, Li Y, Millott S 1990. Tumor necrosis factor α synergizes with INF- γ in mediating killing of *Leishmania major* through the induction of nitric oxide. *J Immunol* 145(12): 4306-4310.

Liu L, Zurbier A E, Mul F P, Verhoeven A J, Lutter R, Knol E F, Roos D 1998. Triple role of platelet-activating factor in eosinophil migration across monolayers of lung epithelial cells: eosinophil chemoattractant and priming agent and epithelial cell activator. *J Immunol* 161(6): 3064-3070.

Lonardoni M V C, Russo M, Jancar S 2000. Essential role of platelet-activating factor in control of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infection. *Infect Immun* 68(11): 6355-6361.

Loniewski K, Shi Y, Pestka J, Paremawaran N. 2008. Toll-like receptors differentially regulate GPCR kinases and arrestins in primary macrophages. *Molecular Immunology*. No prelo.

Lukashova V, Asselin C, Krolewski J J, Rola-Pleszczynski M, Stanková J. 2001. G-protein-independent activation of Tyk2 by the platelet-activating factor receptor. *J Biol Chem.* 276(26): 24113-24121.

Luttrell L M, Kanj S S, Corey R, Lins R E, Spinner R J, Mallon W J, Sexton D J 1994. *Mycoplasma hominis* septic arthritis: two case reports and review. *Clin Infect Dis* 19: 1067-1070.

MacEwan D J 2002. TNF receptor subtype signalling: differences and cellular consequences. *Cell Signal* 14(6): 477-492.

MacLaughlin N J D, Banerjee A, Kelher M R, Gamboni-Robertson F, Hamiel C, Sheppard F R, Moore E E, Silliman C C 2006. Platelet-activating factor induced clatrin-mediated endocytosis requires B-arrestins-1 recruitment and activation of p38 MAPK signalosome at the plasma membrane for actin bundle formation. *J Immunol* 176: 7039-7050.

Mansell A E, Brint J A, O'Neill L A, Hertzog P J 2004. Mal interacts with tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF)-6 to mediate NF-kappaB activation by toll-like receptor (TLR)-2 and TLR4. *J Biol Chem* 279: 37227-37230.

Mansell A, Smith R, Doyle S L, Gray P, Fenner J E, Crack P J, Nicholson S E, Hilton D J, O'Neill L A, Hertzog P J 2006. Suppressor of cytokine signaling 1 negatively regulates Toll-like receptor signaling by mediating Mal degradation. *Nat Immunol* 7(2): 148-155.

Means T K, Wang S, Lien E, Yoshimura A, Golenbock D T 1999, Fenton M J. Human toll-like receptors mediate cellular activation by *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol* 168: 3920-3927.

Medzhitov R, Janeway Jr Ca 1997. Innate immunity: the virtues of a monoclonal system of recognition. *Cell* 91: 295-298.

Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway C A Jr 1997. A homologue of *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 388: 394-397.

Megyeri P, Pabst K M, Pabst M J 1995. Serine protease inhibitors block priming of monocytes for enhanced release of superoxide. *Immunology* 86(4): 629-35.

Mirlashari MR, Lyberg T 2003. Expression and involvement of toll-like receptors (TLR)2, TLR4, and CD14 in monocyte TNF α production induced by lipopolysaccharides from *Neisseria meningitidis*. *Med Sci Monit* 9 (8): 316-324.

Mita Y, Dobashi K, Shimizu Y, Nakazawa T, Mori M 2001. Toll-like receptor 2 and 4 surface expressions on human monocytes are modulated by interferon-gamma and macrophage colony-stimulating factor. *Immunol Lett.* 78(2): 97-101.

Moreno S E, Alves-Filho J C, Rios-Santos F, Silva J S, Ferreira S H, Cunha F Q, Teixeira M M 2006. Signaling via platelet-activating factor receptors accounts for the impairment of neutrophil migration in polymicrobial sepsis. *J Immunol* 177(2): 1264-1271.

Morrison D C, Jacobs D M 1976. Binding of polymyxin B to the lipid A portion of bacterial lipopolysaccharides. *Immunochem* 13: 813-818.

Mühlradt P F, Frisch M 1994. Purification and partial biochemical characterization of a *Mycoplasma fermentans*-derived substance that activates macrophages to release nitric oxide, tumor necrosis factor, and interleukin-6. *Infect Immun* 62: 3801-3807.

Mühlradt P F, Kieb M, Meyer H, Sübmuth R, Jung G 1997. Isolation, structure elucidation, and synthesis of a macrophage stimulatory lipopeptide from *Mycoplasma fermentans* acting at picomolar concentration. *J Exp Med* 185(11): 1951-1958.

Müller E, Dagenais P, Alami N, Rola-Pleszczynski M 1993. Identification and functional characterization of platelet-activating factor receptors in human leukocyte populations using polyclonal anti-peptide antibody. *Proc Natl Acad Sci* 90: 5818-5822.

Nishiguchi M, Matsumoto M, Takao T, Hoshino M, Shimonishi Y, Tsuji S, Begum NA, Takeuchi O, Akira S, Toyoshima K, Seya T 2001. *Mycoplasma fermentans* lipoprotein M161Ag-induced cell activation is mediated by toll-like receptor 2: role of N-terminal hydrophobic portion in its multiple functions. *J Immunol* 166:2610-2616.

Ojeda M O, Silva C V, Rosáinz M J A, Fernández-Ortega C 2002. TNF α production in whole blood cultures from healthy individuals. *Biochem Biophys Res Commun* 292: 538-541.

Ogata M, Matsumoto T, Koga K, Takenaka I, Kamochi M, Sata T, Yoshida S-I, Shigematsu A 1993. An antagonist of platelet-activating factor suppresses endotoxin-induced tumor necrosis factor and mortality in mice pretreated with carrageenan. *Infect Immun* 61(2): 699-704

Ogata M, Nandate K, Kawasaki T, Kawasaki C, Ozaky M, Shigematsu A 2004. A platelet-activating factor receptor antagonist inhibits cytokine production in human whole blood by bacterial toxins and live bacteria. *Anesth Analg* 98: 1767-1772.

O'Flaherty J T O, Redman J F, Jacobson D P, Rossi A G 1990. Stimulation and priming of protein kinase C translocation by a Ca²⁺ transient-independent mechanism. *J Biol Chem* 265 (35): 21619-21623.

O'Mahony D S, Pham U, Iyer, Hawn R T, Liles W C 2008. Differential constitutive and cytokine-modulated expression of human toll-like receptors in primary neutrophils, monocytes and macrophages. *Int J Med Sciences* 5: 1-8.

Opal S, Laterre PF, Abraham E, Francois B, Wittebole X, Lowry S, Dhainaut JF, Warren B, Dugernier T, Lopez A, Sanchez M, Demeyer I, Jauregui L, Lorente JA, McGee W, Reinhart K, Kljucar S, Souza S, Pribble J 2004; Controlled Mortality Trial of Platelet-Activating Factor Acetylhydrolase in Severe Sepsis Investigators. Recombinant human platelet-activating factor acetylhydrolase for treatment of severe sepsis: results of a phase III, multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled, clinical trial. *Crit Care Med.* 32(2):585-588.

Pfeffer K, Matsuyama T, Künding T M, Wakeham A, Kishihara K, Shahinian A, Wiegmann K, Ohashi P S, Krönke M, Mak T W 1993. Mice deficient for the 55 kd tumor necrosis factor receptor are resistant to endotoxic shock, yet succumb to *L. monocytogenes* infection. *Cell* 73: 457-467.

Plaen I G, Tan X D, Chang H, Wang Liya, Remick D G, Hsueh W 2000. Lipopolysaccharide activates nuclear factor κ B rat intestine: role of endogenous platelet-activating factor and tumor necrosis. *Brit J Pharmacol* 129: 307-314.

Poeze M, Froom A H, Ramsay G, Buurman W A, Greve J W 2000. Decreased organ failure in patients with severe SIRS and septic shock treated with the platelet-activating factor antagonist TCV-309: a prospective, multicenter, double-blind, randomized phase II trial. TCV-309 Septic Shock Study Group. *Shock* 14(4): 421-428.

Prescott S M, Zimmerman G A, Stafforini D M, McIntyre T M 2000. *Annu Rev Biochem* 69: 419-445.

Qi H Y, Shelhamer J H 2005. Toll-like receptor 4 signaling regulates cytosolic phospholipase A2 activation and lipid generation in lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *J Biol Chem* 280(47): 38969-38975.

Rabehi L, Irinopoulou T, Cholley B, Haeffner-Cavaillon N, Carreno M-P 2001. Gram-positive and Gram-negative bacteria do not trigger monocytic cytokine production through similar intracellular pathways. *Infect Immun.* 69 (7): 4590-4599.

Rawadi G, Roman-Roman S 1996. Mycoplasma membrane lipoproteins induce proinflammatory cytokines by a mechanism distinct from that of lipopolysaccharide. *Infect Immun* 64: 637-643.

Rawadi G, Ramez V, Lemercier B, Roman-Roman S 1998. Activation of mitogen-activated protein kinase pathways by Mycoplasma fermentans membrane lipoproteins in murine macrophages: involvement in cytokine synthesis. *J Immunol* 160(3): 1330-1339.

Re F, Strominger J L 2001. Toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 differentially activate human dendritic cells. *J Biol Chem.* 276(40): 37692-37699.

Ribeiro-Dias F, Russo M, Barbuto J A M, Nascimento F R F, Timenetsky J, Jancar S 1999. Mycoplasma arginini enhances cytotoxicity of thioglycollate-elicited murine macrophages toward YAC-1 tumor cells through production of NO. *J Leukoc Biol* 65: 808-814.

Rijneveld A W, Weijer S, Florquin S, Speelman P, Shimizu T, Ishii S, van der Poll T. Improved host defense against pneumococcal pneumonia in platelet-activating factor receptor-deficient mice. *J Infect Dis.* 189(4): 711-716.

Rosa M S S, Vieira R B, Pereira A P, Dutra P M L, Lopes A H C S 2001. Platelet-activating factor (PAF) modulates peritoneal mouse macrophage infection by *Leishmania amazonensis*. *Curr Microbiol* 43: 33-37.

Roubin R, Mencia-Huerta J M, Landes A, Benveniste J 1982. Biosynthesis of platelet-activating factor (PAF-ACETHER) Impairment of Acetyl-transferase activity in thioglycollate-elicited mouse macrophages. *J Immunol* 129 (2): 809-813.

Ruggiero V, Chapparino C, Manganello S, Pacello L, Foresta P, Martelli E A 1994. Beneficial effects of a novel platelet-activating factor receptor antagonist, ST 899, on endotoxin-induced shock in mice. *Shock* 2(4): 275-280

Ruis N M, Rose J K, Valone F H 1991. Tumor necrosis factor release by human monocytes stimulated with platelet-activating factor. *Lipids* 26 (12): 1060-1064.

Santiago H C, Pires M F B, Souza D G, Roffe E, Cortes D F, Tafuri W L, Teixeira M M, Vieira L Q 2006. Platelet activating factor receptor-deficient mice present delayed interferon-g upregulation and high susceptibility to *Leishmania amazonensis* infection. *Microbes Infect* 8: 2569-2577.

Scherle P A, Jones E A, Favata M F, Daulerio A J, Covington M B, Nurnberg S A, Magolda R L, Trzaskos J M 1998. Inhibition of MAP kinase kinase prevents cytokine and prostaglandin E2 production in lipopolysaccharide-stimulated monocytes. *J Immunol* 161(10): 5681-5686

Schwadner R, Dziarski R, Wesche H, Rothe M, Kirschning C J 1999. Peptidoglycan and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by Toll-like receptor 2. *J Biol Chem* 274: 17406-17409.

Serhan C N, Haeggström J Z, Leslie C C 1996. Lipid mediator networks in cell signaling: update and impact of cytokines. *Faseb J* 10: 1147-1158.

Seya T, Matsumoto M. A 2002. Lipoprotein family from *Mycoplasma fermentans* confers host immune activation through Toll-like receptor 2. *Int J Biochem Cell Biol* 34: 901-906.

Shimizu T, Kida Y, Kuwana K 2005. A dipalmitoylated lipoproteins from *Mycoplasma pneumoniae* activates NF- κ B through TLR1, TLR2 e TLR6. *J Immunol* 175: 4641-4646.

Smith P F, Langworthy T A, Mayberry W R 1976. Distribution and composition of lipopolysaccharides from mycoplasmas. *J Bacteriol* 125: 916 – 922.

Soares A C, Pinho V S, Souza D G, Shimizu T, Ishii S, Nicoli J R, Teixeira M M 2002. Role of the platelet-activating factor (PAF) receptor during pulmonary infection with gram negative bacteria. *British J Pharmacol* 137: 621-628

Stafforini D M, McIntyre T M, Prescott S M 1990. Platelet-activating factor acetylhydrolase from human plasma. *Methods Enzymol* 187: 344-357.

Stafforini D M, McIntyre T M, Zimmerman G A, Prescott S M 2003. Platelet activating factor, a pleiotropic mediator of physiological and pathological processes. *Crit Rev Clin Lab Sci* 40: 643-672.

Stewart A G, Dubbin P N, Harris T, Dusting G J 1990. Platelet-activating factor may act as a second messenger in the release of eicosanoids and superoxide anions from leukocytes and endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci* 87: 3215-3219.

Strleter R M, Kunkel S L, Bone R C 1993. Role of tumor necrosis factor-alpha in disease states and inflammation. *Crit Care Med* 21(10): 447-463.

Stuehr D J, Marletta M A 1987. Synthesis of nitrite and nitrate in murine macrophage cell lines. *Cancer Res* 47(21): 5590-5594.

Sun X, Hsueh W, Torre-Amione G 1990. Effects of in vivo "priming" on endotoxin-induced hypotension and tissue injury. *Am J Physiol* 136 (4): 949-956

Suputtamongkol Y, Intaranongpai S, Smith M D, Angus B, Chaowagul W, Permpikul C, Simpson J A, Leelarasamee A, Curtis L, White N 2000. A double-blind placebo-controlled study of infusion of lexipafant (platelet-activating factor receptor antagonist) in patients with severe sepsis. *Antimicrobial Agents Chemother* 44(3): 693-696.

Szabó C., Wu C-C, Michell J A, Gross S S, Thiemermann S, Vane J R 1993. Platelet-activating factor contributes to the induction of nitric oxide synthase by bacterial lipopolysaccharide. *Circ Res* 73: 991-999.

Takano T, Honda Z, Sakanaka C, Izumi T, Kameyama K, Haga K, Haga T, Kurokawa K, Shimizu T 1994. Role of cytoplasmic tail phosphorylation sites of platelet-activating factor receptor in agonist-induced desensitization. *J Biol Chem* 269(35): 22453-22458.

Takeda K, Kaisho T, Akira S 2003. Toll-like receptors. *Annu Rev. Immunol* 21: 335-376.

Takeuchi O, Hoshino K, Akira S 2000. Cutting Edge: TLR2-Deficient and MyD88-deficient mice are highly susceptible to *Staphylococcus aureus* infection. *J Immunol* 165: 5392-5393.

Takeuchi O, Kawai T, Mühlradt P F, Morr M, Radolf J D, Zychlinsky A, Takeda K, Akira S 2001. Discrimination of bacterial lipoproteins by toll-like receptor 6. *Int Immunol* 13 (7): 933-940.

Takeuchi O, Takao T, Sato S, Horiuchi T, Hoshino K, Takeda K, Dong Z, Modlin RL, Akira S 2002. Role of toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins. *J Immunol* 169: 10-14.

Thomas D, Chou S, Dauwalder O, Lina G, Marone G 2007. Diversity in *Staphylococcus aureus* Enterotoxins. *Chem Immunol Allergy* 93: 24-41.

Togbe D, Schnyder-Candrian S, Schnyder B, Doz E, Noulin N, Janot L, Secher T, Gasse P, Lima C, Coelho FR, Vasseur V, Erard F, Ryffel B, Couillin I, Moser R 2007. Toll-like receptor and tumour necrosis factor dependent endotoxin-induced acute lung injury. *Int J Exp Pathol* 88(6): 387-391.

Tracey D, Klareskog L, Sasso E H, Salfeld J G, Tak P P 2008. Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: A comprehensive review. *Pharmacol Ther* 117(2): 244-279.

Tully J G 1995. Culture medium formulation for primary isolation and maintenance of Mollicutes. In: Razin S & Tully JG (Eds). *Molecular and Diagnostic Procedures in Mycoplasmaology*. Academic Press 1: 33- 40.

Underhill D M, Ozinsky A, Hajjar A M, Stevens A, Wilson C B, Bassetti M, Aderem A 1999. The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens. *Nature* 401: 811-815.

Underhill D M, Ozinsky A 2002. Toll-like receptors: key mediators of microbe detection. *Curr Opin Immunol* 14: 103-110.

Uronen-Hansson H, Allen J, Osman M, Squires G, Klein N, Callard E 2004. Toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 are present inside human dendritic cells, associated with microtubules and the Golgi apparatus but are not detectable on the cell surface: integrity of microtubules is required for interleukin-12 production in response to internalized bacteria. *Immunology*. 111: 173-178.

Verstak B, Hertzog P, Mansell A 2007. Toll-like receptor signalling and the clinical benefit is that lie within. *Infl amm Res* 56: 1-10.

- Vicent J L, Spapen H, Bakker J, Webster N R, Curtis L 2000. Phase II multicenter clinical study of the platelet-activating factor receptor antagonist BB-882 in the treatment of sepsis. *Crit Care Med* 28(3): 638-642.
- Visintin A, Mazzone A, Spitzer J H, Wyllie D H, Dower S K, Segal D M 2001. Regulation of Toll-like receptors in human monocytes and dendritic cells. *J Immunol* 166: 249-255.
- Wang Y, Tang Y, Teng L, Wu Y, Zhao X, Pei G 2006. Association of β -arrestins and TRAF6 negatively regulates Toll-like receptor-interleukin 1 receptor signaling. *Nature Immunol* 7(2): 139-147.
- Warzocha K, Blenvenu J, Colffier B, Salles G 1995. Mechanisms of action of the tumor necrosis factor and lymphotoxin ligand-receptor system. *Eur Cytokine Netw* 6(2): 83-96.
- Waites K B, Crouse D T, Cassell G H 1993. Systemic Neonatal Infection due to *Ureaplasma urealyticum*. *Clin Infect Dis* 17(1) 131-135.
- Wald D, Qin J, Zhao Z, Qian Y, Naramura M, Tian L, Towne J, Sims J E, Stark G R, Li X 2003. SIGIRR, a negative regulator of Toll-like receptor-interleukin 1 receptor signaling. *Nat Immunol* 4(9): 823-4.
- Wang R Y H, Shih J W K, Grandinetti T, Pierce P F, Hayes M M, Wear D, Alter H J, Lo S C 1992. High frequency of antibodies to *Mycoplasma penetrans* in HIV- infected patients. *Lancet* 340: 1312- 1316.
- Wietek C, Miggin S M, Jefferies C A, O'Neill L A 2003. Interferon regulatory factor-3-mediated activation of the interferon-sensitive response element by Toll-like receptor (TLR) 4 but not TLR3 requires the p65 subunit of NF-kappa. *J Biol Chem* 278: 50923-50931.
- Yamada M, Tanimoto A, Ichinowatari G, Yaginuma H, Ohuchi K 1999. Possible participation of intracellular platelet-activating factor in tumor necrosis factor-alpha production by rat peritoneal macrophages. *Eur J Pharmacol.* 374(3): 341-50.
- Yechouron A, Lefebvre J, Robson H G, Rose D L Tully J G 1992. Fatal septicemia due to *Mycoplasma arginini*: a new human zoonosis. *Clin Infect Dis* 15: 434-438.
- Xing L, Remink D G 2005. Neutrophils as firemen, production of anti-inflammatory mediators by neutrophils in a mixed cell environment. *Cell Immunol* 231: 126-132.
- Zastrow M 2001. Endocytosis and downregulation of G protein-coupled receptors. *Parkinson Rel Dis* 7: 265-271.

Zhang D, Zhang G, Hayden M S, Greenblatt M B, Bussey C, Flavell R A, Ghosh S 2004. Toll-like receptor that prevents infection by uropathogenic bacteria. *Science* 303: 1522-1526.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)