

MÁRCIO JOSÉ FERREIRA

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

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

Área de concentração: Imunologia

Orientador(a): Dra Monica Lopes-Ferreira

Co-orientador(a): Dra Carla Lima

Versão original

São Paulo
2012

RESUMO

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

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

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

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

ABSTRACT

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

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

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

1 INTRODUÇÃO

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

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

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

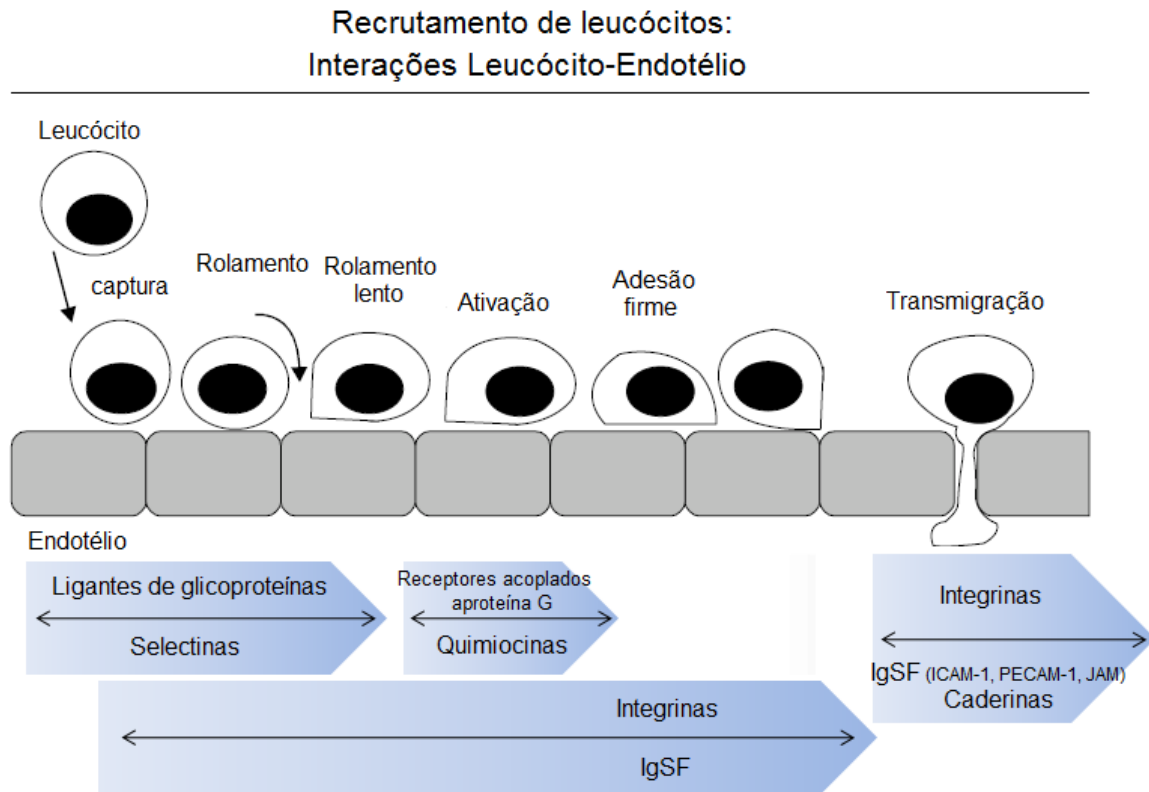
A ativação do endotélio é um evento importante no processo inflamatório podendo ocorrer de duas maneiras: através de uma resposta rápida e independente da expressão de novos genes (tipo I) e uma resposta mais lenta, que depende da ativação de novos genes (tipo II) (Pober e Sessa, 2007). A ativação do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

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

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

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

Figura 1 – Esquema ilustrativo das etapas da migração de leucócitos



Fonte: Choi (2009).

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Figura 2* – Peixe peçonhento *Thalassophryne nattereri*.

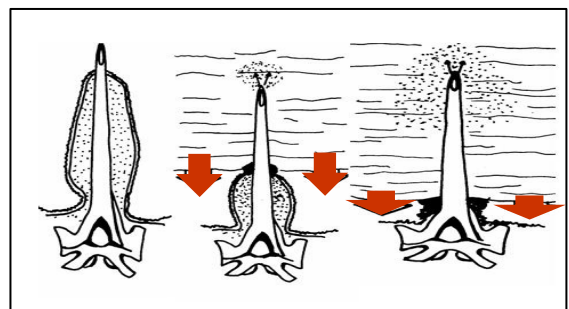
(A)



(B)



(C)



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

* Lopes-Ferreira M. São Paulo, 2001

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

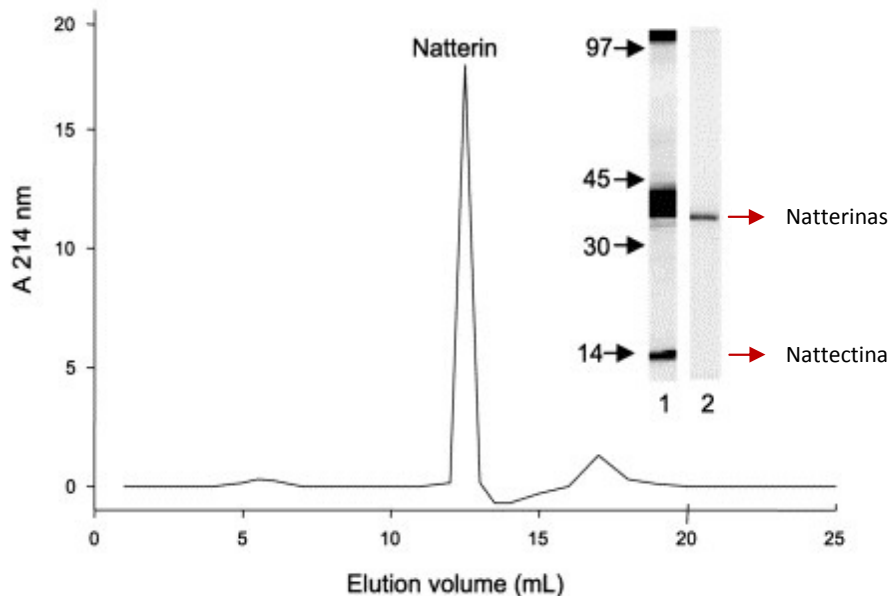
Utilizando modelo murino conseguimos reproduzir os principais sintomas locais do envenenamento observado em humanos: dor, edema e necrose. Estes estudos demonstraram que diferente de outros venenos como os de serpentes ou de abelhas, os efeitos locais induzidos pelo veneno do peixe ocorrem independentemente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

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

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

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

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



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

FONTES: Magalhães et al. (2005)

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

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

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

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

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

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

7 CONCLUSÃO

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

REFERÊNCIAS[†]

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

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

Barford D, Das AK, Egloff MP. The structure and mechanism of protein phosphatases: insights into catalysis and regulation. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* 1998;27:133–64.

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

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

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

Besedovsky AH, Del Ray A, Sorkin E, and Dinarello CA. Immunoregulatory feedback between interleukin-1 and glucocorticoid hormones. *Science.* 1986;233:652-5.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Haddad Jr V, Pardal PPO, Cardoso JLC, Martins IA. The venomous toadfish *Thalassophryne nattereri* (niquim or miquim): Report of 43 injuries provoked in fishermen of Salinópolis (Pará state) and Aracaju (Sergipe state), Brazil. *Rev Inst Med Trop SP* 2003;45:221-3.

Han C, Jin J, Xu S, Liu H, Li N, Cao X. Integrin CD11b negatively regulates TLR-triggered inflammatory responses by activating Syk and promoting degradation of MyD88 and TRIF via Cbl-b. *Nat Immunol.* 2010;11:734-42.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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