

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE ODONTOLOGIA e CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA
CÂMPUS DE ARAÇATUBA**

**AVALIAÇÃO *EX VIVO* DA EXPRESSÃO DE TLR-2 E -4
EM LEUCÓCITOS DE EQUINOS E SUA RELAÇÃO COM A
TOLERÂNCIA À ENDOTOXINA**

**Luciana Cristina A. Carrenho
Médica Veterinária**

**ARAÇATUBA - SP
2009**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE ODONTOLOGIA e CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA
CÂMPUS DE ARAÇATUBA

**AVALIAÇÃO *EX VIVO* DA EXPRESSÃO DE TLR-2 E TLR-4
EM LEUCÓCITOS DE EQUINOS E SUA RELAÇÃO COM A
TOLERÂNCIA À ENDOTOXINA**

Luciana Cristina A. Carrenho
Orientadora: Prof^a. Ass. Dr^a. Juliana R. Peiró

Dissertação apresentada à
Faculdade de Odontologia –
Unesp, Campus de Araçatuba,
como parte das exigências para
obtenção do título de Mestre em
Ciência Animal (Fisiopatologia
Médica e Cirúrgica).

ARAÇATUBA – SP
2009

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca da FOA / UNESP

Carrenho, Luciana Cristina de Andrade
C314a Avaliação ex vivo da expressão de TLR-2 e TLR-4
em leucócitos de equinos e sua relação com a
tolerância à endotoxina / Luciana Cristina de Andrade
Carrenho. – Araçatuba: [s.n.], 2009.
72 f. : il. + CD ROM

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual
Paulista, Faculdade de Odontologia e Curso de
Medicina Veterinária, Araçatuba, 2009.
Orientadora: Profa. Dra. Juliana Regina Peiró

1. Endotoxemia. 2. Equinos. 3. Receptores Toll-like.
4. Citocinas. I.T.

CDD 636.0892

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

LUCIANA CRISTINA DE ANDRADE CARRENHO - nascida em 30 de abril de 1982, na cidade de Bauru, formada em Medicina Veterinária pela Universidade Estadual de Londrina – PR, residência na área de Clínica Médica, Cirúrgica e Anestesiologia de Grandes Animais pela Universidade Estadual Paulista UNESP – Araçatuba e aluna do programa de Pós Graduação em Ciência Animal da UNESP- Araçatuba.

“Não basta ensinar ao homem uma especialidade, porque se tornará assim uma máquina utilizável e não uma personalidade. É necessário que adquira um sentimento, um senso prático daquilo que vale a pena ser empreendido, daquilo que é belo, do que é moralmente correto.”

Albert Einstein

Aos meus pais José Roberto e Elza

Que sempre estimularam todos os meus sonhos e propiciaram a realização de mais este projeto, pois sem eles nada seria possível. A minha conquista está relacionada diretamente à doação e oferta que fizeram em meu favor. Vocês que estiveram junto comigo desde o momento em que escolhi ser veterinária e acompanham todos os meus passos com carinho protetor. Obrigada por todo apoio e amor. Considero-me vitoriosa e dedico meu êxito a vocês, meus grandes incentivadores.

Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

Agradeço,

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento do presente projeto (processo nº 2007/53513-4);

Ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Faculdade de Odontologia – Curso de Medicina Veterinária – Campus de Araçatuba, na pessoa do seu Coordenador Prof. Adjunto Marcelo Vasconcelos Meireles, pela oportunidade de realização do aperfeiçoamento profissional;

A Deus e a Nossa Senhora, por terem me guiado sempre pelo caminho certo, me fazendo entender melhor os meus objetivos e meus sonhos através desse projeto;

A Prof^a. Ass. Dr^a. Juliana R. Peiró, minha orientadora, por me dar a chance de desenvolver o projeto e por todo seu empenho em todos os momentos do meu mestrado;

À Prof^a. Adjunto Valéria Marçal Félix de Lima, por ceder seu laboratório às minhas pesquisas, contribuindo muito para meu projeto e sempre atenciosa e prestativa nos meus momentos de dúvida, a quem agradeço profundamente;

À Prof^a. Ass. Dr^a. Gisele Fabrino Machado que me auxiliou na realização de uma importante etapa desse projeto, cedendo o seu laboratório e todo seu conhecimento;

À Prof^a. Adjunto Cárís Maroni Nunes e o Prof. Adjunto José Fernando Garcia por disponibilizarem equipamentos e o Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular Animal da UNESP- Araçatuba;

Ao Prof. Adjunto Marcelo Vasconcelos Meireles, por disponibilizar seu laboratório para realização de uma importante etapa do projeto;

Ao Prof. Paulo César Ciarlini por ter realizado a análise dos hemogramas completos dos equinos do experimento no laboratório clínico;

À Prof^a. Luciana Del Rio Pinoti Ciarlini por ter cedido a sala da radiologia veterinária, no hospital veterinário, para realização de uma etapa do Western blotting;

À Prof^a. Silvia Helena Venturoli Perri, por ter auxiliado na análise estatística do experimento;

Ao Prof. Adjunto João Santana da Silva e seu Doutorando Walter Miguel Turato, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, por cederem o equipamento para realização de uma importante técnica do projeto e orientação na interpretação dos resultados da citometria de fluxo;

Ao meu amado, Rodrigo, que com todo seu amor e paciência esteve presente em todas as etapas de mais esse passo na minha vida, da qual ele fará parte para sempre;

À minha irmã Patrícia e meu cunhado Marcelo, que mesmo longe, me deram o suporte necessário para finalizar mais essa etapa;

Às minhas avós, Maria José Carrenho e Laura Andrade, que sempre torceram por mim em todos os momentos;

Às minhas amigas “CAPIVARAS” muito especiais Adriana, Larissa, Flávia, Gisele, Bia, Daniela, cuja amizade e alegria levarei para o resto de minha vida, pois foram pessoas muito importantes;

Aos amigos de pós-graduação Tatiana Barbosa, Karina Fattori e Anivaldo (Panorama) por dividirem todo o caminhar da pós-graduação, nas horas difíceis e divertidas também;

Aos discentes Paula Reis Mattos e Guilherme Dias Melo por me ajudarem nas coletas e na realização das técnicas empregadas;

Ao funcionário Nirmen Carlos Pinheiro e seu cavalo Fogo, pela constante disponibilidade em me auxiliar e ceder amostras;

Ao funcionário Antonio Alves, por sempre me auxiliar com generosidade em todos os momentos que necessitei;

Às amigas que fiz nos meus estágios, Wendy Turatti Diniz e Cristina Beneli, que me ensinaram as técnicas necessárias para meu experimento, nos laboratório de Endocrinologia Pediátrica, na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP;

Ao senhor Adriano Carani e à Estância Santa Helena, assim como ao seus funcionários, por disponibilizarem os animais para a realização deste estudo, sempre que necessário;

Aos pós-graduandos Alex Akira Nakamura e Deuvânia Carvalho da Silva, por ajudarem em técnicas do laboratório de PCR.

Aos funcionários da biblioteca do Curso de Medicina Veterinária da UNESP – Araçatuba, em especial às bibliotecárias Isabel Pereira Matos e Fátima Maria Metello Bertolucci pelo auxílio na elaboração das referências bibliográficas

A funcionária Michele Lamara Leite Bispo, por me ajudar sempre tão solicitamente.

SUMÁRIO

	Página
CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	11
Referências.....	24
CAPÍTULO 2 – AVALIAÇÃO <i>EX VIVO</i> DA EXPRESSÃO DE TLR-2 E TLR-4 EM LEUCÓCITOS DE EQUINOS E SUA RELAÇÃO COM A TOLERÂNCIA À ENDOTOXINA.....	38
Resumo.....	38
Introdução.....	39
Material e Método.....	41
Resultado.....	48
Discussão.....	55
Conclusão.....	61
Referências.....	63

AVALIAÇÃO *EX VIVO* DA EXPRESSÃO DE TLR-2 E TLR-4 EM LEUCÓCITOS DE EQUINOS E SUA RELAÇÃO COM A TOLERÂNCIA À ENDOTOXINA

RESUMO - A endotoxemia é um importante distúrbio sistêmico que se origina da resposta do hospedeiro a um componente das bactérias Gram-negativas, o lipopolissacarídeo (LPS) ou endotoxina, que é liberado após bacteriólise ou rápida multiplicação. A ativação do sistema imune inato pelo LPS é um fator chave para o disparo da resposta inflamatória pelo hospedeiro e que acarreta a produção de mediadores inflamatórios, responsáveis pelos eventos patológicos da endotoxemia. A interação dos receptores Toll-like (TLRs) com antígenos específicos deflagram a resposta inflamatória, sendo que o receptor Toll-like-4 (TLR-4) é ativado pela ação das endotoxinas, enquanto o receptor Toll-like-2 (TLR-2) interage com uma variedade de componentes microbianos. Uma exposição prévia a baixas concentrações de LPS pode tornar os cavalos “tolerantes” a um desafio letal subsequente, acarretando uma diminuição na produção de citocinas inflamatórias por um período transitório. Pouco se sabe a respeito do mecanismo celular deste fenômeno em equinos, supondo-se o envolvimento dos receptores Toll-like semelhante ao encontrado em outras espécies. Com este estudo investigaram-se os mecanismos celulares da tolerância à endotoxina em um modelo *ex vivo* com sangue total. Foi demonstrado redução na síntese de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 e IL-6), aumento da expressão gênica da citocina anti-inflamatória IL-10, e ausência de expressão do TGF- β , após o desafio secundário com LPS. A maior expressão dos receptores TLR-2 e -4 após o segundo estímulo de LPS demonstrou que a tolerância à endotoxina não acarreta diminuição da expressão de ambos os receptores em equinos.

Palavras chave: Endotoxemia, cavalos, receptor Toll-like, citocinas.

EX VIVO EVALUATION OF TLR-2 AND TLR-4 EXPRESSION IN EQUINE LEUKOCYTES AND RELATIONSHIP WITH ENDOTOXIN TOLERANCE

SUMMARY - Endotoxemia is an important systemic disease originated from host response to a component of Gram-negative bacteria, lipopolysaccharide (LPS) or endotoxin, which is released after bacteria death or quick replication. The innate immune recognition of LPS has a key role triggering host inflammatory answer and is due to inflammatory mediator's synthesis, which are responsible for pathologic events of endotoxemia. Signs initiated by interaction of Toll-like receptors (TLRs) with specific products induce the inflammatory response. Toll-like receptor-4 (TLR-4) is activated by endotoxin action while Toll-like receptor-2 (TLR-2) interacts with a range of microbial compounds. Some studies demonstrate that both can act like LPS receptors, although by independent pathways. It was demonstrated that a previous exposition to low concentrations of LPS can render horses "tolerant" to a lethal subsequent challenge with endotoxin, leading to a diminished release of inflammatory cytokines during a transient period. However, little is known about the cellular mechanisms involved in this phenomenon in horses, suspecting that there is involvement of cell surface receptors, similarly to other species. This study investigated cellular mechanisms of endotoxin tolerance in a whole blood *ex vivo* model, demonstrating a reduction on pro-inflammatory cytokines synthesis (TNF- α , IL-1 and IL-6), increased gene expression of anti-inflammatory cytokine IL-10 and no alteration in TGF- β expression, after a secondary stimulus with LPS. The Toll-like receptors-2 and -4 increased expression after a second stimulus with LPS showed that endotoxin tolerance does not lead to a decreased expression of both receptors in horses.

Keywords: Endotoxemia, horses, Toll-like receptor, cytokines.

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

A endotoxemia associa-se a doenças com altas taxas de mortalidade em equinos (MORRIS; MOORE, 1989). Nos adultos, estas doenças incluem várias enfermidades que afetam o trato gastrointestinal, principalmente as doenças que se caracterizam por inflamação e isquemia intestinal, relacionadas especialmente aos sinais de cólica. Trata-se de um distúrbio sistêmico que se origina da resposta do hospedeiro a um componente da membrana celular das bactérias Gram-negativas (KUESIS; SPIER, 1998), sendo responsável por grandes perdas econômicas relacionadas aos custos com tratamento, possíveis complicações e morte (LOHMANN et al., 2003).

Os efeitos clínicos induzidas pelas endotoxinas incluem depressão, taquicardia, pirexia, taquipnéia e laminite, e em casos mais severos podem resultar em um colapso cardiovascular, coagulação intravascular disseminada e falência múltipla dos órgãos (SMITH et al., 2005). Alguns equinos podem exibir sinais de dor abdominal, enquanto outros parecem ficar deprimidos (MOORE, 2001). Os sinais clínicos de endotoxemia estão presentes apesar de baixas concentrações plasmáticas de endotoxina, pois os equinos são muito sensíveis aos efeitos adversos das endotoxinas das bactérias Gram-negativas (KIKU et al., 2003).

Há mais de 100 anos, descobriu-se que extratos de bactérias Gram-negativas eram altamente tóxicos. Com base na suposição que essas toxinas eram liberadas do interior da bactéria após sua morte, o termo “endotoxina” foi proposto. No entanto, os resultados de estudos bioquímicos subsequentes determinaram que estas endotoxinas não eram provenientes do interior da bactéria, mas tratavam-se de componentes lipopolissacarídeos (LPS) da membrana externa da bactéria entérica (MOORE, 2001).

O lipopolissacarídeo é o componente bacteriano mais importante na fisiopatologia da endotoxemia (MOORE, 2001) e, embora permaneça intimamente associado à membrana externa na bactéria viva, ele é liberado quando ocorre

replicação bacteriana rápida, lise ou morte do microorganismo (HENRY; MOORE, 1993; MOORE, 1981; OLSON et al., 1995). Ele representa de 1 a 10 % do peso seco da bactéria Gram-negativa (BRADLEY, 1985; EMAU et al., 1987) e é constituído de três regiões, sendo uma externa polissacarídica (O-antigênica); uma central, composta por monossacarídeos; e uma região rica em ácidos graxos, conhecida como lipídeo A (MOORE, 1981), que é a parte biologicamente ativa do LPS (GALANOS et al., 1985).

O lúmen intestinal do equino contém normalmente uma grande quantidade de endotoxinas (MOORE, 1981), porém distúrbios gastrintestinais reduzem a eficácia da barreira mucosa (HENRY; MOORE, 1993), facilitando a passagem destas para o sistema venoso mesentérico ou linfático, ou então para a cavidade peritoneal, e desta maneira alcançando a corrente circulatória (COLLATOS, 1995; MOORE, 1995). Em alguns casos, outros mecanismos protetores, como as células de Kupffer no fígado e anticorpos antiendotoxina circulantes protegem o organismo contra os efeitos deletérios das endotoxinas (BURROWS, 1981). Quando a permeabilidade do intestino inflamado ou isquêmico está aumentada, ou as células de Kupffer não conseguem detoxificar uma grande quantidade de endotoxina liberada, há a síntese de mediadores inflamatórios pelas células do hospedeiro as quais, por sua vez, são responsáveis pela mediação de eventos patológicos da endotoxemia (BARTON et al., 1996; MOORE, 1995; MORRIS; MOORE, 1989; MORRISON et al., 1994; ROBERTS, 1995; SEETHANATHAN et al., 1990).

Embora muitos tipos celulares sejam capazes de sintetizar mediadores inflamatórios (BARTON et al., 1996), o monócito é célula pivô que medeia a resposta orgânica a endotoxemia (WRIGHT et al., 1990). Esta célula possui a capacidade de se ligar ao LPS e de ativar o sistema imune inato pela liberação de vários mediadores, como o fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α), a interleucina-1 (IL-1) e a interleucina-6 (IL-6) (AKASHI et al., 2000; NOMURA et al., 2000).

O TNF- α medeia diversos efeitos inflamatórios e metabólicos como a ativação, a aderência ao endotélio e a degranulação de neutrófilos, indução de febre, aumento da síntese de catecolaminas e atividade pró-coagulante. Resulta

assim em microtrombose, extravasamento capilar e necrose hemorrágica em órgãos vitais como pulmão, coração, fígado, rins e trato gastrointestinal (GYETKO et al., 1992). Desta maneira, aumentos significativos na concentração do fator de necrose tumoral têm sido demonstrados no soro e líquido peritoneal de equinos com doenças gastrointestinais, e foram associados a um mau prognóstico (BARTON et al., 1996 ; MACKAY, 1992 ; MORRIS et al., 1991).

As interleucinas são uma grande família de citocinas sintetizadas por fagócitos mononucleares, que funcionam como reguladores das respostas inflamatória e imunológica normais do hospedeiro (MOORE, 1999). A interleucina-1 também tem sido implicada na patogênese da endotoxemia, causando hipotensão, além de agir sinergicamente com outras citocinas. Os picos de concentração do TNF- α e da IL-1 são três e 4,5 horas, a partir do início do processo, respectivamente (OLSON et al., 1995; SEETHANATHAN et al., 1990).

Outra citocina importante na endotoxemia é a interleucina-6 (IL-6) (AKASHI et al., 2000; NOMURA et al., 2000), que juntamente com a IL-1 e o TNF- α tem um papel importante na produção de proteínas de fase aguda pelos hepatócitos (GAULDIE et al., 1990) e na indução da febre (LEMAY et al., 1990 ; OPP et al., 1989). Uma associação positiva e uma correlação linear foram vistas entre as concentrações séricas de IL-6 e a resposta febril em equinos que receberam endotoxina por via intravenosa (MORRIS et al., 1992). A concentração dessa citocina está aumentada em relação a valores basais após 1 a 8 horas de estímulo com LPS (BUENO et al., 1999).

Existem evidências de que além do estímulo para a síntese de mediadores pró-inflamatórios, as endotoxinas também originam a síntese e liberação de mediadores anti-inflamatórios (FLACH et al., 1997). A interleucina-10 (IL-10) é uma citocina anti-inflamatória sintetizada por monócitos, macrófagos e linfócitos, cuja produção parece ser regulada pelo fator de necrose tumoral e pela interleucina-1. O principal efeito anti-inflamatório da IL-10 parece envolver uma desativação dos fagócitos mononucleares e inibição da síntese de citocinas pró-inflamatórias (FIORENTINO et al., 1991).

Outro mediador com potencial anti-inflamatório que merece estudo em equinos inclui o fator de crescimento transformador- β (TGF- β), que parece apresentar um papel importante na regulação de respostas imunes, principalmente por sua função imunossupressora (MOORE, 2001). O papel do TGF- β na endotoxemia é controverso, pois ele é responsável por uma menor regulação dos reativos de fase aguda (MICHALOPOULOS; DEFRANCES, 1997) e inibe a resposta *in vitro* de macrófagos ao LPS (IMAI et al., 2000). Por outro lado, o TGF- β tem sido associado à inflamação sistêmica, apresentando níveis elevados tanto na sepse (MARIE et al., 1996) quanto no choque pós-traumático (VAREDI et al., 2001), além de induzir a expressão do TNF- α (CHANTRY et al., 1989) e da IL-6 (TURNER et al., 1990).

Sabe-se que o TGF- β promove diferentes respostas biológicas ligando-se a dois pares de receptores de membranas do tipo I e do tipo II e que consequentemente fosforilam proteínas Smads, cuja localização intracelular é requerida para regulação da transcrição de genes alvos. O TGF- β 1 é secretado sob a forma de um complexo latente (LAP), o qual é incapaz de interagir com seu receptor, sendo portanto inativo. Ao ser clivado, esse complexo libera TGF- β 1 como uma proteína homodimérica ativa (HUSE et al., 2001; KIMURA et al., 2007; LI et al., 2006; MASSAGUE, 1998).

Esta forma latente pode ser secretada como uma proteína ligadora de TGF- β latente (LTBP). O TGF- β não pode se ligar a seus receptores na forma latente, precisando ser liberado do interior da LAP ou LTBP. *In vitro* isto pode ser feito por extremos de pH ácido, calor ou várias proteases (ANNES et al., 2003). *In vivo*, o mecanismo para ativação não é tão claro, mas alguns modelos têm proposto a ativação proteolítica por transglutaminase, alterações conformacionais na LAP pela interação com a trombospondina, ou tração mecânica via integrinas nas células epiteliais (ANNES et al., 2004; CRAWFORD et al., 1998; MUNGER et al., 1999; NUNES et al., 1995).

Pouco se sabe a respeito da regulação transcricional da regulação do TGF- β , sendo que em muitos casos os níveis de mensagem do TGF- β não

correspondem à quantidade de proteína secretada, sugerindo uma regulação pós-transcricional e/ou pós-transducional da expressão do TGF- β (KIM et al., 1992).

A ativação de monócitos, macrófagos ou neutrófilos pelo LPS para produção dessas citocinas é mediada principalmente pelo CD14 (MOORE, 2001). O início da resposta inflamatória ocorre quando a proteína ligante de LPS transfere o monômero de endotoxina a um receptor superficial celular denominado antígeno de diferenciação de agrupamento 14 (CD14), que existe principalmente em fagócitos mononucleares. O CD14 é um receptor protéico de reconhecimento que identifica endotoxinas como um padrão indicativo de patógenos (STELTER, 2000), e é ele que inicia a ativação de macrófagos para síntese de citocinas pró-inflamatórias (DEUTENER et al., 1993).

Embora o receptor CD14 tenha um papel importante na resposta às endotoxinas, falta a este a habilidade de sinalizar ao interior da célula a presença da endotoxina na corrente circulatória. O receptor de superfície está ancorado, somente ao exterior da célula, o que não inclui a porção transmembrana (MOORE, 2001). Tem sido sugerido que a ligação da endotoxina ao receptor de superfície celular CD14 é seguido de uma interação subsequente do complexo CD-14-LPS a outros componentes de membrana, que servem na verdade para iniciar a sinalização interna. Portanto o CD14 funciona como a principal unidade de ligação para o LPS, mas não está diretamente envolvido na sinalização celular (LEE et al., 1993).

Há pouco tempo foram identificados os receptores Toll-like (TLRs) (BAKER et al., 1997; HASHIMOTO et al., 1988; MEDZHITOV et al., 1997), que são glicoproteínas de membrana integral tipo I, responsáveis por fazer a comunicação entre os aspectos externo e interno da célula (MOORE, 2001). Esta denominação “Toll” foi inicialmente dada ao receptor envolvido no desenvolvimento embrionário da mosca *Drosophila melanogaster* (BELVIN; ANDERSON, 1996; LEMAITRE et al., 1996), e já foram descritos onze membros da família dos receptores Toll-like em humanos (AKIRA; TAKEDA, 2004).

Dois membros dessa família, os receptores Toll-like-2 e -4 têm sido identificados como possíveis receptores envolvidos na sinalização do LPS

(KIRSCHNING et al., 1998; POLTORAK et al., 1998; YANG et al., 1998). Estes são responsáveis pelo início da cascata da resposta inflamatória (HODGSON, 2006), então associados com a via de sinalização que resulta na ativação de genes que medeiam a resposta imune inata (MEANS et al., 2000) e na atividade de produtos de microorganismos invasores (TAKEUCHI; AKIRA, 2001).

A regulação da expressão dos receptores Toll-like-2 e -4 pelo LPS é considerada um dos mecanismos controladores de respostas das células do sistema imune frente a bactérias (MARSIK et al., 2003), uma vez que o receptor Toll-like-2 (TLR-2) reconhece uma variedade de componentes microbianos (TAKEDA et al., 2003), e o receptor Toll-like-4 (TLR-4) é ativado pela ação das endotoxinas (EBERT et al., 2006).

Um estímulo exagerado ou contínuo ao receptor Toll-like-4 por qualquer ligante pode resultar em uma resposta inflamatória, progredindo para hipotensão, choque, falência de órgãos e até mesmo a morte (ROSSIGNOL; LYNN, 2005). Embora não se observe uma resposta espécie-específica mediada pelo TLR-2, este receptor não deixa de ter importância na transdução no sinal do LPS (LIEN et al., 1999).

Estudos recentes em humanos e animais (BUTTENSCHOEN et al., 2008; ZHONG et al., 2008) tentam demonstrar que tanto o TLR-2 quanto o TLR-4 podem agir como receptores para LPS, porém de formas independentes (MEANS et al., 2000). As síndromes cólica e da resposta inflamatória severa (SIRS) têm sido associadas com a alta expressão dos TLR-2 e TLR-4 (XIONG et al., 2006), devendo-se considerar que as atividades biológicas dos receptores Toll-like não podem ser extrapoladas dos relatos em humanos e camundongos para equinos (BRYANT et al., 2007).

Com o conhecimento adquirido sobre a interação entre receptores e mediadores inflamatórios, desenvolveram-se estratégias para controlar a endotoxemia, que envolvem o bloqueio dos efeitos da endotoxina e a modulação da resposta pró-inflamatória (ULEVITCH et al., 2001). Experimentalmente, o uso preventivo de vários fármacos tem demonstrado um efeito benéfico, diminuindo a morbidade e a mortalidade de animais com doença gastrointestinal (PARVIAINEN

et al., 2001). Observou-se também que houve efeitos terapêuticos benéficos quando ocorreu um efeito cumulativo da exposição ao LPS em equinos (MORRESEY, 2001).

Beeson (1947) demonstrou que coelhos submetidos a injeções repetidas de vacina tifóide eventualmente se tornavam resistentes a febre, fenômeno referido como “tolerância ao LPS” (VAN EPPS, 2006). Há meio século já existia ampla evidência de que um regime de administração de algumas doses de LPS induz a tolerância à endotoxina e também aumenta as defesas do hospedeiro contra vários patógenos (BIOZZI et al., 1959; HOWARD et al., 1958; WHARTON; CREECH, 1949).

A tolerância ao LPS é definida como uma redução na reatividade ao desafio de lipopolissacarídeo após um segundo encontro com a endotoxina (CAVAILLON et al., 2003). Constitui um estado transitório, que pode ser induzido por um único ou repetidos estímulos com doses subletais de endotoxina, sendo observado tanto em animais quanto em humanos (ACKERMANN et al., 2001). Esta tolerância pode ser verificada dentro de horas após uma exposição secundária ao LPS, envolvendo a participação de mediadores como TNF- α , IL-1, IL-6 e IL-10 (GRANOWITZ et al., 1993), inibindo significativamente a habilidade de vários tipos celulares em responder ao desafio subsequente com o lipopolissacarídeo (BARTON et al., 1996).

O fator de necrose tumoral (TNF) é provavelmente o melhor marcador de tolerância à endotoxina por apresentar uma dramática redução após um desafio com LPS em animais “tolerantes”, em contraste ao seu pico definido e rápido em resposta a primeira injeção de LPS (MATHINSON et al., 1993). Segundo Allen et al. (1996) e Barton et al. (1996), equinos que já apresentaram uma doença gastrointestinal, têm menor produção de TNF- α quando expostos novamente às endotoxinas, diferentemente de animais sem histórico da afecção, sugerindo a ocorrência de tolerância à endotoxina (CAMPEBELL et al., 2007).

Utilizando a indução de febre como ponto limite, dois tipos de tolerância têm sido reconhecidos (GRIESMAN; HORNICK, 1973). A tolerância tardia (>72 horas), provavelmente relacionada ao desenvolvimento de anticorpo contra a

região O, que é tipo-específica; e a tolerância precoce (<72 horas), que foi considerada não específica, na qual a endotoxina derivada de diferentes espécies bacterianas pode iniciar a atividade do sistema retículo-endotelial não-responsivo, observado após a administração de LPS heterólogo (CROSS, 2002).

Este mecanismo de tolerância à endotoxina pode proteger o hospedeiro contra o desenvolvimento de uma síndrome choque, causada pela produção excessiva das citocinas (MEDVEDEV et al., 2001). Tal fenômeno tem sido também chamado de desativação, dessensibilização, anergia, refratariedade ou reprogramação, e em muitos aspectos assemelha-se a uma imunodepressão/imunossupressão/imunoparalisia que tem sido descrita em pacientes com sepse ou na síndrome de resposta inflamatória sistêmica não-infecciosa (GRANOWITZ et al., 1993).

Bennett Junior (1964) notou que o fenômeno da tolerância à endotoxina é experimentalmente tão extraordinário que se torna difícil acreditar que não tenha significado clínico. É importante lembrar que a tolerância à endotoxina tem sido associada com aumento da resistência e proteção contra lesões teciduais e até mesmo mortalidade (ACKERMAN et al., 2001; COLLETTI et al., 1994; EISING et al., 1996; HE et al., 1992 ; HEEMANN et al., 2000). Esse aumento de resistência em situações estressantes demonstra que a tolerância à endotoxina é muito mais do que uma simples diminuição na resposta inflamatória ao LPS (CAVAILLON; ADIB-CONQUY, 2006).

Apesar do exato mecanismo da tolerância à endotoxina ainda não estar totalmente elucidado, a ocorrência de menor expressão de receptores de endotoxina nas células alvo têm sido proposta (BARTON et al., 1996; CAMPEBELL et al., 2007). Dessa maneira, Labeta et al. (1993) analisaram a expressão do receptor de superfície CD14 na tolerância ao LPS em células fagocitárias humanas, e ao invés de observarem uma diminuição da expressão deste receptor, relataram um aumento da expressão do CD14 nas células tratadas com o LPS. Estudo similar em células humanas demonstrou que tanto a expressão do RNAm do CD14 quanto a sua expressão de superfície estavam aumentadas após a indução da tolerância ao LPS (ZIEGLER- HEITBROCK et al.,

1994). No entanto, outros investigadores não encontraram alterações na expressão do CD14 após a indução da tolerância ao LPS (MATHINSON et al., 1993; MCCALL et al., 1993), e desta maneira concluiu-se que a supressão da expressão do receptor CD14 não ocorre no mecanismo de tolerância ao LPS (FAN; COOK, 2004). Consequentemente, estudos surgiram para investigar o envolvimento de outras moléculas nesse fenômeno.

A sinalização do LPS mediada pelo TLR-4 requer a expressão concomitante da proteína acessória de diferenciação mielóide-2 (MD-2) que está fisicamente associada ao TLR-4. Este complexo controla o principal sistema sinalizador de resposta, que detecta a presença de microrganismos Gram-negativos (AKASHI et al., 2000; KAWASHI et al., 2000; SHIMAZU et al., 1999).

Em macrófagos peritoneais de camundongos, a expressão do RNAm da MD-2 não demonstra alterações após o pré-tratamento com LPS (SATO et al., 2000). Porém, em monócitos de humanos, a expressão do RNAm da MD-2 encontrava-se aumentada (MEDVEDEV et al., 2002), enquanto Yeo et al. (2003) demonstraram uma diminuição da expressão de superfície do complexo TLR-4 MD-2 após o estímulo com LPS, revelando que o envolvimento dessa proteína na tolerância ao LPS ocorre de modo variável.

Outros pesquisadores investigaram o possível envolvimento somente dos receptores Toll-like no fenômeno de tolerância à endotoxina. Estudos realizados em monócitos humanos e órgãos de hamsters (MEDVEDEV et al., 2001) ou em células mononucleares de humanos (ADIB-CONQUY; CAVAILLON, 2002), demonstram que a expressão do RNAm do TLR-4 nestas células diminuiu após a segunda dose de LPS, enquanto a expressão de superfície do TLR-4 não foi alterada. Desta maneira, sugeriu-se que os mecanismos de tolerância ao LPS não poderiam simplesmente ser explicados como uma maior ou menor regulação dos receptores de superfície (FAN; COOK, 2004).

A tolerância à endotoxina é demonstrável tanto *in vivo* quanto *in vitro*, tanto em organismos vivos como em células isoladas. A diminuição na produção de citocinas também foi reproduzida em modelos *ex vivo* de tolerância em humanos

com sepse (GRANOWITZ et al., 1993), assim como em células mononucleares “tolerantes” de equinos (DURANDO et al., 2005).

A supressão de várias citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 e IL-6) pode ocorrer durante a tolerância à endotoxina (WYSOCKA et al., 2001), sendo que a capacidade dos monócitos em produzir TNF- α está diminuída durante o fenômeno *in vitro* em ratos (FLOHE et al., 1991), coelhos (WAKABAYASHI et al., 1994) e humanos (ZIEGLER-HEITBROCK et al., 1992). No entanto, a produção de IL-1 pode estar aumentada nos macrófagos peritoneais de camundongos (SEATTER et al., 1994), diminuída em células humanas (ZIEGLER-HEITBROCK et al., 1992) ou inalterada como encontrado *in vitro* em murinos (TAKASUKA et al., 1991). Assim como os níveis de IL-6 encontram-se aumentados em macrófagos peritoneais de camundongos (HIROHASHI et al., 1996) e monócitos de humanos (MENGOZZI et al., 1993) ou reduzidos nas células humanas (ZIEGLER-HEITBROCK et al., 1992), caracterizando um padrão contraditório na expressão de tais citocinas no fenômeno de tolerância à endotoxina.

Como as citocinas IL-10 e TGF- β têm efeito anti-inflamatório (HORWARD et al., 1993), sugeriu-se um aumento nas suas produções durante o fenômeno de tolerância à endotoxina (RANDOW et al., 1995). O uso de anticorpos anti-TGF- β e anti-IL-10 demonstrou prevenir a tolerância (RANDOW et al., 1995). Porém, enquanto alguns autores demonstraram um aumento na expressão de IL-10 em modelos *in vivo* (FRANKENBERGER et al., 1995; VARMA et al., 2001), outros demonstraram uma diminuição na liberação dessa citocina em um modelo *ex vivo* de tolerância (VAN DER POLL et al., 1996) e em cultura de células em humanos (KARP et al., 1998).

Assim, os modelos experimentais a serem escolhidos para mimetizar o fenômeno de tolerância à endotoxina devem ser cuidadosamente avaliados. O modelo *in vitro* apresenta desvantagens, pois os monócitos em cultura não respondem ao LPS da mesma maneira como no sangue total, e o procedimento de isolamento em condições de cultura pode ativar as células, podendo interferir com a ativação específica pelo LPS (DE LA CALLE et al., 2002).

Já os modelos *in vivo* também apresentam desvantagens, uma vez que a infusão de doses baixas de endotoxina (0,03-0,10 µg/kg) em equinos é suficiente para induzir hipertensão pulmonar moderada e diminuir significativamente o fluxo sanguíneo para o tecido intestinal (BAXTER, 1995; CLARK; MOORE, 1989; CLARK et al., 1991; MOORE; MORRIS, 1992).

Dependendo da dose de LPS, os sinais clínicos da endotoxemia experimental podem variar de febre sem mal-estar evidente à falha múltipla de órgãos. Em um equino exposto a um “bolus” intravenoso com uma dose subletal de endotoxina (1µg/kg), há um período de taquipnéia discreta. Ao redor de uma hora, depressão, inquietação e inapetência manifestam-se gradualmente, verificando-se um aumento progressivo da temperatura corpórea ao final de 2 horas (MACKAY et al., 1991; MACKAY et al., 1992). Os modelos *in vivo* também levam à ativação de ligantes endógenos dos receptores Toll-like, outras células e componentes da cascata de coagulação (FAURE et al., 2001; SMILEY et al., 2001).

Como demonstrado por diversos autores (HADLEY et al., 2005; HADLEY et al., 2007; WANG et al., 2000; WANG et al., 2001; YAGUB et al., 2003) o modelo *ex vivo* com sangue total apresenta vantagens como a estabilidade em relação à contagem e viabilidade de leucócitos ao longo do período de 24 horas. Desta maneira, este modelo permite quantificar a expressão do receptor Toll-like-4 em humanos, demonstrando a interação entre as populações celulares e mediadores da resposta imune inata (HADLEY et al., 2007). A quantificação de citocinas inflamatórias foi obtida por outros estudos (HADLEY et al., 2005; WANG et al., 2000), com relato de produção similar ao encontrado em cultura de monócitos (WANG et al., 2000). Este modelo é tempo e custo-eficiente, assim como de fácil uso, reduzindo a necessidade de experimentos animais (YAGUB et al., 2003).

Na imunologia experimental vários receptores de superfície das células podem ser determinados através da citometria com o uso de anticorpos monoclonais específicos conjugados a um determinado fluorocromo (DAVIS et al., 2002). Os citômetros de fluxo têm como princípio básico aspirar células ou partículas de uma suspensão e forçá-las a passar por uma câmara especial que

faz com que as células fiquem envolvidas e centralizadas num fluxo contínuo de líquido e saiam desta câmara uma atrás da outra de modo que uma única célula seja interceptada pelo laser. Primeiro, uma parte da luz é espalhada (*scatter*) de acordo com as características morfológicas e estruturais da célula. Segundo, as células previamente marcadas com fluorocromos, uma vez excitadas pelo laser, emitem luz de acordo com suas características fluorescentes e são utilizadas para se examinar aspectos bioquímicos, biofísicos e moleculares das células (CHAPMAN, 2000).

A citometria de fluxo é muito importante para avaliar a expressão dos receptores Toll-like na superfície celular de leucócitos humanos em modelos *in vitro* (MARSIK et al., 2003) e *ex vivo* (HADLEY et al., 2007; WITTEBOLE et al., 2005). Demonstrou-se, por meio desta técnica, que o LPS também modula a expressão dos receptores Toll-like-2 e -4 em modelos *ex vivo* e *in vivo* na endotoxemia equina (PEIRÓ et al., 2008).

Métodos confiáveis e específicos como a reação em cadeia da polimerase (PCR) têm sido empregados para mensurar a expressão de citocinas (FICKO; CERNELE, 2005; HEID et al., 1996; WANG; BROWN, 1999). A PCR em tempo real (qRT-PCR) apresenta vantagens como rapidez, especificidade, sensibilidade e quantificação. A amplificação é dividida em 3 fases: a linha basal na qual não há produtos de PCR suficientes para detectar fluorescência, a fase log em que a quantidade de produtos de PCR dobra a cada ciclo e a fase platô onde não há mais aumento no número de produtos (GACHON et al., 2004). Existem dois métodos de quantificação na PCR em tempo real: a detecção não-específica e a específica. O Syber Green é o exemplo mais utilizado de detecção não-específica, no qual fluoróforos fluorescentes se ligam à fita-dupla de DNA, emitindo fluorescência, enquanto o TaqMan utiliza uma sonda altamente específica para a sequência alvo, liberando fluorescência apenas na presença do produto de PCR de interesse (SCHAAD; FREDERICK, 2002).

Desta maneira, acredita-se que o sistema imune possa ser um alvo terapêutico interessante (BROAD et al., 2006), e que a tolerância à endotoxina

possa ser um mecanismo decorrente da evolução, pela supressão da liberação de citocinas durante a sepse.

Interessantemente, pouco se sabe a respeito do fenômeno de tolerância à endotoxina em equinos (DURANDO et al., 2005), sua natureza e o significado fisiológico permanecem ainda desconhecidos até hoje, semelhante a quando inicialmente descritos (CROSS, 2002). Apesar do conhecimento já adquirido em humanos e em outros animais, é necessário um melhor entendimento dos mecanismos da resposta celular a um segundo estímulo com LPS nos equinos.

Assim, os objetivos desse estudo incluem tentar identificar o papel dos receptores Toll-like-2 e -4 durante o fenômeno da tolerância ao LPS em um modelo *ex vivo* de sangue total em equinos, e investigar os possíveis efeitos supressores do estímulo secundário de LPS neste modelo, através da quantificação da produção de citocinas como TNF- α , IL-1, IL-6, IL-10 e TGF- β .

REFERENCIAS

- ACKERMAN, M.; REUTER, M.; FLOHE, S. et al. Cytokine synthesis in the liver of endotoxin-tolerant and normal rats during hemorrhagic shock. *J. Endotoxin Res.*, v. 7, n. 2, p. 105-112, 2001.
- ADIB-CONQUY, M.; CAVAILLON, J.M. Gamma interferon and granulocyte/monocyte colony-stimulating factor prevent endotoxin tolerance in human monocytes by promoting interleukin-1 receptor-associated kinase expression and its association to MyD88 and not by modulating TLR4 expression. *J. Biol. Chem.*, v. 277, n. 31, p. 27927-27934, 2002.
- AKASHI, S; SHIMAZU, R.; OGATA, H. et al. Cutting Edge: cell surface expression and lipopolysaccharide signaling via the toll-like receptor 4-md-2 complex on mouse peritoneal macrophages. *J. Immunol.*, v. 164, n. 7, p. 3471-3475, 2000.
- AKIRA, S.; TAKEDA, K. Toll-like receptor signaling. *Nat. Rev. Immunol.*, v. 4, n. 7, p. 499-511, 2004.
- ALLEN, G.K.; CAMPBELL-BEGGS, C.; ROBINSON, J.A. et al. Induction of early - phase endotoxin tolerance in horses. *Equine Vet. J.*, v. 28, n. 4, p. 269-274, 1996.
- ANNES, J.P.; MUNGER, J.S.; RIFKIN, D.B. Making sense of latent TGF- β activation. *J. Cell Sci.*, v. 116, n. 2, p. 217-224, 2003.
- ANNES, J.P.; CHEN, Y.; MUNGER, J.S. et al. Integrin $\alpha\beta 6$ -mediated activation of latent TGF- β requires the latent TGF- β binding protein-1. *J. Cell Biol.*, v. 165, n. 5, p. 723-734, 2004.
- BAKER, B.; ZAMBRYSKI, P.; STASKAWICZ, B. et al. Signaling in plant-microbe interactions. *Science*, v. 276, n. 5313, p. 726-733, 1997.
- BARTON, M.H.; COLLATOS, C.; MOORE, J.N. Endotoxin induced expression of tumor necrosis factor, tissue factor and plasminogen activator inhibitor activity by peritoneal macrophages. *Equine Vet. J.*, v. 28, n. 3, p. 382-389, 1996.
- BAXTER, G.M. Alterations of endothelium-dependent digital vascular responses in horses given low-dose endotoxin. *Vet. Surg.*, v. 24, n. 2, p. 87-96, 1995.

- BEESON, P. B. Tolerance to bacterial pyrogen: factors influencing its development. *J. Exp. Med.*, v. 86, p. 29–38, 1947.
- BELVIN, M.P.; ANDERSON, K.V. A conserved signaling pathway: the *Drosophila* Toll- dorsal pathway. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, v. 12, p. 393-416, 1996.
- BENNETT- JUNIOR, I.L. Approaches to the mechanisms of endotoxin action. In: LANDY, M.; BRAUN, W. Bacterial endotoxins. New Brunswick: institute of microbiology of rutgers, 1964. p. 12-16.
- BIOZZI, G.B.; BENACERRAF, B.; HALPERN, B.N. et al. The effect of *Mycobacterium tuberculosis* (BCG) infection on the resistance of mice to bacterial endotoxin and *Salmonella enteritidis* infection. *Br. J. Exp. Pathol.*, v. 40, n. 3, p. 281-290, 1959.
- BRADLEY, S. G. Interactions between endotoxin and protein synthesis. In: BERRY, L.J. (Ed.) *Cellular biology of endotoxin*. Amsterdam: Elsevier, 1985. p. 340- 371.
- BROAD, A.; JONES, D.E.; KIRBY, J.A. Toll-like receptor (TLR) response tolerance: a key physiological “damage” limitation” effect and an important potential opportunity for therapy. *Curr. Med. Chem.*, v. 13, n. 21, p. 2487-2502, 2006.
- BRYANT, C. E.; OUELLETTE, A.; LOHMANN, K. et al. The cellular Toll-like receptor 4 antagonist E5531 can act as an agonist in horse whole blood. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v. 116, n. 3-4, p. 182–189, 2007.
- BUENO, A.C.; SEAHORN, T.L.; CORNICK-SEAHORN, J. et al. Plasma and nitric oxide concentrations in horses given below a low dose of endotoxin. *Am. J. Vet. Res.*, v. 60, n. 8, p. 969-976, 1999.
- BURROWS, G.E. Endotoxaemia in the horse. *Equine Vet. J.*, v. 13, n. 2, p. 89-94, 1981.
- BUTTENSCHOEN, K.; SCHNEIDER, M.E.; UTZ, K. et al. Effect of major abdominal surgery on endotoxin release and expression of Toll-like receptors 2/4. *Langenbecks Arch. Surg.*, v. 394, n. 2, p. 293-302, 2008.
- CAMPEBELL, R.C.; PEIRÓ, J.R.; ROSA, P.C. et al. Endotoxemia por lipopolissacarídeo de *Escherichia coli*, em equinos: efeitos de antiinflamatórios

- nas concentrações sérica e peritoneal do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α). *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 59, n. 4, p. 837-843, 2007.
- CAVAILLON, J.M.; ADIB-CONQUY, M. Bench-to-bedside review: endotoxin tolerance as a model of leukocyte reprogramming in sepsis. *Crit. Care*, v. 10, n. 5, p. 233, 2006.
- CAVAILLON, J.M.; ADRIE, C.; FITTING, C. et al. Endotoxin tolerance : is there a clinical relevance? *Endotoxin Res.*, v. 9, n. 2, p. 101-107, 2003.
- CHANTRY, D.; TURNER, M.; ABNEY, E. et al. Modulation of cytokine production by transforming growth factor-beta. *J. Immunol.*, v. 142, n. 12, p. 4295-300, 1989.
- CHAPMAN, G.V. Instrumentation for flow cytometry. *J. Immunol. Methods*, v. 243, n. 1, p. 3-12, 2000.
- CLARK, E.S.; MOORE, J.N. The effects of slow infusion of a low dosage of endotoxin in healthy horses. *Equine Vet. Suppl.*, n. 7, p. 33-37, 1989.
- CLARK, E.S.; GANTLEY, B.; MOORE, J.N. Effects of slow infusion of a low dosage of endotoxin on systemic haemodynamics in conscious ponies. *Equine Vet. J.*, v. 23, n. 1, p. 18-21, 1991.
- COLLATOS, C. Clinical conditions associate with endotoxemia. *Proc. Am. Assoc. Equine Pract.* v. 41, p. 103-106, 1995.
- COLLETTI, L.M.; REMICK, D.G.; CAMPBELL, D.A. LPS pretreatment protects from hepatic ischemia/reperfusion. *J. Surg. Res.*, v. 57, n. 3, p. 337-343, 1994.
- CRAWFORD, S.E.; STELLMACH, V.; MURPHY-ULLRICH, J.E. et al. Thrombospondin-1 is a major activation of TGF- β in vivo. *Cell*, v. 93, p. 1159-1170, 1998.
- CROSS, A.S. Endotoxin tolerance: current concepts in historical perspective. *Endotoxin Res.*, v. 8, n. 2, p. 83-98, 2002.
- DAVIS, E.G.; WILKERSON, M.J.; RUSH, B.R. Flow cytometry: clinical applications in equine medicine. *J. Vet. Intern. Med.*, v. 16, n. 4, p. 404-410, 2002.
- DE LA CALLE, J.; BURBA, D.J.; RAMASWAMY, C.M. et al. Plasma and synovial fluid endothelin-1 and nitric oxide concentrations in horses with and without joint disease. *Am. J. Vet. Res.*, v. 63, n. 12, p. 1648-1654, 2002.

- DEUTENER, M.A.; BAZIL, V.; VON ASMUTH, E.J. et al. Involvement of CD14 in lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor- α , IL-6 and IL-8 release by human monocytes and alveolar macrophages. *J. Immunol.*, v. 150, n. 7, p. 2885-2891, 1993.
- DURANDO, M.M.; LEUTENEGGER, C.M.; BIRKS, E.K. LPS-induced tolerance in equine peripheral blood mononuclear cells. *J. Vet. Emergency Crit. Care*, v. 15, suppl. 1, p. S1-S13, 2005.
- EBERT, S.; ZERETZKE, M.; NAU, R. et al. Microglial cells and peritoneal macrophages release activin A upon stimulation with toll-like receptor agonists. *Neurosci. Lett.*, v. 413, n. 3, p. 241-244, 2006.
- EISING, G.P.; MAO, L.; SCHMID-SCHONBEIN, G.W. et al. Effects of induced tolerance to bacterial lipopolysaccharide on myocardial infarct size in rats. *Cardiovasc. Res.*, v. 31, n. 1, p. 73-81, 1996.
- EMAU, P.; GIRI, S.N.; BRUSS, M.L. Effects of smooth and rough *Pasteurella haemolytica* lipopolysaccharides on plasma cyclic-nucleotides and free fatty acids in calves. *Vet. Microbiol.*, v. 15, n. 4, p. 279-292, 1987.
- FAN, H.; COOK, J. Molecular mechanisms of endotoxin tolerance. *Endotoxin Res.*, v. 10, n. 2, p. 71-84, 2004.
- FAURE, E.; THOMAS, L.; XU, H. et al. Bacterial lipopolysaccharide and IFN- γ induce Toll-like receptor 2 and Toll-like receptor 4 expression in human endothelial cells: role of NF- κ B activation. *J. Immunol.*, v. 166, n. 3, p. 2018-2024, 2001.
- FICKO, T.; CERNELEC, P. Real-time quantitative PCR assay for analysis of platelet glycoprotein IIIa gene expression. *Biochem. Meth.*, v. 62, n. 3, p. 241-250, 2005.
- FIORENTINO, D.F.; ZLOTNIK, A.; MOSMANN, T.R. et al. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *J. Immunol.*, v. 147, n. 11, p. 3815-3822, 1991.
- FLACH, R.; FLOHÉ, S.; LASCHINSKI, K. et al. Interleukin-10 is downregulated in mononuclear cells from endotoxin tolerant humans. *J. Endotoxin Res.*, v. 4, n. 3, p. 189-195, 1997.

- FLOHE, S.; HEINRICH, P.; SCHNEIDER, J. et al. Time course of IL-6 and TNF- α release during endotoxin-induced endotoxin tolerance in rats. *Biochem. Pharmacol.*, v. 41, n. 11, p. 1607-1614, 1991.
- FRANKENBERGER, M.; PECHUMER, H.; ZIEGLER-HEITBROCK, H.W. Interleukin-10 is upregulated in LPS tolerance. *J. Inflam.*, v. 45, n. 1, p. 56-63, 1995.
- GACHON, C.; MINGAM, A.; CHARRIER, B. Real-time PCR: what relevance to plant studies? *J. Exp. Bot.*, v. 55, n. 402, p. 1445-1454, 2004.
- GALANOS, C. ; LUDERITZ, O.; RIETSCHEL, E.T. et al. Synthetic and natural Escherichia coli free lipid A express identical endotoxic activities. *Eur. J. Biochem.*, v. 148, n. 1, p. 1-5, 1985.
- GAULDIE, J. ; NORTHEMANN, W. ; FEY, G.H. IL-6 functions as an a exocrine hormone in inflammation. Hepatocytes undergoing acute phase responses require exogenous IL-6 . *J. Immunol.*, v. 144, n. 10, p. 3804-3808, 1990.
- GRANOWITZ, E.V.; PORAT, R.; MIER, J.W. Intravenous endotoxin suppresses the cytokine response of peripheral blood mononuclear cells of healthy humans *J. Immunol.*, v. 151, n. 3, p. 1637-1645, 1993.
- GRIESMAN, S.E.; HORNICK, R.B. Mechanisms of endotoxin tolerance with special reference to man. *J. Infec. Dis.*, v. 128, s. 265-276, 1973.
- GYETKO, M.; SHOLLENBERGER, S.; SITRIN, R. Urokinase expression in mononuclear phagocytes cytokine-specific modulation by interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha. *J. Leukoc. Biol.*, v. 51, n. 3, p. 256-263, 1992.
- HADLEY, J.S.; WANG, J.E.; FOSTER, S.J. et al. Peptidoglycan of Staphylococcus aureus upregulates monocyte expression of CD14, Toll-like receptor 2 (TLR2), and TLR4 in human blood: possible implications for priming of lipopolysaccharide signaling. *Infect. Immun.*, v. 73, n. 11, p. 7613-7619, 2005.
- HADLEY, J.S.; WANG, J.E.; MICHAELS, L.C. et al. Alterations in inflammatory capacity and TLR expression on monocytes and neutrophils after cardiopulmonary bypass. *Shock*, v. 27, n. 5, p. 466-473, 2007.

- HASHIMOTO, C.; HUDSON, K.L.; ANDRESON, K.V. The Toll gene of *Drosophila* required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell*, v. 52, n. 2, p. 269-279, 1988.
- HE, W.; FONG, Y.; MARANO, M.A. et al. Tolerance to endotoxin prevents mortality in infected thermal injury: association with attenuated cytokine responses. *J. Infect. Dis.*, v. 165, n. 5, p. 859-864, 1992.
- HEEMANN, U.; SZABO, A.; HAMAR, P. et al. Lipopolysaccharide pretreatment protects from renal ischemia/reperfusion injury. Possible connection to an interleukin-6 dependent pathway. *Am. J. Pathol.*, v. 156, n. 1, p. 287-293, 2000.
- HEID, C.A.; STEVENS, J.; LIVAK, K.J. et al. Real time quantitative PCR. *Genome Res.*, v. 6, n. 10, p. 986-994, 1996.
- HENRY, M.; MOORE, J.N. Endotoxemia equina. In: BRADFORD, P.; SMITH, B. P. *Tratado de medicina interna de grandes animais*. São Paulo: Manole, 1993. p. 674-678.
- HIROHASHI, N.; MORRISON, D. Low dose lipopolysaccharide pretreatment of mouse macrophages modulates LPS-dependent interleukin-6 production *in vitro*. *Infect. Immun.*, v. 64, n. 3, p. 1011-1015, 1996.
- HODGSON, J.C. Endotoxin and mammalian host responses during experimental disease. *J. Comp. Pathol.*, v. 135, n. 4, p. 157-175, 2006.
- HOWARD, J.G.; ROWLEY, D.; WARDLAW, A.C. Investigations on the mechanism of stimulation of non-specific immunity by bacterial lipopolysaccharide. *Immunol.*, v. 1, n. 3, p. 181-203, 1958.
- HOWARD, M.; MUCHAMEL, T.; ANDRADE, S. et al. Interleukin 10 protects mice from lethal endotoxemia. *J. Exp. Med.*, v. 177, n. 4, p. 1205-1208, 1993.
- HUSE, M.; MUIR, T.W.; XU, L. et al. The TGF- β receptor activation process: an inhibitor-to substrate-binding switch. *Moll. Cell*, v. 8, n. 3, p. 671-682, 2001.
- IMAI, K.; TAKESHITA, A.; HANAZAWA, S. Transforming growth factor beta inhibits lipopolysaccharide-stimulated expression of inflammatory cytokines in mouse macrophages through downregulation of activation protein 1 and CD14 receptor expression. *Infect. Immun.*, v. 68, n. 5, p. 2418-23, 2000.

- KARP, C.L.; WYSOCKA, M.; MA, X. et al. Potent suppression of IL-12 production from monocytes and dendritic cells during endotoxin tolerance. *Eur. J. Immunol.*, v. 28, n. 10, p. 3128-3136, 1998.
- KAWASHI, K.S.; AKASHI, R.; SHIMAZU, T. et al. Mouse toll-like receptor 4MD-2 complex mediates lipopolysaccharide mimetic signal transduction by Taxol. *J. Biol. Chem.*, v. 275, n. 4, p. 2251-2254, 2000.
- KIKU, Y.; KUSANO, K.; MIYAKE, H. et al. Flow cytometric analysis of peripheral blood mononuclear cells induced by experimental endotoxemia in horse. *Internal Med.*, v. 65, n. 8, p. 857-863, 2003.
- KIM, S.J.; PARK, K.; KOELLER, D. et al. Post-transcriptional regulation of the human transforming growth factor- β 1 gene. *J. Biol. Chem.*, v. 267, n. 19, p. 13702-13707, 1992.
- KIMURA, E.T.; MATSUO, S.E.; RICARTE-FILHO, J.C. TGF- β , activina e sinalização SMAD em câncer de tireóide. *Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.*, v. 51, n. 5, p. 683-689, 2007.
- KIRSCHNING, C.J.; WESCE, H.; AYRES, T.M. et al. Human toll-like receptor-2 confers responsiveness to bacterial lipopolysaccharide. *J. Exp. Med.*, v. 188, n. 11, p. 2091-2097, 1998.
- KUESIS, B.; SPIER, S.J. Endotoxemia. In: REED, S.M.; BAYLY, W.M. *Medicina interna equina*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. p. 550-561.
- LABETA, M.O.; DURIEUX, J.J.; SPAGNOLI, G. et al. CD14 and tolerance to lipopolysaccharide: biochemical and functional analysis. *Immunol.*, v. 80, n. 3, p. 415-423, 1993.
- LEE, J.D.; KRAVCHENCKO, V.; KIRKLAND, T.N. et al. Glycosylphosphatidylinositol-anchored or integral membrane forms of CD14 mediate identical cellular responses to endotoxin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 90, n. 21, p. 9930-9934, 1993.
- LEMAITRE, B.; NICOLAS, E.; MICHAUT, L. et al. The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/ Toll/ cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell*, v. 86, n. 6, p. 973-983, 1996.

- LEMAY, L.G.; OTTERNESS, A.J.; VANDER, A.J. et al. In vivo evidence that the rise in plasma IL-6 following injection of a fever-inducing dose of LPS is mediated by IL-1 β . *Cytokines*, v. 2, n. 3, p. 199-204, 1990.
- LI, M.O.; WAN, Y.Y.; SANJABI, S. et al. Transforming growth factor- β regulation of immune responses. *Ann. Rev. Immunol.*, v. 24, n. 2, p. 99-146, 2006.
- LIEN, E.; SELLATI, T.J.; YOSHIMURA, A. et al. Toll-like receptor-2 functions as a pattern recognition receptor for diverse bacterial cell wall products. *J. Biol Chem.*, v. 274, n. 47, p. 33419-33425, 1999.
- LOHMANN, K.L.; VANDENPLAS, M.; BARTON, M. et al. Lipopolysaccharide from *Rhodobacter sphaeroides* is an agonist in equine cells. *J. Endotoxin Res.*, v. 9, n. 1, p. 33-37, 2003.
- MACKAY, R.J. Endotoxemia. In: (Ed). *Current therapy in equine medicine*, 3rd ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1992. p. 225-232.
- MACKAY, R.J.; MERRIT, A.M.; ZERTUCHE, J.M. et al. Tumor necrosis factor activity in the circulation of horses given endotoxin. *Am. J. Vet. Res.*, v. 52, n. 4, p. 533-538, 1991.
- MACKAY, R.J.; MERRITT, A.M.; ZERTUCHE, J.M. et al. Association between serum cytotoxicity and selected clinical variables in 240 horses admitted to a veterinary hospital. *Am. J. Vet. Res.*, v. 53, n. 5, p. 748-752, 1992.
- MARIE, C.; CAVAILLON, J.M.; LOSSER, M.R. Elevated levels of circulating transforming growth factor-beta 1 in patients with the sepsis syndrome. *Ann. Int. Med.*, v. 125, n. 6, p. 520-521, 1996.
- MARSIK, C.; MAYR, F.; CARDONA, F. et al. Endotoxemia modulates Toll-like receptors on leucocytes in humans. *Br. J. Haematol.*, v. 121, n. 4, p. 653-656, 2003.
- MASSAGUE, J. TGF- β signal transduction. *Annu. Rev. Biochem.*, v. 67, p. 753-791, 1998.
- MATHINSON, J.; WOLFSON, E.; STEINEMANN, S. et al. Lipopolysaccharide (LPS) recognition in macrophages. Participation of LPS-binding protein and CD14 in LPS-induced adaptation in rabbit peritoneal exudates macrophage. *J. Clin. Invest.*, v. 92, n. 4, p. 2053-2059, 1993.

- MCCALL, C.E.; GROSSO-WILMOTH, L.M.; LARUE, K., et al. Tolerance to endotoxin-induced expression of the interleukin-1 beta gene in blood neutrophils of humans with the sepsis syndrome. *J. Clin. Invest.*, v. 91, n. 3, p. 853-861, 1993.
- MEANS, T.K.; GOLENBOCK, D.T.; FENTON, M.J. The biology of Toll-like receptors. *Cytok. Growth Fact. Rev.*, v. 11, n. 3, p. 219-232, 2000.
- MEDVEDEV, A.E; HENNEKE, P.; SCHROMM, A. et al. Induction of tolerance to lipopolysaccharide and mycobacterial components in Chinese hamster ovary CD14 cells is not affected by overexpression of Toll-like receptors 2 or 4. *J. Immunol.*, v. 167, n. 4, p. 2257-2267, 2001.
- MEDVEDEV, A.E.; LENTSCHAT, A.; WAHL, L.M. et al. Dysregulation of LPS-induced Toll-like receptor 4-MyD88 complex formation and IL-1 receptor associated kinase 1 activation in endotoxin-tolerant cells. *J. Immunol.*, v. 169, n. 9, p. 5209-5216, 2002.
- MEDZHITOV, R.; PRESTON-HURLBURT, P.; JANEWAY, C.A. A human homologue of Drosophila toll protein signals activation of adaptative immunity. *Nature*, v. 338, n. 6640, p. 394-397, 1997.
- MENGOZZI, M.; FANTUZZI, G. SIRONI, M. et al. Early down regulation of TNF production by LPS tolerance in human monocytes: comparison with IL-1 β , IL-6 and IL-8. *Lymphok. Cytok. Res.*, v. 12, n. 4, p. 231-236, 1993.
- MICHALOPOULOS, G.K.; DEFRANCES, M.C. Liver regeneration. *Science*, v. 276, n. 5309, p. 60-66, 1997.
- MOORE, J.N. Endotoxemia: definition, characterization, and host defenses. *Compend. Cont. Educ.*, v. 3, p. 355-359, 1981.
- MOORE, J.N. Introduction to endotoxemia. In: AMERICAN ASSOCIATION EQUINE PRACTICE, 41., 1995, Lexington. *Proceedings...*Lexington: AAEP, 1995.
- MOORE, J.N. Endotoxemia and septicemia as causes of shock. In: COLAHAN, P.T.; MAYHEW, I.G.; MERRITT, A.M. et al. *Equine medicine and surgery*. 5.ed. Missouri: Mosby, 1999, p. 218-224.
- MOORE, J.N. A Perspective on endotoxemia. *AAEP Proceedings*, v. 47, p. 61-74, 2001.

- MOORE, J.N.; MORRIS, D.D. Endotoxemia and septicemia in horses: experimental and clinical correlates. *J. Am. Med. Assoc.*, v. 200, n. 12, p. 361-374, 1992.
- MORRESEY, P.R. Therapeutic intervention strategies in endotoxemia. *Compend. Contin. Educ. Pract. Vet.*, v. 23, n.10, p. 925-930, 2001.
- MORRIS, D.D.; MORRE, J.N. The effect of immunity to core lipopolysaccharides (LPS) on the production of thromboxane and prostacyclin by equine peritoneal macrophages. *Cornell Vet.*, v. 79, n. 3, p. 231-247, 1989.
- MORRIS, D. ; MOORE, J. ; CROWE, N. Serum tumor necrosis factor activity in horses with colic attributable to gastrointestinal tract disease. *Am. J. Vet. Res.*, v. 52, n. 10, p. 1565-1569, 1991.
- MORRIS, D. ; MOORE, J. ; CROWE, N. et al. Effect of experimentally induced endotoxemia on serum interleukin-6 activity in horses. *Am. J. Vet. Res.*, v. 53, n. 5, p. 753-756, 1992.
- MORRISON, D.C.; DINARELLO, C.A. ; MUNFORD, R.S. et al. Current status of bacterial endotoxins. *A.S.M. News*, v. 60, p. 479-484, 1994.
- MUNGER, J.S.; HUANG, X.; KAWAKATSU, H. et al. The integrin $\alpha\beta_6$ binds and activates latent TGF- β_1 : a mechanism for regulating pulmonary inflammation and fibrosis. *Cell*, v. 96, n. 3, p. 319-328, 1999.
- NOMURA, F.; AKASHI, S.; SAKAO, Y. et al. Cutting edge: endotoxin tolerance in mouse peritoneal macrophages correlates with down-regulation of surface toll-like receptor 4 expression. *J. Immunol.*, v. 164, n. 7, p. 3476-3479, 2000.
- NUNES, I.; SHAPIRO, R.L.; RIFKIN, D.B. Characterization of latent TGF- β activation by murine peritoneal macrophages. *J. Immunol.*, v. 155, p. 1450-1459, 1995.
- OLSON, N.C.; HELLYER, P.W.; DODAM, J.R. Mediators and vascular effects in response to endotoxin. *Br. Vet. J.*, v. 151, n. 5, p. 489-522, 1995.
- OPP, M.; OBAL, F.; CADY, A.B. Interleukin-6 is pyrogenic but not somnogenic. *Physiol. Behav.*, v. 45, n. 5, p. 1069-1072, 1989.

- PARVIAINEN, A.K.; BARTON, M.H.; NORTON, N.N. Evaluation of polymixin B in an *ex vivo* model of endotoxemia in horses. *Am. J. Vet. Res.*, v. 62, n. 1, p. 72-76, 2001.
- PEIRÓ, J.R.; MENDES, L.C.; STOKES, AM. et al. Evaluation of the modulation of Toll-like receptors using *ex vivo* and *in vivo* models of endotoxemia in horses. In: 9th International Equine Colic Research Symposium, v. 9, p. 170-171, 2008.
- POLTORAK, A.; HE, X.; SMIRNOVA, I. et al. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57B1/10 ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science*, v. 282, n. 5396, p. 2085-2088, 1998.
- RANDOW, F.; SRYBE, U.; MEISEL, C. et al. Mechanisms of endotoxin desensitization: involvement of interleukin 10 and transforming growth factor beta. *J. Exp. Med.*, v. 181, n. 5, p. 1887-1892, 1995.
- ROBERTS, M.C. Endotoxemia and inflammatory mediators in equine colitis. *Proc. Annu. Meet. AAEP.*, v. 41, p. 107-111, 1995.
- ROSSIGNOL, D.P.; LYNN, M. TLR4 antagonists for endotoxemia and beyond. *Curr. Opin. Investig. Drugs*, v. 6, n. 5, p. 496-502, 2005.
- SATO, S.; NOMURA, F.; KAWAI, T. et al. Synergy and cross-tolerance between Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR 4 mediated signaling pathways. *J. Immunol.*, v. 165, n. 12, p. 7096-7101, 2000.
- SCHAAD, N.W.; FREDERICK, R.D. Real-time PCR and its application for rapid plant disease diagnostics. *J. Plant. Pathol.*, v. 24, p. 250-258, 2002.
- SEATTER, S.; BENNET, T.; LI, M. et al. Macrophage endotoxin tolerance. Tumor necrosis factor and interleukin-1 regulation by lipopolysaccharide pretreatment. *Arch. Surg*, v. 129, n. 12, p. 1263-1270, 1994.
- SEETHANATHAN, P.; BOTTOMS, G.D; SCHAFER, K. Characterization of release of tumor necrosis factor, interleukin-1, and superoxide anion from equine white blood cells in response to endotoxin. *Am. J. Vet. Res.*, v. 51, n. 8, p. 1221-1225, 1990.
- SHIMAZU, R.; AKASHI, S.; OGATA, H., et al. MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on toll-like receptor 4. *J. Exp. Med.*, v. 189, n. 11, p. 1777-1782, 1999.

- SMILEY, S.T.; KING, J.A.; HANCOCK, W.W. Fibrinogen stimulates macrophage chemokine secretion through toll-like receptor 4. *J. Immunol.*, v. 167, n. 5, p. 2887-2894, 2001.
- SMITH, C.L.; DOWLING, B.A.; DART, A.J. Recent advances in equine abdominal surgery. *Vet. J.*, v.170, n.1, p. 41-51, 2005.
- STELTER, F. Structure/function relationships of CD14. *Chem. Immunol.*, v. 74, p. 25-41, 2000.
- TAKASUKA, N.; TOKUNAGA, T.; AKAGAWA, K. Preexposure of macrophage to low doses of lipopolysaccharide inhibits the expression of tumor necrosis factor- α mRNA but not of IL-1 β mRNA. *J. Immunol.*, v. 146, n. 11, p. 3824-3830, 1991.
- TAKEDA, K.; KAISHO, T.; AKIRA, S. Toll-like receptor. *Ann. Rev. Immunol.*, v. 21, n. 2, p. 335-350, 2003.
- TAKEUCHI, O.; AKIRA S. Toll-like receptors; their physiological role and signal transduction system. *Int. Immunopharmacol.*, v. 1, n. 4, p. 625-635, 2001.
- TURNER, M.; CHANTRY, D.; FELDMANN, M. Transforming growth factor beta induces the production of interleukin 6 by human peripheral blood mononuclear cells. *Cytokine*, v. 2, n. 3, p. 211-216, 1990.
- ULEVITCH, R.J. New therapeutic targets revealed through investigations of innate immunity. *Crit. Care Med.*, v. 29, Suppl. p. S8-S12, 2001.
- VAN DER POLL, T.; COYLE, S.M.; MOLDAWER, L.L. et al. Changes in endotoxin-induced production by whole blood after *in vivo* exposure of normal humans to endotoxin. *J. Infect. Dis.*, v. 174, n. 6, p. 1356-1360, 1996.
- VAN EPPS, H.L. Ignoring endotoxin. *J. Exp. Med.*, v. 15, n. 1137, p. 203-205, 2006.
- VAREDI, M.; JESCHKE, M.G.; ENGLANDER, E.W. et al. Serum TGF-beta in thermally injured rats. *Shock*, v. 16, n. 5, p. 380-382, 2001.
- VARMA, T. K.; TOLIVER-KINSKY, T.E.; LIN, C.Y. et al. Cellular mechanisms that cause suppressed gamma interferon secretion in endotoxin-tolerant mice. *Infect. Immun.*, v. 69, n. 9, p. 5249-5263, 2001.
- XIONG, J.; WANG, Y.; ZHU, Z. et al. Expression and significance of toll-like receptor 2, 4 of peripheral blood mononuclear cells in acute abdomen patients

- associated with systemic inflammatory response syndrome. *J. Huazhong Univ. Sci. Technol.*, v. 26, n. 5, p. 570–572, 2006.
- WANG, J.E.; JORGENSEN, P.F.; ALMLOF, M. et al. Peptidoglycan and lipoteichoic acid from *Staphylococcus aureus* induce tumor necrosis factor alpha, interleukin 6 (IL-6), and IL-10 production in both T cells and monocytes in a human whole blood model. *Infect. Immun.*, v. 68, n. 7, p. 3965-3970, 2000.
- WANG, J.E.; WARRIS, A.; ELLINGSEN, A., et al. Involvement of CD14 and Toll-like receptors in activation of human monocytes by *Aspergillus fumigatus* hyphae. *Infect. Immunity*, v. 69, n. 4, p. 2402-2406, 2001.
- WANG, T.; BROWN, M.J. mRNA quantification by real time Taqman polymerase chain reaction: validation and comparison with RNase protection. *Anal Biochem.*, v. 269, n. 1, p. 198-201, 1999.
- WAKABAYASHI, G.; CANNON, J.; GELFAND, J. et al. Altered interleukin-1 and tumor necrosis factor production and secretion during pyrogenic tolerance to LPS in rabbits. *Am. J. Physiol.*, v. 267, n. 3, p. 329-336, 1994.
- WHARTON, D.R.A.; CREECH, H.J. Further studies on the immunological properties of polysaccharides from *Serratia marcescens* (*Bacillus prodigiosus*). nature of the antigenic action and the antibody response in mice. *J. Immunol.*, v. 62, n. 2, p. 135-153, 1949.
- WITTEBOLE, X.; COYLE, S.M.; KUMAR, A. et al. Expression of tumor necrosis factor receptor and Toll-like receptor 2 and 4 on peripheral blood leucocytes of human volunteers after endotoxin challenge: a comparison of flow cytometric light scatter and immunofluorescence gating. *Clin. Exp. Immunol.*, v. 141, n. 1, p. 99–106, 2005.
- WRIGHT, S.D.; RAMOS, R.A.; TOBIAS, P.S. et al. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science*, v. 249, n. 4975, p. 1431-1433, 1990.
- WYSOCKA, M.; ROBERTSON, S.; RIEMANN, H. et al. IL-12 suppression during experimental endotoxin tolerance: dendritic cell loss and macrophage hyporesponsiveness. *J. Immunol.*, v. 166, n. 12, p. 7504–7513, 2001.

- YAGUB, S.; SOLHAUG, V.; VANG, T. et al. A human whole blood model of LPS-mediated suppression of T cell activation. *Med. Sci. Monit.* v. 9, n. 3, p. 120-126, 2003.
- YANG, R.B.; MARK, M.R.; GRAY, A. Toll-like receptor-2 mediates lipopolysaccharide-induced cellular signaling. *Nature*, v. 395, n. 6699, p. 284-288, 1998.
- YEO, S.J.; YOON, J.G.; HONG, S.C. et al. CpG DNA induces self and cross-hyporesponsiveness of RAW264.7 cells in response to CpG DNA and lipopolysaccharide: alterations in IL-1 receptor-associated kinase expression. *J. Immunol.*, v. 170, n. 2, p. 1052-1061, 2003.
- ZHONG, B.; YING MA, H.; YANG, Q. et al. Decrease in toll-like receptors 2 and 4 in the spleen of mouse with endotoxic tolerance. *Inflamm. Res.*, v. 57, n. 6, p. 252-259, 2008.
- ZIEGLER-HEITBROCK, H.; BLUMENSTEIN, M.; KAFFERLEIN, E. et al. *In vitro* desensitization to lipopolysaccharide suppresses tumor necrosis factor, interleukin-1 and interleukin-6 gene expression in a similar fashion. *Immunol.*, v. 75, n. 2, p. 264-268, 1992.
- ZIEGLER-HEITBROCK, H.W.; WEDEL, A.; SCHRAUT, W. et al. Tolerance to lipopolysaccharide involves mobilization of nuclear factor kappa B with predominance of p50 homodimers. *J. Biol Chem.*, v. 269, n. 95, p. 17001-17004, 1994.

CAPÍTULO 2 – AVALIAÇÃO *EX VIVO* DA EXPRESSÃO DE TLR-2 E TLR-4 EM LEUCÓCITOS DE EQUINOS E SUA RELAÇÃO COM A TOLERÂNCIA À ENDOTOXINA

RESUMO

O fenômeno de tolerância à endotoxina tem se mostrado presente em várias espécies, sendo necessária uma melhor compreensão deste processo em equinos. O objetivo deste estudo foi investigar os possíveis efeitos supressores do estímulo secundário de LPS num modelo *ex vivo*, através da quantificação da produção de citocinas inflamatórias como o TNF- α , IL-1, IL-6, IL-10 e TGF- β , assim como identificar o papel dos receptores Toll-like-2 e -4 neste processo. Foram utilizados seis equinos, da raça Quarto-de-Milha, de ambos os sexos, média de oito anos de idade, sem histórico de doença gastrointestinal ou de cirurgia abdominal. As amostras de sangue total foram incubadas durante 24 horas a 37° C com 5% de CO₂, na presença (1, 10 ou 100 ng/mL) ou ausência de LPS (0 ng/mL). Após 4 horas, as amostras foram reestimuladas com LPS em diferentes concentrações. Alíquotas de 100 μ L de sangue foram coletadas nos momentos 0, 2, 4, 8 e 24 horas após o estímulo primário de LPS. A expressão dos genes das citocinas TNF- α , IL-1, IL-6, IL-10 e TGF- β foi quantificada por PCR em tempo real e a expressão dos receptores Toll-like-2 e -4 foi verificada através de citometria de fluxo. Observou-se uma diminuição das citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1, IL-6) e aumento da citocina anti-inflamatória IL-10 após o estímulo secundário de LPS, nas concentrações 1, 10 e 100 ng/mL de LPS. Não houve expressão gênica do TGF- β . No entanto, houve um aumento da expressão dos receptores Toll-like-2 e -4 de maneira significativa nos momentos 8 e 24 horas após o segundo estímulo de LPS, nas três concentrações de LPS (1, 10 e 100 ng/mL). Os resultados observados sugerem que a tolerância à endotoxina não esteja relacionada com a diminuição da expressão do TLR-2 e TLR-4 em equinos.

Palavras-chave: citometria de fluxo, endotoxemia, lipopolissacarídeo, qRT-PCR.

INTRODUÇÃO

A endotoxemia é um distúrbio sistêmico que se origina da resposta do hospedeiro a um componente da membrana celular das bactérias Gram-negativas, o lipopolissacarídeo (LPS) ou endotoxina (KUESIS; SPIER, 1998). O lúmen intestinal do equino contém normalmente uma grande quantidade de endotoxinas, porém distúrbios gastrintestinais reduzem a eficácia da barreira mucosa, facilitando a passagem destas para a corrente circulatória (COLLATOS, 1995; HENRY; MOORE, 1993; MOORE, 1981). Trata-se de uma das principais causas de morbidade e mortalidade nos equinos (MORRIS, 1991).

A endotoxina é liberada quando ocorre replicação bacteriana rápida, lise ou morte do microorganismo (OLSON et al., 1995), induzindo assim a síntese de muitos mediadores inflamatórios pelas células do hospedeiro os quais, por sua vez, são responsáveis por eventos patológicos da endotoxemia (BARTON et al., 1996; MOORE, 1995; MORRIS; MORRE 1989; MORRISON et al., 1994; ROBERTS, 1995; SEETHANATHAN et al., 1990).

As alterações clínicas mais comuns em equinos endotoxêmicos incluem alterações na coloração das membranas mucosas, aparecimento de linha tóxica ao redor dos dentes, aumento do tempo de preenchimento capilar, elevação das frequências cardíaca e respiratória, diminuição dos borborigmos intestinais, febre, hemoconcentração e trombocitopenia (MOORE, 2001).

Esses sinais são desencadeados principalmente pela presença de mediadores inflamatórios como as citocinas, que são proteínas reguladoras secretadas por macrófagos e exercem papel-chave na regulação da imunidade (TIZARD, 1998). Esses mensageiros são responsáveis por induzir múltiplas atividades nas células hospedeiras locais ou distantes, modulando processos inflamatórios e imunológicos do hospedeiro. Os subtipos que demonstraram ser mais operantes na endotoxemia incluem o fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e as interleucinas (IL)-1 e -6 (HENRY; MOORE, 1993), assim como a IL-10 e o

TGF- β , que têm potencial anti-inflamatório (FIORENTINO et al., 1991; HORWARD et al., 1993; VOGEL; HOGAN, 1990).

A atividade da endotoxina é um processo mediado principalmente pelo receptor CD14, que devido à ausência de um domínio intracelular necessita ligar-se a outros receptores (DELUDE et al., 1995; INGALLS et al., 1999; ULEVITCH; TOBIAS, 1994). Desta forma, a descoberta dos receptores Toll-like (TLR) (BAKER et al., 1997; HASHIMOTO et al., 1988; MEDZITHOV et al., 1997) teve grande importância, uma vez que são proteínas responsáveis por realizar a comunicação entre os aspectos externo e interno da célula (WITTEBOLE et al., 2005). Estas proteínas transmembranas têm um papel essencial no reconhecimento de patógenos, sendo que a sinalização via Toll-like é um fator importante na defesa do hospedeiro (UNDERHILL; OZINSKY, 2002).

Dois membros da família dos receptores Toll-like, o TLR-2 e -4 são responsáveis pela sinalização celular estimulada via LPS (CHOW et al., 1999; KIRSCHNING et al., 1998; QURESHI et al., 1999; YANG et al., 1998), e a expressão destes é considerada um dos mecanismos controladores das respostas das células do sistema imune frente a bactérias (MARSIK et al., 2003). Sabe-se que o receptor Toll-like-2 tem atividade em uma variedade de componentes microbianos (TAKEDA et al., 2003), e o receptor Toll-like-4 é ativado pela ação das endotoxinas, controlando o principal sistema sinalizador de resposta à bactérias Gram-negativas (EBERT et al., 2006; ROSSIGNOL; LYNN, 2005). Tais receptores são expressos nos leucócitos e outras células (DE LA CALLE et al., 2002), e outros pesquisadores tentam demonstrar que ambos os receptores podem reconhecer o LPS de forma sinérgica (BUTTENSCHOEN et al., 2008; ZHONG et al., 2008).

Alguns estudos demonstraram que a expressão desses receptores está envolvida no fenômeno conhecido como tolerância à endotoxina (ADIB-CONQUY; CAVAILLON, 2002; ZHONG et al., 2008), caracterizado em organismos que tiveram uma segunda exposição ao LPS após algumas horas do estímulo primário, com uma consequente diminuição na resposta inflamatória e até mesmo das manifestações clínicas. Esta tolerância pode ser observada dentro de horas

após uma exposição secundária ao LPS envolvendo a participação de mediadores como TNF- α , IL-1, IL-6, IL-10 e o TGF- β (GRANOWITZ et al., 1993).

Na espécie equina, o primeiro relato de tolerância *in vivo* demonstrou uma diminuição da temperatura retal e na produção do TNF- α (ALLEN et al., 1996); outro estudo mais recente revelou uma supressão na produção das citocinas inflamatórias (TNF- α , IL-1, IL-4, IL-6 e IL-10) em um modelo *ex vivo* de tolerância à endotoxina (DURANDO et al., 2005). O envolvimento dos receptores Toll-like poderia ser uma possível explicação para o mecanismo celular de tal fenômeno (FAN; COOK, 2004).

Portanto, os objetivos desse estudo incluem verificar a modulação da expressão das citocinas inflamatórias (TNF- α , IL-1 e IL-6) e anti-inflamatórias (IL-10 e TGF- β) durante a tolerância à endotoxina, utilizando um modelo *ex vivo* com sangue total em equinos; assim como avaliar alterações na expressão dos receptores protéicos Toll-like-2 e -4 em leucócitos do sangue periférico, desvendando assim o mecanismo celular desse fenômeno.

MATERIAL E MÉTODO

Animais – Foram utilizados 6 equinos (5 machos e 1 fêmea), com idade média de 8 anos, peso médio de 450 kg, pertencentes à raça Quarto-de-Milha. Os animais foram avaliados clinicamente, vermifugados^a e somente equinos com valores normais de hemograma e sem histórico anterior de doença gastrointestinal ou de cirurgia abdominal foram incluídos neste estudo. O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética e Bem-Estar da Unesp-Araçatuba (2008/007550).

^a Eqvalan[®] Pasta, Merial, Campinas, SP, Brasil

Western blotting – A técnica foi realizada segundo Monick et al. (2003), a fim de validar o uso de anticorpo humano para realizar citometria de fluxo neste estudo. As amostras (10 mL) de sangue humano e equino foram colhidas em tubos com heparina sódica^b. Realizou-se a lise das hemácias com um tampão contendo 5M NaCl e 1M Tris-HCl (pH 7,4), seguido da adição de um tablete de inibidor da protease^c, a cada 10 mL de tampão de lise. As proteínas foram separadas por eletroforese (SDS-PAGE a 10%), por 3 horas, a 80 mA. Em seguida, realizou-se a transferência para uma membrana de nitrocelulose^d por 2 horas. O bloqueio de ligações inespecíficas foi feito com PBST (0,01 M e pH 7,2), acrescido de 5% de leite desnatado^e, incubado por 3 horas, à temperatura ambiente. Após três lavagens com PBST (0,01 M e pH 7,2), a membrana foi incubada com anticorpo primário monoclonal anti-Toll-like-2^f (1 : 500) ou -4^g (1 : 500) humano em PBST, “overnight”, a 4° C. A membrana foi lavada três vezes e incubada por 1 hora com um anticorpo secundário conjugado à peroxidase^h (1 : 5000). Após as últimas três lavagens, as bandas imunorreativas foram reveladas utilizando o reagente ECL Plusⁱ, seguindo as instruções do fabricante.

Modelo ex vivo – As amostras de sangue dos equinos foram colhidas por venopunção jugular em tubos contendo EDTA^j e incubadas durante 24 horas na presença ou ausência de LPS. As amostras do grupo controle (14,5 mL) foram estimuladas com 500 µL de tampão PBS (0,01 M e pH 7,2), enquanto que as

^b Tubos com heparina sódica, BD, Vacutainer® 10 mL, Franklin Lakes, EUA.

^c Protease Inhibitor Cocktail tablets, Roche Applied Science Inc., Indianapolis, IN, EUA.

^d Nitrocellulose membrane, Bio-rad Laboratories, Richmon, CA, EUA.

^e Leite em pó Molico®, Nestlé Brasil Ltda. Fábrica de laticínios, Araçatuba, SP, Brasil.

^f Affinity purified anti-human toll-like receptor-2 (CD282, TLR2), eBioscience, San Diego, CA, EUA

^g Affinity purified anti-human toll-like receptor-4 (CD284, TLR4), eBioscience, San Diego, CA, EUA

^h Anticorpo anti-mouse IgG1 com peroxidase, eBioscience, San Diego, CA, EUA

ⁱ ECL Plus, Amersham GE Healthcare Life Sciences, Pittsburgh, PA, EUA.

^j Tubos com EDTA K3, BD Vacutainer® 4,5 mL, Plymouth, Devon, Reino Unido.

amostras de sangue total do grupo experimental foram estimuladas com 500 µL de uma solução contendo 1, 10 ou 100 ng/mL de LPS derivado de *E. coli* (O55:B5)^k. As amostras permaneceram em uma rotisserie^l a 37° C, com 5% de CO₂ por 24 horas. Após 4 horas do início da incubação, as amostras foram reestimuladas com LPS (1, 10 ou 100 ng/mL) de *E. coli*^k ou tampão de PBS (0,01 M e pH 7,2) (Figura 1).

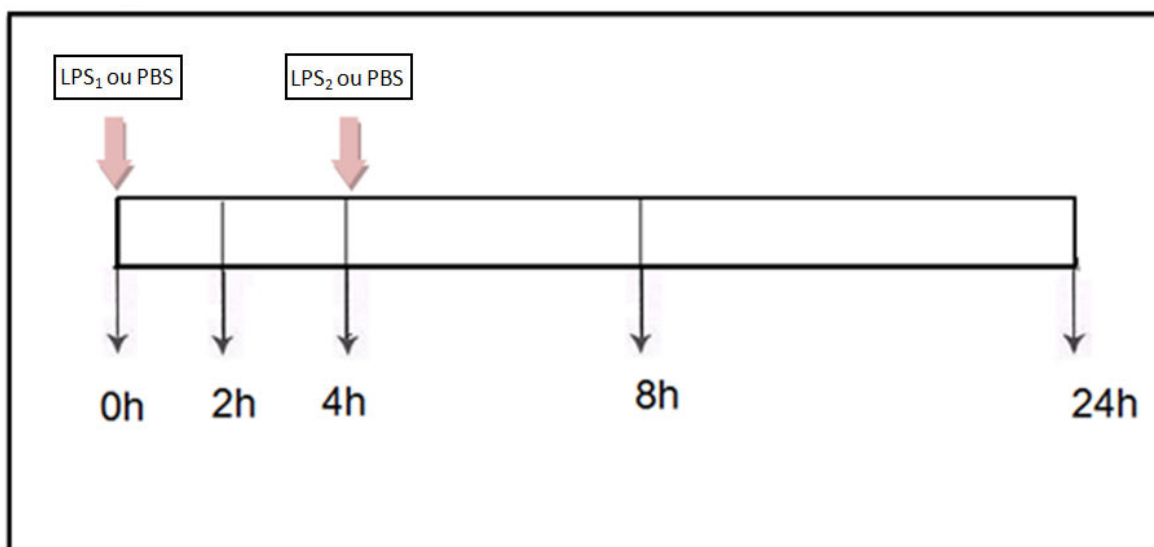


FIGURA 1 - Delineamento experimental. LPS₁ indica o primeiro estímulo com lipopolissacarídeo nas diferentes concentrações (1,10 ou 100 ng/mL ou tampão PBS (0 ng/mL); LPS₂, o estímulo secundário com lipopolissacarídeo (1, 10 ou 100 ng/mL) ou tampão PBS (0 ng/mL). Os momentos da colheita (0, 2, 4, 8 e 24 horas) das amostras de sangue para a citometria e qRT-PCR estão também indicados na figura.

Expressão dos receptores Toll-like -2 e -4 – A expressão destes receptores foi quantificada por citometria de fluxo^m. Amostras de sangue total dos equinos (100 µL) foram transferidas para tubos de poliestirenoⁿ e incubadas durante 30 minutos em temperatura ambiente, com 30 µL dos seguintes anticorpos: o anticorpo anti-

^k *E. coli* (O55:B5), Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA.

^l Labquake rotisserie, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, EUA.

^m Guava EasyCyte™ Mini, GE Healthcare, Hayward, CA, EUA.

ⁿ Tubos Falcon poliestireno (15 mL), Becton and Dickinson, Plymouth, Devon, Reino Unido.

receptor Toll-like-2 humano [TLR-2; isothiocionato de fluoresceína (FITC)]^o, o anticorpo anti-receptor Toll-like-4 humano [TLR-4; ficoeritrina (PE)]^p, e os isotipos controles^q. Para lisar as hemácias foram adicionados 3 mL de tampão de NH₄Cl^r. Os tubos foram invertidos, gentilmente, várias vezes, e permaneceram em temperatura ambiente por 10 minutos. Em seguida as amostras foram submetidas à centrifugação em 1000 rpm durante 8 minutos a 25° C. O sobrenadante foi descartado e as células lavadas com 3 mL de tampão PBS (0,01 M e pH 7,2), seguido de agitação mecânica^s. Após centrifugação a 1.000 rpm durante 8 minutos a 25° C, foi realizado descarte do sobrenadante. O pelete foi agitado em seu líquido de lavagem residual e ressuspendido em 300 µL de paraformaldeído a 2%. As amostras foram armazenadas a 4° C, protegidas da luz, até o momento da análise. A aquisição foi realizada em citômetro^m, utilizando 10.000 eventos por amostra. Para separação das populações de leucócitos foi realizada a análise por tamanho e granulosidade e os dados foram avaliados pelo software FACSDiva v.6.1.1^t, onde foram criados portões para definir as populações de neutrófilos (R1), linfócitos (R2) e monócitos (R3) (Figura 2), considerando-se a porcentagem de células duplamente marcadas. Os valores foram corrigidos para ligações inespecíficas subtraindo-se os valores das amostras com isotipos controles.

^oFluorescein isothiocyanate (FITC) anti-human Toll-like receptor 2 (CD282, TLR2, TLR-2), eBioscience, San Diego, CA, EUA.

^p Phicoerytrin (PE) anti-human Toll-like receptor 4 (TLR4, TLR-4), eBioscience, San Diego, CA, EUA.

^q IgG2a Isotype Control, eBioscience, San Diego, CA, EUA.

^r 1X RBC Lysis buffer, eBioscience, San Diego, CA, EUA.

^s Vortex Phoenix, AP-56, Luferco, Araraquara, SP, Brasil.

^t FACSDiva™ software, versão 6.1.1, BD Biosciences, San Jose, CA, EUA.

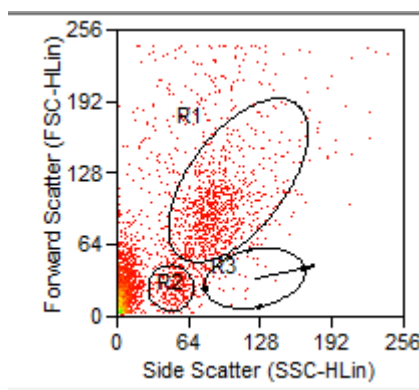


FIGURA 2 - Identificação das populações de leucócitos: neutrófilos (R1), linfócitos (R2) e monócitos (R3) durante a citometria de fluxo, utilizando granulosidade (side scatter) versus tamanho (forward scatter) das células.

Isolamento de leucócitos para obtenção de RNA – De cada amostra incubada com e sem LPS, 500 μ L de sangue total foram transferidos para tubos de microcentrífuga (2 mL) para o isolamento total do RNA com “kit” comercial^u de acordo com as instruções do fabricante, nos momentos indicados. Em seguida, foram adicionados 1,3 mL de RNA^v para estabilizar o RNA. Estas amostras foram armazenadas a -20° C até o momento da extração do RNA.

Foram então separadas as fases aquosa e orgânica. A fase aquosa foi utilizada para a purificação final do RNA. Realizou-se o tratamento com DNase para se remover o DNA genômico no RNA eluído.

Transcrição reversa e Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa em tempo real (qPCR) – O cDNA sintetizado a partir do RNA recuperado dos leucócitos foi submetido à análise pela RT-PCR para se verificar a expressão dos seguintes genes: TNF- α , IL-1, IL-6, IL-10 e TGF- β utilizando-se primers e probes específicos. Estes primers e probes foram desenhados através de software

^u RiboPure®-Blood, número de catálogo AM 1928, Ambion, Austin, TX, EUA

^v RNA^v, número de catálogo AM7021, Ambion, Austin, TX, EUA

comercial^w e sintetizados por empresas comerciais. As sequências de nucleotídeos que foram usadas para o desenho dos primers e probes foram obtidas através do GenBank com base na espécie equina, e estão representados na Tabela 1.

As reações de PCR continham 20 nM de cada primer, 10 nM de cada probe, PCR Mastermix comercial^x e 2,5 µL de cDNA da amostra em um volume final de 25 µL. Curvas-padrão relativas foram construídas usando-se onze diluições seriadas do RNA total. Estas diluições sofreram transcrição reversa como descrito anteriormente para o cDNA. O cDNA preparado a partir do RNA não diluído recebeu o valor relativo de 1024. A primeira diluição 1:1 recebeu o valor relativo de 512, a segunda diluição 1:1 recebeu o valor relativo 256, etc, até à diluição final (11^a) a qual foi designado o valor relativo de 1.

As amostras foram colocadas, em duplicata, em placas de 96 poços e amplificadas em termociclador^y. As condições de amplificação foram 2 minutos a 50° C, 10 minutos a 95° C, 40 ciclos de 15 segundos a 95° C e 60 segundos a 60° C. A quantificação relativa do alvo foi feita usando-se o sinal para βGus, um gene “housekeeping”, em cada amostra. Os dados foram analisados pelo método $\Delta\Delta C_T$: o valor de cada amostra foi normalizado dividindo-o pelo valor para βGus correspondente (valor da amostra/valor βGus). A quantificação da transcrição é reportada como n-log (fold change) em relação ao cDNA calibrador (transcrição das amostras não tratadas).

^w Primer Express, Applied-Biosystem, Foster City, CA, EUA

^x Taqman[®] Universal PCR Mastermix, Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA

^y iQ 5, Bio-rad, Hercules, CA, EUA

Tabela 1 – Sequências de primers e probes utilizadas na qRT-PCR

Gene	Senso (5' - 3')	Anti-senso (5' - 3')	Probe (5' - 3') [*]
β gus	gacatccgaggaagggct	agccaacgaagcaggttga	gtccttcaccagcagtgccagctct
TNF- α	gccagacactcgatcatcttc	catttgacgcccactca	cccatgtgtagcaaaccaccaagc
IL-1 β	gcagccatggcagcagta	attgccgctgcagtaagtca	ccgacaccagtgacatg
IL-6	agcacattaagtacatcctcggc	ccagattggaagcatccgtc	atctctgccctgaaaaatgagatgtgtaacaattt
IL-10	gcacgtgaactccctggg	aaatcgatgacagcgccg	agcctcactcggagggtcttcagctttt
TGF- β	ccgagctctggacaccaacta	tgccgtacgcagcagttct	tgttccagctccacagag

^{*} Probes são marcadas com molécula repórter 6-FAM (6-carboxilfluoresceína) na posição 5' e quencher BHQ-1 (black-hole quencher) na posição 3'.

Análise estatística - Os dados obtidos na citometria de fluxo foram submetidos ao estudo das distribuições das variáveis quanto à normalidade (teste Kolmogorov-Smirnov). Foi utilizado o teste de Friedman para comparar os grupos, seguido do teste de Dunn para comparações múltiplas das médias, considerando-se significativos valores com $p < 0,05$. As análises estatísticas foram efetuadas empregando-se um programa computacional^z.

^z GraphPad Instat 3, GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA.

RESULTADO

Reação cruzada – Através do Western blotting foi possível avaliar a habilidade das células leucocitárias de equinos em reagir com o anticorpo humano para os receptores Toll-like-2 e -4, assim como a expressão constitutiva de tais receptores (Figura 3).

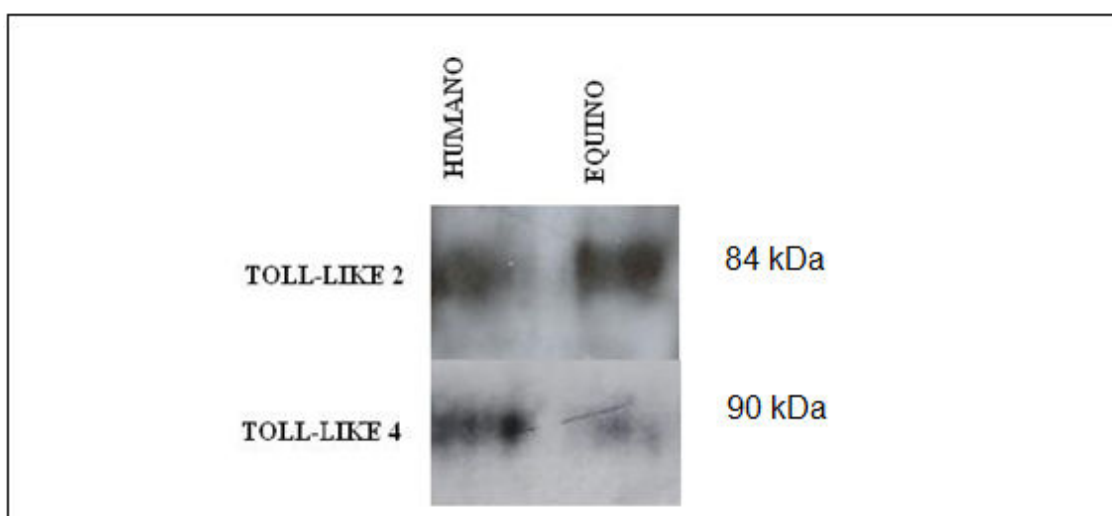


FIGURA 3 - O Western blotting demonstrou a reação cruzada dos anticorpos monoclonais específicos anti-TLR-2 e anti-TLR-4 humanos com as diferentes células de equino. As bandas comparativas das proteínas TLR-2 e TLR-4 de humano e equino foram reveladas pelo reagente ECL plus¹.

Expressão dos receptores Toll-like – Os valores referentes à expressão percentual dos receptores Toll-like-2 e -4 nos linfócitos, monócitos e neutrófilos para o animal 3 (melhor representativo) estão representados nas Figuras 4, 5 e 6, respectivamente.

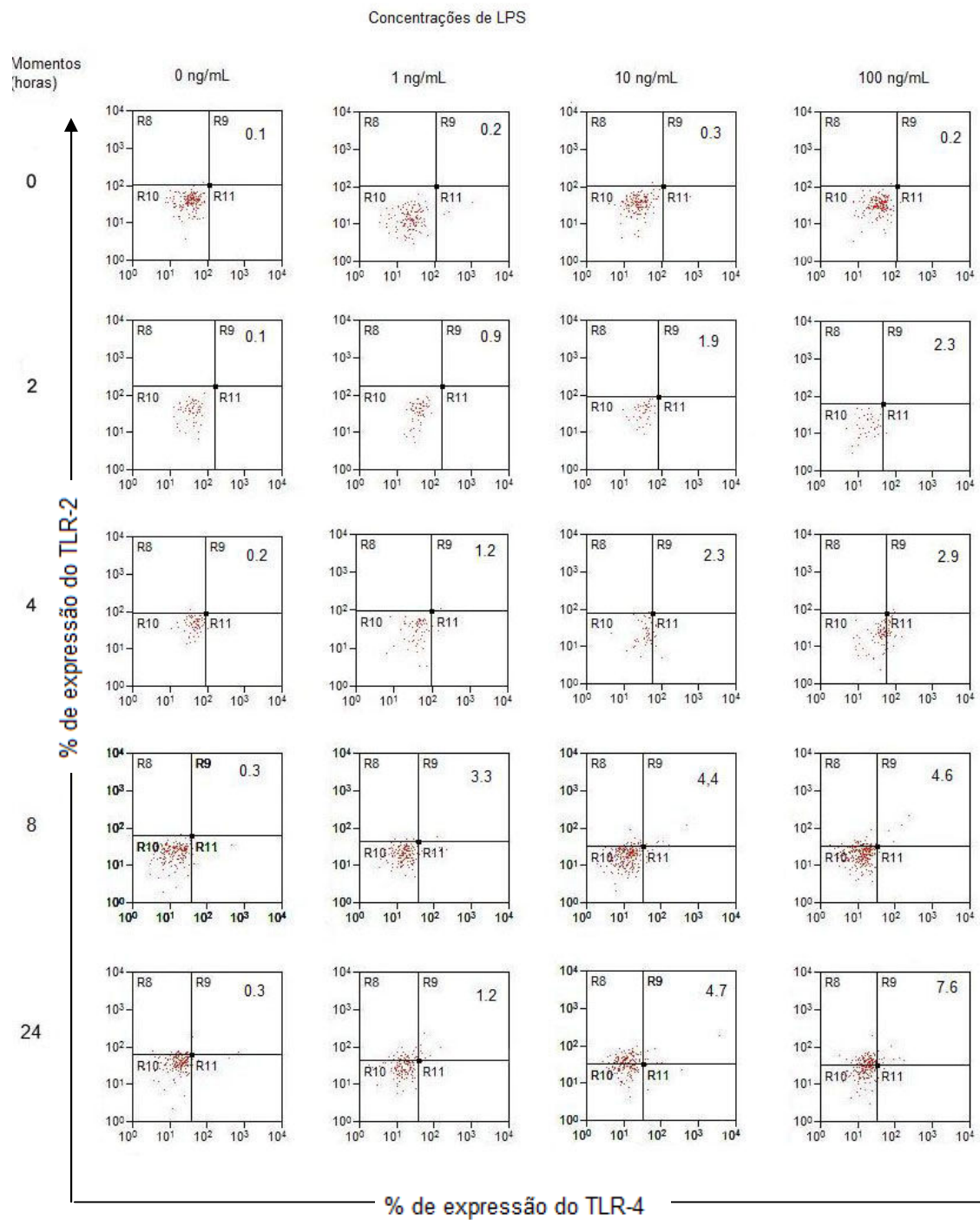


FIGURA 4 - Valores individuais da porcentagem de expressão de receptores Toll-like-2 e -4 em linfócitos, mensurados por citometria de fluxo.

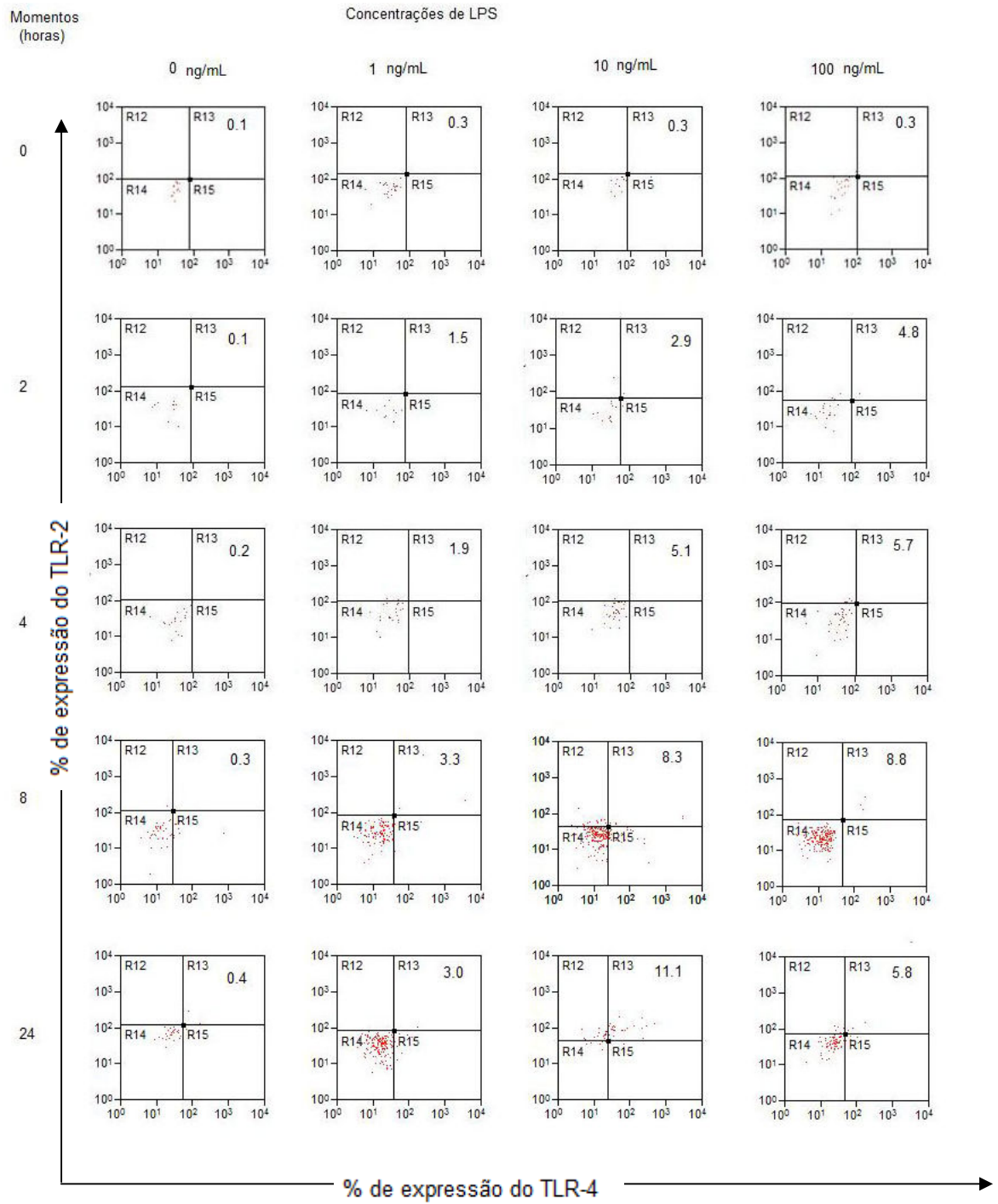


FIGURA 5 - Valores individuais da porcentagem de expressão de receptores Toll-like-2 e -4 em monócitos, mensurados por citometria de fluxo.

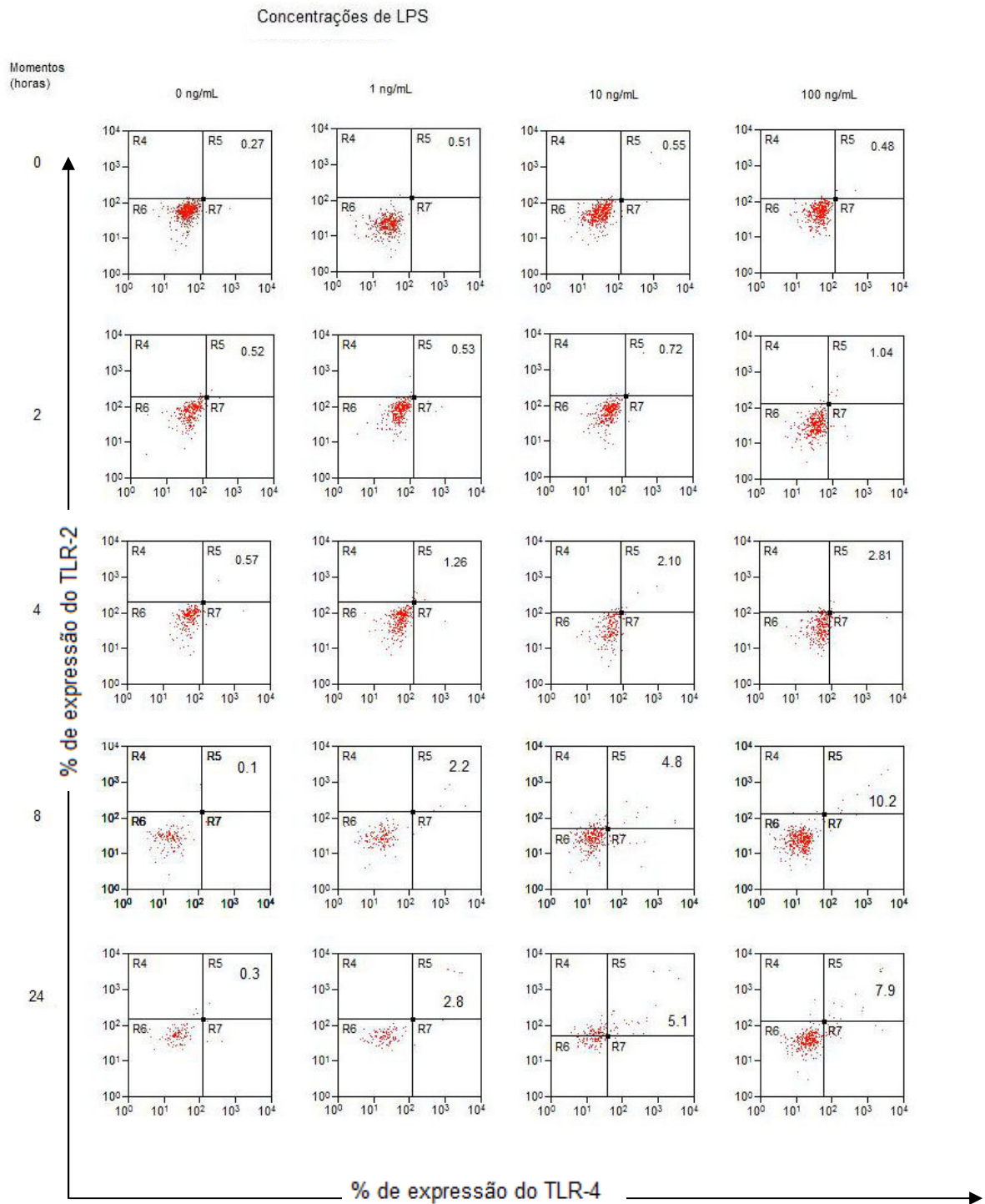


FIGURA 6 - Valores individuais da porcentagem de expressão de receptores Toll-like-2 e -4 em neutrófilos, mensurados por citometria de fluxo.

Os valores percentuais da expressão dos receptores Toll-like-2 e -4, nos diferentes grupos, estão representados na Tabela 2.

Não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$) na expressão dos receptores Toll-like-2 e -4 no Grupo controle (0 ng/mL de LPS), ao longo do tempo, nas diferentes populações celulares. Os neutrófilos, monócitos e linfócitos apresentaram um aumento estatisticamente significativo ($p < 0,05$) da expressão dos receptores TLRs nos momentos 8 e 24 horas, em relação ao momento basal, nas três concentrações de LPS avaliadas (1, 10 e 100 ng/mL).

Quando foram comparadas as diferentes concentrações de LPS (1, 10 e 100 ng/mL), houve uma resposta padronizada nas populações celulares, com um aumento estatisticamente significativo ($p < 0,05$) da expressão dos receptores Toll-like, nas concentrações 10 e 100 ng/mL de LPS às 2, 4, 8 e 24 horas em relação ao Grupo controle (0 ng/mL de LPS).

Tabela 2 - Valores da expressão dos receptores Toll-like-2 e -4, em três populações celulares (linfócitos, monócitos, neutrófilos) do sangue total, em relação às diferentes concentrações de LPS (0, 1, 10, 100 ng/mL). Os valores representam a mediana (mínimo e máximo)

Populações celulares	Momentos (horas)	Concentrações (ng/mL)			
		0	1	10	100
Linfócitos	0	0.2 (0.1-0.4)	0.2 ^b (0.2-0.5)	0.17 ^b (0.1-0.6)	0.3 ^b (0.1-0.6)
	2	0.3 ^B (0.1-0.4)	0.9 ^{b, B} (0.1-1.3)	1.0 ^{b, A} (0.4-1.9)	1.6 ^{b, A} (0.8-2.7)
	4	0.2 ^B (0.2-0.4)	1.2 ^{b, B} (0.7-2.0)	1.7 ^{b, A} (1.2-3.4)	2.0 ^{b, A} (1.2-3.0)
	8	0.3 ^B (0.2-0.6)	2.5 ^{a, B} (1.8-3.3)	3.9 ^{a, A} (2.0-4.4)	4.6 ^{a, A} (1.5-5.2)
	24	0.3 ^B (0.2-0.6)	1.7 ^{a, B} (1.2-3.3)	2.2 ^{a, A} (1.6-4.7)	4.6 ^{a, A} (2.5-7.6)
Monócitos	0	0.3 (0.1-0.7)	0.3 (0.1-0.6)	0.3 ^b (0.2-0.5)	0.3 ^b (0.2-0.6)
	2	0.2 ^B (0.1-0.3)	1.5 ^{b, B} (0.1-2.6)	1.8 ^{b, A} (0.2-2.9)	3.3 ^{b, A} (1.2-4.8)
	4	0.2 ^B (0.1-0.4)	1.9 ^{b, B} (1.0-3.1)	3.3 ^{b, A} (2.6-5.1)	3.3 ^{b, A} (1.6-5.7)
	8	0.3 ^B (0.2-0.9)	3.3 ^{a, B} (2.0-5.2)	5.1 ^{a, A} (2.5-8.3)	4.6 ^{a, A} (3.3-8.8)
	24	0.4 ^B (0.2-0.6)	3.0 ^{a, B} (1.4-5.5)	4.2 ^{a, A} (1.3-11.1)	5.8 ^{a, A} (1.6-33.1)
Neutrófilos	0	0.4 (0.2-0.5)	0.3 ^b (0.2-0.5)	0.5 ^b (0.1-0.6)	0.3 ^b (0.1-0.6)
	2	0.4 ^B (0.1-0.6)	1.1 ^{b, B} (0.5-1.1)	2.3 ^{b, A} (1.4-3.3)	2.7 ^{b, A} (2.2-4.2)
	4	0.5 ^B (0.4-1.2)	1.8 ^{b, B} (1.5-2.6)	2.3 ^{b, A} (2.1-4.5)	3.4 ^{b, A} (2.3-5.2)
	8	0.7 ^B (0.1-0.7)	3.9 ^{a, B} (2.2-4.6)	4.0 ^{a, A} (2.6-4.8)	5.2 ^{a, A} (3.6-10.2)
	24	0.6 ^B (0.3-0.7)	2.8 ^{a, B} (2.0-4.8)	4.8 ^{a, A} (3.5-5.1)	4.9 ^{a, A} (4.6-7.9)

Medianas seguidas de letras distintas diferem significativamente entre si ($p < 0,05$) na coluna e na linha. Ausência de letras minúsculas (linha) ou maiúsculas (coluna) indica que não há diferença significativa ($p > 0,05$) entre os dados avaliados.

Expressão gênica das citocinas – os valores do pool de cDNA demonstraram uma expressão basal para todas as citocinas (TNF- α , IL-1, IL-6 e IL-10) no momento 0 hora, em todas as concentrações de LPS (0, 1, 10 e 100 ng/mL). Houve pequeno aumento da expressão gênica de IL-1 e IL-6 nos momentos 2, 4, 8 e 24 horas no Grupo controle (0 ng/mL de LPS). A adição primária de LPS induziu um aumento rápido e potente na expressão gênica das citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-1 e IL-6, nos momentos 2 e 4 horas em relação ao momento basal (0 hora), nas diferentes concentrações de LPS (1, 10 e 100 ng/mL). Porém houve diminuição drástica na expressão gênica do TNF- α (44-73%), do IL-1 (51-61%) e do IL-6 (56-90%) no momento 8 horas, em relação ao momento 4 horas, que persistiu até o momento 24 horas após o estímulo primário com LPS, nas três concentrações de endotoxina. A IL-10 demonstrou um padrão diferente na sua expressão gênica. Enquanto não houve aumento da expressão de IL-10 na concentração controle (0 ng/mL) durante 24 horas, sua expressão apresentou-se pouco aumentada após o estímulo primário de LPS (momentos 2 e 4 horas), com aumento considerável (75-83%) da expressão após o estímulo secundário de LPS no momento 8 horas e diminuição dos valores às 24 horas (98-99%) (Tabela 3). Não houve alteração na expressão gênica do TGF- β após o estímulo com diferentes concentrações de LPS neste estudo.

Tabela 3 - Valores relativos da expressão gênica relativa de citocinas para as diferentes concentrações de LPS (0, 1, 10, 100 ng/mL) em um modelo *ex vivo* de tolerância ao LPS em equinos. Os valores foram normalizados em relação ao gene housekeeping β Gus (gene/ β Gus) e comparados com o momento 0 (expressão relativa relativa_{T0} /expressão relativa relativa_{T0})

Concentração de LPS (ng/mL)	Citocinas	Momentos (horas)			
		2	4	8	24
0	TNF- α	0,46	0,73	0,67	0,16
	IL-1	1,68	20,13	4,05	6,00
	IL-6	0,90	2,82	4,06	2,19
	IL-10	0,78	0,55	0,36	0,67
1	TNF- α	238,72	197,21	54,84	3,26
	IL-1	147,87	122,96	46,83	9,37
	IL-6	357,09	72,56	31,38	22,19
	IL-10	12,19	32,60	126,40	2,16
10	TNF- α	271,49	199,69	63,36	1,30
	IL-1	345,09	136,24	66,08	7,67
	IL-6	4066,38	970,68	92,78	35,06
	IL-10	67,72	77,32	472,90	1,93
100	TNF- α	273,56	341,77	188,25	3,03
	IL-1	224,83	254,25	101,19	14,57
	IL-6	2393,91	965,02	110,25	57,33
	IL-10	43,02	120,12	746,33	2,49

* Estímulo secundário de LPS no momento 4 horas.

DISCUSSÃO

O fenômeno de tolerância à endotoxina em equinos foi demonstrado neste estudo, através da diminuição da expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 e IL-6), aumento na expressão da citocina anti-inflamatória IL-10, após o estímulo secundário de LPS (momentos 8 e 24 horas), e nenhuma alteração na expressão gênica do TGF- β durante todo o estudo. Ao se avaliar a expressão dos receptores Toll-like-2 e -4 em diferentes concentrações de LPS (1,

10 e 100 ng/mL), observou-se aumento de ambos os receptores após o segundo estímulo de endotoxina, sugerindo que o mecanismo molecular da tolerância não acarreta diminuição na expressão destes receptores nessa espécie.

A escolha do modelo experimental foi fundamental para confirmar a resposta de tolerância. Sabendo-se que, a utilização de células em cultura não responde ao LPS da mesma maneira como no sangue total, uma vez que cada população celular pode ser afetada de maneira diferente pelo mesmo insulto (CAVAILLON; ADIB-CONQUY, 2006; MATHINSON et al., 1992), e que os modelos *in vivo* apresentam desvantagens como a ativação de outras células e ligantes endógenos dos receptores Toll-like (FAURE et al., 2001; SMILEY et al., 2001) optou-se pela utilização de um modelo *ex vivo* para o estudo da tolerância em equinos.

Esse novo modelo foi desenvolvido para a avaliação da modulação de citocinas no sangue total, sendo caracterizado por boa estabilidade (contagem e viabilidade) de leucócitos ao longo de todo o período experimental (WANG et al., 2000). Este modelo permitiu estudar o fenômeno da tolerância à endotoxina em equinos, assim como avaliar a expressão dos receptores Toll-like-2 e -4 nas diferentes concentrações de LPS e populações celulares, semelhante ao demonstrado em diversos estudos (HADLEY et al., 2005; HADLEY et al., 2007; JORGENSEN et al., 2001; YAGUB et al., 2003; WANG et al., 2001).

A presença das proteínas dos Toll-like-2 e -4 vem sendo detectada através do Western blotting em células humanas, mostrando que o TLR-4 é alvo da indução de tolerância à endotoxina (FAURE et al., 2001; ZHONG et al., 2008). Uma vez que os receptores Toll-like-4 e -2 de equinos apresentam uma homologia grande com os mesmos receptores para humanos, (NCBI) 90% e 85%, respectivamente, anticorpos humanos contra estes receptores foram usados para marcá-los em leucócitos de equinos na citometria de fluxo, à semelhança de estudos para identificar tais receptores em leucócitos de cães (BURGENER; JUNGI, 2008).

Estudos prévios investigaram a tolerância em relação aos efeitos dose-dependentes do segundo estímulo de LPS. Koons et al. (2008) relataram que um

estímulo secundário de LPS (4 horas após o estímulo primário), acarretava efeitos redutores em relação a produção de TNF- α utilizando a dose de 100 ng/mL, sem nenhuma diferença para a dose de 1 ng/mL de LPS. Outro estudo relatou que a dose de 100 ng/mL de LPS foi a única que reduziu drasticamente a produção de citocinas inflamatórias (IL-6 e IL-12) em macrófagos peritoneais de camundongos, enquanto as concentrações de 1 e 10 ng/mL não apresentaram diferenças significativas em relação a concentração controle (NOMURA et al., 2000). Porém, um estudo demonstrou que a segunda dose de 10 ng/mL de LPS acarretou a diminuição na expressão do TLR-4 (CUSCHIERI et al., 2006) em monócitos de humanos, enquanto Medvedev et al. (2002) não observaram alteração na expressão do TLR-2. No presente estudo, embora as três doses de LPS tenham induzido a tolerância à endotoxina, acredita-se que as doses a serem usadas para promover uma melhor expressão dos receptores Toll-like em monócitos, linfócitos e neutrófilos de equinos sejam de 10 e 100 ng/mL de LPS, pela maior ativação dos receptores Toll-like-2 e -4 encontradas nessas doses.

O estabelecimento da tolerância à endotoxina em equinos nesse modelo *ex vivo* foi verificado através da diminuição na expressão gênica das citocinas inflamatórias, similar ao encontrado por outro modelo *ex vivo* em equinos cujo estímulo secundário de LPS promoveu a diminuição na transcrição dos genes das citocinas TNF- α , IL-1 e IL-6 em monócitos tolerantes (DURANDO et al., 2005). Outras espécies como coelhos, camundongos, ratos e humanos já demonstraram o mesmo padrão de diminuição das citocinas inflamatórias frente a um estímulo *ex vivo* de LPS (ERROI et al., 1993; FLOHE et al., 1991; KIANI et al., 1997; WAKABAYASHI et al., 1994), enquanto modelos *in vitro* evidenciaram discordância de resultados (MENGOZZI et al., 1993; SEATTER et al., 1994; TAKASUKA et al., 1991; ZIEGLER-HEITBROCK et al., 1992), atribuída muitas vezes à variedade de diferentes doses de LPS, tipos ou linhagens celulares (RAYHANE et al., 1999).

Como relatado por Wang et al. (2000), o modelo *ex vivo* com sangue total apresenta o consumo de oxigênio durante as 24 horas de incubação, sendo inicialmente um consumo maior e decrescendo vagarosamente ao longo do

tempo. Assim, no presente estudo, o aumento da expressão das citocinas pró-inflamatórias IL-1 e IL-6 na concentração controle (0 ng/mL) de LPS condiz com relatos prévios (GHEZZI et al., 1991) que concluíram que a hipóxia aumenta a produção de IL-1 e TNF- α .

Semelhantemente, Knowlers et al. (1997) relataram que a capacidade fagocítica de células polimorfonucleares estava aumentada na presença de IL-1 e TNF- α durante a hipóxia em comparação à normoxia. Tais resultados sugerem que a privação de oxigênio aumenta a estimulação de LPS, assim como os efeitos de mediadores como citocinas pró-inflamatórias. No presente estudo, a hipóxia pode ter sido reconhecida pelas células como uma alteração semelhante ao que ocorre no organismo animal, e contribuído para a indução na produção de citocinas pró-inflamatórias nas amostras sem estímulo de LPS (WANG et al., 2000).

O envolvimento de citocinas anti-inflamatórias como a IL-10 e TGF- β tem sido demonstrado em modelos *in vitro* de tolerância à endotoxina (CAVAILLON et al., 1994; RANDOW et al., 1995), evidenciando o potente efeito anti-inflamatório da IL-10 na tolerância (CAVAILLON, 2002) e do TGF- β na endotoxemia (GARCIA-LAZARO et al., 2005).

Enquanto Randow et al. (1995) e Durando et al. (2005) estudando a tolerância à endotoxina, através de cultura *in vitro* ou *ex vivo* de monócitos de humanos e equinos, respectivamente, demonstraram uma diminuição na transcrição do gene da IL-10 após o segundo estímulo de LPS, Frankenberger et al. (1995) e Adib-Conquy et al. (2006) reportaram um aumento da produção de IL-10 após o estímulo secundário de LPS em monócitos de humanos com sepse. Tais resultados são condizentes com os achados do presente estudo, com um aumento importante da expressão gênica da IL-10 nesse fenômeno de tolerância à endotoxina em equinos, ilustrando que a modificação da sinalização intracelular ocorreu para limitar a produção de citocinas pró-inflamatórias ou favorecer aquela de citocinas anti-inflamatórias (ADIB-CONQUY et al., 2006).

O TGF- β tem sido reconhecido como um desativador de macrófagos em camundongos na inflamação, através da inibição da liberação de intermediários

reativos de oxigênio (TSUNAWAKI et al., 1988) e de TNF- α (ESPEVIC; NISSEN-MEYER 1986), esperando-se o envolvimento deste mediador na tolerância à endotoxina como parte de uma resposta anti-inflamatória compensatória (BONE, 1996). No entanto, outros autores identificaram o TGF- β como um fator que predispõe a uma produção exagerada de citocinas pró-inflamatórias induzidas pelo LPS (CHANTRY et al., 1989; TURNER et al., 1990), e ao choque endotoxêmico letal (MARIE et al., 1996), caracterizando um papel controverso dessa citocina.

O TGF- β é sintetizado por diversos tipos celulares, incluindo células mononucleares, plaquetas e granulócitos, sendo comumente presente numa forma latente em amostras biológicas (TYLMAN et al., 2006). Existem assim três hipóteses para não ter ocorrido a expressão do TGF- β no presente modelo: a não ligação do TGF- β aos receptores de membranas do tipo I e do tipo II, impedindo a sinalização intracelular mediada pelas proteínas SMADs e a transcrição de diferentes genes-alvos; ou o estímulo de LPS em neutrófilos e monócitos resultou em um aumento significativo da proteína TGF- β , porém sem alterações na expressão do RNAm para TGF- β , à semelhança da resposta em humanos (GROTENDORST et al., 1989), pois há primeiramente estimulação das formas latentes de TGF- β nas amostras biológicas, sugerindo uma regulação pós-transcricional e/ou pós-transducional da expressão do TGF- β (KIM et al., 1992); ou ainda, o fato de ter sido utilizado um modelo *ex vivo* de sangue total, não houve influência do fígado na indução da expressão do TGF- β durante a resposta de fase aguda, pois o fígado é a maior fonte de TGF- β na endotoxemia (SHETH; BANKEY, 2001; SZABO et al., 2002).

Modelos *in vitro* em células humanas sugerem que o TGF- β é menos importante que a IL-10 na tolerância (SCHRODER et al., 2003), semelhante a outro estudo que não demonstrou diferença na expressão do TGF- β entre monócitos tolerantes e não tolerantes ao LPS (FLACH et al., 1995). Porém tais estudos *in vitro* não consideraram a importância da origem hepática do TGF- β , como demonstrado em camundongos transgênicos, cujos níveis hepáticos desta citocina apresentavam relevância após o estímulo de LPS (GARCIA-LAZARO et

al., 2005). Sendo assim, a ausência da expressão da citocina TGF- β no presente modelo *ex vivo* em equinos não teria sido possível de ser detectada por não acarretar a ativação hepática durante a fase aguda da inflamação.

Como quase todos os efeitos fisiopatológicos do LPS são mediados por citocinas como TNF- α , IL-1, IL-6, IL-10 e TGF- β (BEUTLER; CERAMI, 1986; DINARELLO et al., 1988), espera-se desta forma que a tolerância à endotoxina possa levar a uma dessensibilização dos sinais clínicos nos equinos, que são altamente sensíveis ao LPS (KIKU et al., 2003).

O mecanismo celular pelo qual ocorre o fenômeno de tolerância à endotoxina ainda não está bem estabelecido. Sato et al. (2000) estudaram a tolerância à endotoxina *in vitro* em camundongos e encontraram uma diminuição na expressão dos TLRs, corroborando com estudos feitos por Martin et al. (2001) em linhagens celulares e com Nomura et al. (2000) em macrófagos peritoneais, que associaram essa redução dos receptores com o efeito de tolerância. Já Medvedev et al. (2001), também utilizando o modelo *in vitro* para verificar o efeito de tolerância em macrófagos peritoneais de camundongos, não observaram alterações na expressão destes receptores, o que ressalta a discussão sobre a hipótese de que o fenômeno de tolerância esteja relacionado a uma diminuição na expressão de tais receptores.

Sabe-se também que o TGF- β inibe a expressão do CD14 em macrófagos estimulados por LPS, podendo atenuar a sinalização do TLR-4 (IMAI et al., 2000). Como não foi observada a expressão gênica de TGF- β neste estudo, provavelmente não ocorreu a inibição da expressão do CD14, levando ao aumento da expressão dos receptores Toll-like nos leucócitos destes equinos.

Ao contrário dos trabalhos anteriores, o presente estudo demonstrou um aumento na expressão de ambos os receptores Toll-like, consistente com achados recentes em humanos que demonstraram um aumento progressivo na expressão do TLR-2 e do TLR-4 com uma dose de 10 ng/mL (WITTEBOLE et al., 2005). Tal estudo realizou o estímulo primário de LPS *in vivo* e o estímulo secundário *ex vivo* em monócitos, considerando a possibilidade de influência do modelo utilizado nas respostas obtidas.

Medvedev (2001) também demonstrou que uma superexpressão dos receptores CD14, MD-2 e TLR-4 em células humanas não afetou a habilidade destas se tornarem tolerantes, uma vez que os receptores Toll-like demonstraram função adequada de sinalização *in vitro*. Ambos os autores acreditam que a diminuição dos receptores Toll-like-2 e -4 não seja o mecanismo celular da tolerância à endotoxina, considerando a possibilidade do envolvimento de vias de sinalização internas como responsáveis por tal fenômeno (MEDVEDEV, 2001; WITTEBOLE et al., 2005). Desta maneira, o aumento da expressão dos TLRs encontrado no presente estudo também sugere que esta hipótese possa ser válida para a espécie equina.

Diante de tais observações, a pesquisa do mecanismo de tolerância à endotoxina em equinos deve ser direcionada a alterações nas vias de sinalização internas da célula, como o fator nuclear- κ B (NF- κ B) e a proteína MyD88, que são os principais fatores requeridos para a transcrição de vários genes de mediadores inflamatórios (CUSHIERI et al., 2008; MEDVEDEV et al., 2000). Estas proteínas poderiam ser as responsáveis pela diminuição na produção de citocinas inflamatórias na tolerância à endotoxina em equinos.

CONCLUSÃO

Foi possível demonstrar que ocorreu uma diminuição de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 e IL-6) e aumento da citocina anti-inflamatória IL-10, porém sem alteração na expressão gênica do TGF- β após o estímulo secundário de LPS. Desta maneira foi demonstrada a ocorrência da tolerância à endotoxina no modelo *ex vivo* com sangue total em equinos, semelhante a estudos prévios em outras espécies.

Apesar da ocorrência do fenômeno de tolerância, houve aumento na expressão dos receptores Toll-like-2 e -4 em neutrófilos, monócitos e linfócitos,

contrariando relatos em outras espécies de uma diminuição de ambos os receptores de superfície celular como responsável pela tolerância à endotoxina. Acredita-se que a tolerância em equinos esteja relacionada ao mecanismo de ativação das vias de sinalização intracelulares.

REFERÊNCIAS

- ADIB-CONQUY, M.; CAVAILLON, J.M. Gamma interferon and granulocyte/monocyte colony-stimulating factor prevent endotoxin tolerance in human monocytes by promoting interleukin-1 receptor-associated kinase expression and its association to MyD88 and not by modulating TLR4 expression. *J. Biol. Chem.*, v. 277, n. 31, p. 27927-27934, 2002.
- ADIB-CONQUY, M.; ADRIE, C.; FITTING, C. et al. Up-regulation of MyD88s and SIGIRR, molecules inhibiting Toll-like receptor signaling, in monocytes from septic patients. *Crit. Care Med*, v. 34, n. 9, p. 2377-2385, 2006.
- ALLEN, G.K.; CAMPBELL-BEGGS, C.; ROBINSON, J.A. et al. Induction of early - phase endotoxin tolerance in horses. *Equine Vet. J.*, v. 28, n. 4, p. 269-274, 1996.
- BAKER, B.; ZAMBRYSKI, P.; STASKAWICZ, B. et al. Signaling in plant-microbe interactions. *Science*, v. 276, n. 5313, p. 726-733, 1997.
- BARTON, M.H.; COLLATOS, C.; MOORE, J.N. Endotoxin induced expression of tumor necrosis factor, tissue factor and plasminogen activator inhibitor activity by peritoneal macrophages. *Equine Vet. J.*, v. 28, n. 3, p. 382-389, 1996.
- BEUTLER, B; CERAMI, A. Cachectin and tumor necrosis factor as two sides of the same biological coin. *Nature.*, v. 320, p. 584-588, 1986.
- BONE, R.C. Sir Isaac Newton, sepsis, SIRS, and CARS. *Crit. Care Med.*, v. 24, p. 1125-1128, 1996.
- BURGENER, I.A.; JUNGI, T.W. Antibodies specific for human or murine Toll-like receptors detect canine leukocytes by flow cytometry. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v. 124, p. 184-191, 2008.
- BUTTENSCHOEN, K.; SCHNEIDER, M.E.; UTZ, K. et al. Effect of major abdominal surgery on endotoxin release and expression of Toll-like receptors 2/4. *Langenbecks Arch. Surg.*, v. 394, n. 2, p. 293-302, 2008.
- CAVAILLON, J.M.; PITTON, C.; FITTING, C. Endotoxin tolerance is not a LPS-specific phenomenon: partial mimicry with IL-1, IL-10 and TGF beta. *J. Endotoxin Res.* v. 1, n. 1, p. 21-29, 1994.

- CAVAILLON, J.M. "Septic Plasma" an immunosuppressive milieu. *Am. J. Resp. Crit. Care Med.*, v. 166, p. 1417-1418, 2002.
- CAVAILLON, J.M.; ADIB-CONQUY, M. Bench-to-bedside review: endotoxin tolerance as a model of leukocyte reprogramming in sepsis. *Crit. Care*, v. 10, n. 5, p. 233, 2006.
- CHANTRY, D.; TURNER, M.; ABNEY, E. et al. Modulation of cytokine production by transforming growth factor-beta. *J. Immunol.*, v. 142, p. 4295-4300, 1989.
- CHOW, J.C.; YOUNG, D.W.; GOLENBOCK, D.T. et al. Toll-like receptor-4 mediates lipopolysaccharide-induced signal transduction *J. Biol. Chem.*, v. 274, n.16, p. 10689-10692, 1999.
- COLLATOS, C. Clinical conditions associate with endotoxemia. In: ANNUAL CONVENTION OF THE AMERICAN ASSOCIATION OF EQUINE PRACTITIONERS, 41, 1995. Lexington. Proceedings...Lexington: AAEP.
- CUSCHIERI, J.; BILLIGREN, J.; MAIER, R. Endotoxin tolerance attenuates LPS-induced TLR4 mobilization to lipid rafts: a condition reversed by PKC activation. *J. Leukoc. Biol.*, v. 80, p. 1289-1297, 2006.
- DE LA CALLE, J.; BURBA, D.J.; RAMASWAMY, C.M. et al. Plasma and synovial fluid endothelin-1 and nitric oxide concentrations in horses with and without joint disease. *Am. J. Vet. Res.*, v. 63, n. 12, p. 1648-1654, 2002.
- DELUDE, R.; SAVEDIA JUNIOR, R.; ZHAO, H. et al. CD14 enhances cellular responses to endotoxin without imparting ligand-specific recognition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 92, p. 9288-9292, 1995.
- DINARELLO, C.A.; CANNON, J.C.; WOLFF, S.M. New concepts in the pathogenesis of fever. *Rev. Infect. Dis.*, v. 10, p. 168-189, 1988.
- DURANDO, M.M.; LEUTENEGGER, C.M.; BIRKS, E.K. LPS-induced tolerance in equine peripheral blood mononuclear cells. *J. Vet. Emergency Crit. Care*, v. 15: S1-S13, 2005.
- EBERT, S.; ZERETZKE, M.; NAU, R. et al. Microglial cells and peritoneal macrophages release activin A upon stimulation with toll-like receptor agonists. *Neurosci. Lett.*, v. 413, n. 3, p. 241-244, 2006.

- ERROI, A.; FANTUZZI, G.; MENGOZZI, M. et al. Differential regulation of cytokine production in lipopolysaccharide tolerance in mice. *Infect. Immun.*, v. 6, p. 4356-4359, 1993.
- ESPEVIC, T.; NISSEN-MEYER, J. A sensitive cell line, WEHI 164 clone 13, for measuring cytotoxic factor/tumor necrosis factor from human monocytes. *J. Immunol. Methods*, v. 95, p. 99-105, 1986.
- FAN, H.; COOK, J. Molecular mechanisms of endotoxin tolerance. *Endotoxin Res.*, v. 10, n. 2, p. 71-84, 2004.
- FAURE, E.; THOMAS, L.; XU, H. et al. Bacterial lipopolysaccharide and IFN- γ induce Toll-like receptor 2 and Toll-like receptor 4 expression in human endothelial cells: role of NF- κ B activation. *J. Immunol.*, v. 166, n. 3, p. 2018-2024, 2001.
- FIORENTINO, D.F.; ZLOTNIK, A.; MOSMANN, T.R., et al. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *J. Immunol.*, v. 147, p. 3815-3822, 1991.
- FLACH, R.; FLOHÉ, S.; LASCHINSKI, K. Interleukin-10 is downregulated in mononuclear cells from endotoxin tolerant humans. *Endotoxin Res.*, v. 4, p. 189-195, 1997.
- FLOHE, S.; HEINRICH, P.; SCHNEIDER, J. et al. Time course of IL-6 and TNF- α release during endotoxin-induced endotoxin tolerance in rats. *Biochem. Pharmacol.*, v. 41, p. 1607-1614, 1991.
- FRANKENBERGER, M.; PECHUMER, H.; ZIEGLER-HEITBROCK, H.W. Interleukin-10 is upregulated in LPS tolerance. *J. Inflam.*, v. 45, p. 56-63, 1995.
- GARCIA-LAZARO, J.F.; THIERINGER, F.; LUTH, S. et al. Hepatic over-expression of TGF- β 1 promotes LPS-induced inflammatory cytokine secretion by liver cells and endotoxemic shock. *Immunol. Lett.*, v. 101, n. 2, p. 217-222, 2005.
- GHEZZI, P.; DINARELLO, C.A.; BIANCHI, M. et al. Hypoxia increases production of interleukin-1 and tumor necrosis factor by human mononuclear cells. *Cytokine*, v. 3, p. 189-194, 1991.
- GRANOWITZ, E.V.; PORAT, R.; MIER, J.W. Intravenous endotoxin suppresses the cytokine response of peripheral blood mononuclear cells of healthy humans *J. Immunol.*, v. 151, n. 3, p. 1637-1645, 1993.

- GROTENDORST, G.R.; SMALE, G.; PENCEV, D. Production of transforming growth factor beta by human peripheral blood monocytes and neutrophils. *J. Cell Physiol.*, v. 140, p. 396-402, 1989.
- HADLEY, J.S.; WANG, J.E.; FOSTER, S.J. et al. Peptidoglycan of *Staphylococcus aureus* upregulates monocyte expression of CD14, Toll-like receptor 2 (TLR2), and TLR4 in human blood: possible implications for priming of lipopolysaccharide signaling. *Infect. Immun.*, v. 73, p. 7613-7619, 2005.
- HADLEY, J.S.; WANG, J.E.; MICHAELS, L.C. et al. Alterations in inflammatory capacity and TLR expression on monocytes and neutrophils after cardiopulmonary bypass. *Shock*, v. 27, n. 5, p. 466-473, 2007.
- HASHIMOTO, C.; HUDSON, K.L.; ANDERSON, K.V. The Toll gene of *Drosophila* required for dorsal-ventral embryonic polarity appears to encode a transmembrane protein. *Cell*, v. 52, n. 2, p. 269-279, 1988.
- HENRY, M.; MOORE, J.N. Endotoxemia equina. In: BRADFORD P, SMITH B P. *Tratado de medicina interna de grandes animais*. São Paulo: Manole, 1993. p. 674-678.
- HOWARD, M.; MUCHAMEL, T.; ANDRADE, S. et al. Interleukin 10 protects mice from lethal endotoxemia. *J. Exp. Med.*, v. 177, p. 1205-1208, 1993.
- IMAI, K.; TAKESHITA, A.; HANAZAWA, S. Transforming growth factor- β inhibits lipopolysaccharide-stimulated expression of inflammatory cytokines in mouse macrophages through downregulation of activation protein 1 and CD14 receptor expression. *Infect. Immun.*, v. 68, v. 2418-2423, 2000.
- INGALLS, R.R.; MONKS, B.G.; GOLEBOCK, D.T. Membrane expression of soluble endotoxin-binding proteins permits lipopolysaccharide signaling in Chinese hamster ovary fibroblasts independently of CD14. *J. Biol. Chem.*, v. 274, n. 20, p. 13993-13998, 1999.
- JORGENSEN, P.F.; WANG, J.E.; ALMLOF, M. et al. Peptidoglycan and lipoteichoic acid modify monocyte phenotype in human whole blood. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, v. 8, n. 3, p. 515-521, 2001.
- KIANI, A.; TSCHIERSCH, A.; GABORIAU, E. et al. Downregulation of the proinflammatory cytokine response to endotoxin by pretreatment with the nontoxic

- lipid A analog SDZ MRL 953 in cancer patients. *Blood*, v. 90, n. 4, p. 1673-1683, 1997.
- KIKU, Y.; KUSANO, K.; MIYAKE, H. et al. Flow cytometric analysis of peripheral blood mononuclear cells induced by experimental endotoxemia in horse. *J. Vet. Med. Sci.*, v. 65, n. 8, p. 857-863, 2003.
- KIM, S.J.; PARK, K.; KOELLER, D. et al. Post-transcriptional regulation of the human transforming growth factor- β 1 gene. *J. Biol. Chem.*, v. 267, p. 13702-13707, 1992.
- KIRSCHNING, C.J.; WESCHE, H.; AYRES, T.M. et al. Human Toll-like receptor 2 confers responsiveness to bacterial lipopolysaccharide. *J. Exp. Med.*, v. 188, n. 11, p. 2091-2097, 1998.
- KNOWLERS, R.; KEEPING, H.; GRAEBER, T. et al. Cytokine control of PMN phagocytosis: regulatory effects of hypoxemia and hypoxemia-reoxygenation. *Am. J. Physiol.*, v. 272, C 1352-C1364, 1997.
- KOONS, A.; CRANDALL, M.; GARY, C. et al. Even ephemeral endotoxin exposure establishes endotoxin tolerance. *J. Trauma*, v. 64, p. 938-942, 2008.
- KUESIS, B.; SPIER, S.J. Endotoxemia. In: REED, SM, BAYLY WM. *Medicina interna equina*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. p. 550-561.
- MARIE, C.; CAVAILLON, J.M.; LOSSER, M.R. Elevated levels of circulating transforming growth factor-beta 1 in patients with sepsis syndrome. *Ann. Int. Med.*, v. 125, p. 520-521, 1996.
- MARSIK, C.; MAYR, F.; CARDONA, F. et al. Endotoxemia modulates Toll-like receptors on leucocytes in humans. *Br. J. Haematol.*, v. 121, n. 4, p. 653-656, 2003.
- MARTIN, M.; KATZ, J.; VOGEL, S.N. et al. Differential induction of endotoxin tolerance by lipopolysaccharide derived from *porphyromonas gingivalis* and *Escherichia coli*. *J. Immunol.*, v. 167, n. 9, p. 5278-5285, 2001.
- MATHISON, J.C.; TOBIAS, P.S.; WOLFSON, E. et al. Plasma lipopolysaccharide (LPS)-binding protein: a key component in macrophage recognition of Gram-negative LPS. *J. Immunol.*, v. 149, n. 4, p. 200-206, 1992.

- MEDVEDEV, A.E. Overexpression of CD14, TLR4, and MD-2 in HEK 293T cells does not prevent induction of in vitro endotoxin tolerance *J. Endotoxin Res.*, v. 9, p. 60-64, 2003.
- MEDVEDEV, A.E.; KOPYDLOWSKI, K.M.; VOGEL, S.N. Inhibition of lipopolysaccharide-induced signal transduction in endotoxin-tolerized mouse macrophages: dysregulation of cytokine, chemokine, and toll-like receptor 2 and 4 gene expression *J. Immunol.*, v. 164, n. 11, p. 5564-5574, 2000.
- MEDVEDEV, A.E.; HENNEKE, P.; SCHROM, M. et al. Induction of tolerance to lipopolysaccharide and mycobacterial components in chinese hamster ovary/CD14 cells is not affected by overexpression of toll-like receptors 2 or 4. *J. Immunol.*, v. 167, n. 4, p. 2257-2267, 2001.
- MEDVEDEV, A.E.; LENTSCHAT, A.; WAHL, L.M. et al. Dysregulation of LPS-induced Toll-like receptor 4-MyD88 complex formation and IL-1 receptor associated kinase 1 activation in endotoxin-tolerant cells. *J. Immunol.*, v. 169, n. 9, p. 5209-5216, 2002.
- MEDZHITOV, R.; PRESTON-HURLBURT, P.; JANEWAY, C.A. A human homologue of Drosophila toll protein signals activation of adaptative immunity. *Nature*, v. 338, n. 6640, p. 394-397, 1997.
- MENGOZZI, M.; FANTUZZI, G. SIRONI, M. et al. Early down-regulation of TNF production by LPS tolerance in human monocytes: comparison with IL-1 β , IL-6 and IL-8. *Lymphok. Cytok. Res.*, v. 12, p. 231-236, 1993.
- MONICK, M.M.; YAROVINSKY, T.O.; POWERS, L.S. et al. Respiratory syncytial virus up-regulates tlr4 and sensitizes airway epithelial cells to endotoxin. *J. Biol. Chem.*, v. 278, n. 52, p. 53035-53044, 2003.
- MOORE, J.N. Endotoxemia: definition, characterization, and host defenses. *Compend. Cont. Educ.*, v. 3, p. 355-359, 1981.
- MOORE, J.N. Introduction to endotoxemia. In: ANNUAL CONVENTION OF THE AMERICAN ASSOCIATION EQUINE, 41. 1995, Lexington. Proceedings... Lexington: AAEP.
- MOORE, J.N. A perspective on endotoxemia. *AAEP Proceedings*, v. 47, p. 61-74, 2001.

- MORRIS, D.D. Endotoxemia in horses: a review of cellular and humoral mediators involved in its pathogenesis. *J. Vet. Intern. Med.*, v. 5, n. 3, p. 167-181, 1991.
- MORRIS, D.D.; MOORE, J.N. The effect of immunity to core lipopolysaccharides (LPS) on the production of thromboxane and prostacyclin by equine peritoneal macrophages. *Cornell Vet.*, v. 79, n. 3, p. 231-247, 1989.
- MORRISON, D. C. ; DINARELLO, C.A. ; MUNFORD, R.S. et al. Current status of bacterial endotoxins. *A. S. M. News*, v. 60, p. 479-484, 1994.
- NOMURA, F.; AKASHI, S.; SAKAO, Y. et al. Cutting edge: endotoxin tolerance in mouse peritoneal macrophages correlates with down-regulation of surface toll-like receptor 4 expression. *J. Immunol.*, v. 164, n. 7, p. 3476-3479, 2000.
- OLSON, N.C.; HELLYER, P.W.; DODAM, J.R. Mediators and vascular effects in response to endotoxin. *Br. Vet. J.*, v. 151, n. 5, p. 489-522, 1995.
- QURESHI, S.T.; LARIVIERE, L.; LEVEQUE, G. et al. Endotoxin-tolerant mice have mutations in Toll-like receptor 4 (Tlr4) *J. Exp. Med.*, v. 189, n. 4, p. 615-625, 1999.
- RANDOW, F.; SYRBE, U.; MEISEL, C. et al. Mechanism of endotoxin desensitization: involvement of interleukin 10 and transforming growth factor β . *J. Exp. Med.*, v. 181, p. 1887-1892, 1995.
- RAYHANE, N.; FITTING, C.; CAVAILLON, J.M. Dissociation of IFN- γ from IL-12 and IL-18 production during endotoxin tolerance. *J. Endotoxin Res.*, v. 5, n. 5-6, p. 319-324, 1999.
- ROBERTS, M.C. Endotoxemia and inflammatory mediators in equine colitis. *Proc. Annu. Meet. AAEP*, v. 41, p. 107-111, 1995.
- ROSSIGNOL, D.P.; LYNN, M. TLR4 antagonists for endotoxemia and beyond. *Curr. Opin. Investig. Drugs*, v. 6, n. 5, p. 496-502, 2005.
- SATO, S. ; NOMURA, F. ; KAWAI, T. et al. Synergy and cross-tolerance between toll-like receptor (TLR) 2- and TLR4-mediated signaling pathways. *J. Immunol.*, v. 165, n. 12, p. 7096-7101, 2000.
- SCHRÖDER, M.; MEISEL, C.; BUHL, K. Different modes of IL-10 and TGF- β to inhibit cytokine-dependent IFN- γ production: consequences for reversal of lipopolysaccharide desensitization. *J. Immunol.*, v. 170, p. 5260-5267, 2003.

- SEATTER, S.; BENNET, T.; LI, M. et al. Macrophage endotoxin tolerance, tumor necrosis factor and interleukin-1 regulation by lipopolysaccharide pretreatment. *Arch. Surgery.*, v. 129, p. 1263-1270, 1994.
- SEETHANATHAN, P.; BOTTOMS, G.D.; SCHAFER, K. Characterization of release of tumor necrosis factor, interleukin-1, and superoxide anion from equine white blood cells in response to endotoxin. *Am. J. Vet. Res.*, v. 51, n. 8, p. 1221-1225, 1990.
- SHETH, K.; BANKEY, P. The liver as an immune organ. *Curr. Opin. Crit. Care*, v. 7, p. 99-104, 2001.
- SMILEY, S.T.; KING, J.A.; HANCOCK, W.W. Fibrinogen stimulates macrophage chemokine secretion through toll-like receptor 4. *J. Immunol.*, v. 167, n. 5, p. 2887-2894, 2001.
- SZABO, G.; ROMICS, L.; FRENDL, G. Liver in sepsis and systemic inflammatory response syndrome. *Clin. Liver Dis.*, v. 6, p. 1045-1066, 2002.
- TAKASUKA, N.; TOKUNAGA, T.; AKAGAWA, K. Preexposure of macrophage to low doses of lipopolysaccharide inhibits the expression of tumor necrosis factor- α mRNA but not of IL-1 β mRNA. *J. Immunol.*, v. 146, p. 3824-3830, 1991.
- TAKEDA, K.; KAISHO, T.; AKIRA, S. Toll-like receptor. *Ann. Rev. Immunol.*, v. 21, n. 2, p. 335-350, 2003.
- TIZARD, I.R. *Imunologia Veterinária: uma introdução*. 5. ed. São Paulo: Roca, 1998, p. 22-40.
- TSUNAWAKI, S.; SPORN, M.; DING, A. et al. Deactivation of macrophages by transforming growth factor- β . *Nature*, v. 334, p. 260-262, 1988.
- TURNER, M.; CHANTRY, D.; FELDMANN, M. Transforming growth factor beta induces the production of interleukin 6 by human peripheral blood mononuclear cells. *Cytokine*, v. 2, p. 211-216, 1990.
- TYLMAN, M.; BENSTON, J.A.; HYLLNER, M. et al. Release of PMN elastase, TGF- β 1 and neopterin during blood storage; unfiltered versus filtered blood. *Transfusion Apher. Sci.*, v. 35, p. 97-102, 2006.
- ULEVITCH, R.J.; TOBIAS, P.S. Recognition of endotoxina by cells leading to transmembrane signaling. *Curr. Opin. Immunol.*, v. 13, p. 271-276, 1994.

- UNDERHILL, D.M.; OZINSKY, A. Toll-like receptors: key mediators of microbe detection. *Curr. Opin. Immunol.*, v. 14, n. 1, p. 103-110, 2002.
- VOGEL, S.N.; HOGAN, M.M. Role of cytokines in endotoxin-mediated host response. In: Immunophysiology: the roles of cells and cytokines in immunity and inflammation (Oppenheim JJ, Shevach EM, eds), New York: Oxford University Press, 1990. p. 238-258.
- WAKABAYASHI, G.; CANNON, J.; GELFAND, J. et al. Altered interleukin-1 and tumor necrosis factor production and secretion during pyrogenic tolerance to LPS in rabbits. *Am. J. Physiol.*, v. 267, p. 329-336, 1994.
- WANG, J.E.; SOLBERG, R.; OKKENHAUG, C. et al. Cytokine modulation in experimental endotoxemia: characterization of an *ex vivo* whole blood model. *Eur. Sur. Res.*, v. 32, n. 2, p. 65-73, 2000.
- WANG, J.E.; WARRIS, A.; ELLINGSEN, A. et al. Involvement of CD14 and Toll-like receptors in activation of human monocytes by *Aspergillus fumigatus* hyphae. *Infect. Immun.*, v. 69, p. 2402-2406, 2001.
- WITTEBOLE, X.; COYLE, S.M.; KUMAR, A. et al. Expression of tumor necrosis factor receptor and Toll-like receptor 2 and 4 on peripheral blood leucocytes of human volunteers after endotoxin challenge: a comparison of flow cytometric light scatter and immunofluorescence gating. *Clin. Exp. Immunol.*, v. 141, n. 1, p. 99-106, 2005.
- YAGUB, S.; SOLHAUG, V.; VANG, T. et al. A human whole blood model of LPS-mediated suppression of T cell activation. *Med. Sci. Monit.*, v. 9, n. 3, p. 120-126, 2003.
- YANG, R.B.; MARK, M.R.; GRAY, A. et al. Toll-like receptor-2 mediates lipopolysaccharide-induced cellular signaling. *Nature*, v. 395, n. 6699, p. 284-288, 1998.
- ZHONG, B.; YING, M.H.; YANG, Q. et al. Decrease in toll-like receptors 2 and 4 in the spleen of mouse with endotoxic tolerance. *Inflamm. Res.*, v. 57, n. 6, p. 252-259, 2008.
- ZIEGLER-HEITBROCK, H.; BLUMENSTEIN, M.; KAFFERLEIN, E. et al. *In vitro* desensitization to lipopolysaccharide suppresses tumor necrosis factor,

interleukin-1 and interleukin-6 gene expression in a similar fashion. *Immunol.*, v. 75, p. 264-268, 1992.