

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

**INDUÇÃO DIFERENCIAL DAS VIAS MyD88 E TRIF-
DEPENDENTES EM LEUCÓCITOS TOTAIS DE
EQUINOS ESTIMULADOS COM LPS DE *E. coli***

PRISCILA DALMAGRO
Médica Veterinária

**ARAÇATUBA - SP
2016**

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

**INDUÇÃO DIFERENCIAL DAS VIAS MyD88 E TRIF-
DEPENDENTES EM LEUCÓCITOS TOTAIS DE
EQUINOS ESTIMULADOS COM LPS DE *E. coli***

Priscila Dalmagro
Orientadora: Prof.^a Adjunto Juliana Regina Peiró
Co-orientador: Sérgio Moraes Aoki

Tese apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária – Unesp, Campus de Araçatuba, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Ciência Animal (Fisiopatologia Médica e Cirúrgica de Grandes Animais).

**ARAÇATUBA - SP
2016**

Catálogo na Publicação (CIP)
Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FMVA / UNESP

Dalmagro, Priscila.

D168i Indução diferencial das vias MyD88 e TRIF- dependentes
em leucócitos totais de equinos estimulados com LPS de E. coli
/ Priscila Dalmagro. - Araçatuba, 2016.
67 f. : il. ; tab. + 1 CD-ROM

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba

Orientadora: Profa Adj. Juliana Regina Peiró
Co-orientador: Sergio Moraes Aoki

1. Receptor toll-like-4. 2. Receptor toll-like-2. 3. Linfotoxina
alfa. 4. Interleucina -1. 5. Interleucina- 6. I. T.

CDD 617.63



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araçatuba

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: Indução diferencial das vias MyD88 e TRIF-dependentes em leucócitos totais de equinos
estimulados com LPS de E. coli

AUTORA: PRISCILA DALMAGRO

ORIENTADORA: JULIANA REGINA PEIRÓ

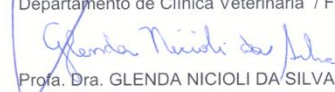
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em CIÊNCIA ANIMAL, área: Fisiopatologia Médica e Cirúrgica, pela Comissão Examinadora:


Profa. Dra. JULIANA REGINA PEIRÓ
Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba - UNESP


Dra. LINA MARIA WEHRLE GOMIDE
Doutora em Medicina Veterinária pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal - UNESP


Dra. FLÁVIA LOMBARDI LOPES
Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal / Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba - UNESP


Prof. Dr. JOSE PAES DE OLIVEIRA FILHO
Departamento de Clínica Veterinária / Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu - UNESP


Profa. Dra. GLENDA NICIOLI DA SILVA
Escola de Farmácia / Universidade Federal de Ouro Preto - UFOP

Araçatuba, 01 de fevereiro de 2016.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

PRISCILA DALMAGRO – Dourados – MS, nascimento: 02 de junho de 1985. Graduação em Medicina Veterinária pela Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Mato Grosso do Sul, em Dezembro de 2008. Mestre pela Faculdade de Medicina Veterinária – UNESP, São Paulo, desde junho de 2012. Trabalhou como pesquisadora em projetos com o apoio financeiro do Ministério da Ciência e Tecnologia (Brasil) e FINEP na empresa DNapta Biotecnologia Ltda, de outubro de 2009 a outubro de 2014, São José do Rio Preto, São Paulo. Atualmente aluna do Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal da Faculdade de Medicina Veterinária – UNESP, Campus de Araçatuba, São Paulo e bolsista CAPES, desde novembro de 2014, pela Faculdade de Medicina Veterinária – UNESP, Campus de Araçatuba, São Paulo.

Dedico

à Deus, à minha família, sempre
Bianor, Vandira, Rafaele e Julio Cezar e ao meu amor Mauro M. Nakano.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por sempre estar ao meu lado e por ter me ajudado a cumprir mais esta etapa e a enfrentar todas as dificuldades.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento deste projeto de pesquisa (2010/03425-4), fundamental para sua realização, do qual originou-se essa tese. À CAPES pela concessão da bolsa de doutorado, essencial para a conclusão dessa pesquisa.

Aos os meus pais, meus irmãos e meu parceiro que me apoiaram ao longo desses anos, sem os quais não seria possível passar por essa fase. Sempre pensei neles em todos os momentos, querendo que se orgulhassem do meu caminho.

À Professora Adjunto Juliana R. Peiró pela oportunidade de trabalhar ao seu lado, pela confiança em mim depositada, pela orientação, pela paciência e pelos conhecimentos compartilhados. E por muitas vezes me acolher como uma filha. Muito Obrigada.

À pós-doutoranda Lina Maria W. Gomide, pela ajuda no acesso das análises desta tese.

Ao Dr. Sergio Moraes Aoki e ao Dr. Paulo Peitl Júnior pelos ensinamentos e por todo apoio fornecido.

À Dra. Daisy Maria Favero Salvadori, responsável pelo Laboratório de Toxicogenômica e Nutrigenômica da Faculdade de Medicina da UNESP/Botucatu, e sua equipe por permitirem que eu realizasse parte do experimento deste trabalho e por ajudarem com a técnica do microarray. Em

especial à Dra. Glenda Nicioli da Silva, pela ajuda, pelo apoio, pelas discussões sobre as análises e pela descontração e pela hospedagem.

Ao Dr. Rodrigo Alexandre Panepucci, e sua equipe, responsável pelo laboratório de Hematologia da Faculdade de Medicina de Riberão Preto/USP, por cederem seus laboratórios para a realização de parte deste estudo.

Ao Yuri Moreira pela colaboração nas análises dos dados.

Às minhas amigas: Valéria C. Miura, Elisandra Baroni e Carolina C. Azevedo pela ajuda em todos os momentos, pelas conversas, pelo apoio incondicional e pelas risadas que fizeram com que essa jornada fosse mais fácil.

Aos meus colegas do Laboratório de Endotoxemia e Enfermidade de Grandes Animais, Fernando Moreli, Bianca Gerardi, José Eduardo Zanon, Rafaela Batista, pela ajuda e por me acolherem. Em especial, ao meu colega Leonardo Bentin pela parceria durante este ano.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Faculdade de Medicina Veterinária, Campus de Araçatuba, pela estrutura física concedida assim como pelo apoio da Coordenação e da equipe Seção Técnica de Graduação e Pós-graduação.

À todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para a construção desta tese.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	
LISTA DE FIGURAS	
RESUMO	
SUMMARY	
I. INTRODUÇÃO	18
II. REVISÃO DE LITERATURA	22
III. MATERIAL E MÉTODO	30
3.1. Animais	30
3.2. Modelo <i>ex vivo</i>	30
3.3. Purificação de RNA mensageiro de sangue total	31
3.4. Pools e Tratamento das amostras	31
3.5. Síntese de cDNA, Transcrição, Marcação e Purificação	32
3.6. Hibridização e leitura do <i>microarranjo</i> de oligonucleotídeos	33
3.7. Análise do <i>microarranjo</i> de oligonucleotídeos	33
IV. RESULTADOS	34
V. DISCUSSÃO	46
VI. CONCLUSÃO	54
VII. REFERÊNCIAS	55
VIII. APÊNDICES	65
Apêndice A - Valores de "fold change" MyD88, TRIF, IL-1 β , IL-6, IL-10	66
Apêndice B - Valores de "fold change" TLR-4, 2, TRAM2, TNF- α , A20	67

LISTA DE ABREVIATURAS

°C = grau Celsius

µg = micrograma

µl = microlitro

µM = micromolar

3-CTP = Cianina 3-aminoacitiditina-5'-Trifosfato

ANOVA = análise de variância

CD14 = antígeno de diferenciação de agrupamento CD14

cDNA = DNA complementar

DAMPs = padrões moleculares de patógenos associados a danos

DAVID = Banco de dados para anotação, visualização e descoberta integrada

DNA = ácido desoxirribonucléico

DNAse 1 = Deoxyribonuclease I

dNTP = Desoxirribonucleotídeo Fosfatado

DTT = Dithiothreitol β-mercaptoethanol

E. coli = Escherichia coli

EDTA = ácido etilenodiamino tetra-acético

ERK = kinases reguladas por sinais extracelulares

EUA = Estados Unidos da América

FC = fold change

GO = consórcio de anotação gênica

GX = Expressão gênica

Hi-RPM = kit de hibridização e expressão gênica

IFN-1 = interferon alfa-1

IFN- β = interferon beta

IFN- α = interferon alfa

IFN- γ = interferon gama

IKBKE = supressor de IKK-epsilon

IKK = kinase kappa I

IKKB = kinase inibitória do fator nuclear kappa-B subunidade beta I

IL-1 = interleucina-1

IL-10 = interleucina-10

IL-12 = interleucina-12

IL-18 = interleucina-18

IL-1R = receptor de interleucina-1

IL1R1 = receptor de interleucina-1, tipo I

IL-1R1 = receptor de interleucina-1, tipo I

IL-1 β = interleucina-1-beta

iNOS = óxido nítrico sintase induzida

IRAK-1 = receptor interleucina-1 kinase 1 associada

IRAK-4 = receptor interleucina-1 kinase 4 associada

IRF= fator regulatório de interferon

IRF3 = fator 3 regulatório de interferon

IkB α = kinase inibitória do fator nuclear kappa-B subunidade beta I

JNK = kinase N-terminal c-Jun

KEGG – Enciclopédia Kyoto de genes e genomas

kg = quilograma

LBP = proteína ligante de LPS

LPS = lipopolissacarídeo

LPS-LBP-CD14 = complexo de ligação do lipopolissacarídeo com a proteína ligante de LPS e o antígeno de diferenciação de agrupamento CD14

MAP3K3 = proteína quinase ativadora de mitógeno kinase 3

MAP3K8 = proteína kinase mitógeno activada kinase 8

MAPK1 = proteína kinase ativadora de mitógeno kinase 1

MAPK14 = proteína kinase ativadora de mitógeno kinase 14

MD-2 = proteína acessória de diferenciação mielóide-2

mg = miligrama

mL = mililitro

mM = milimolar

MPP = Mass Profiler Professional Software Agilent

mRNA = RNA mensageiro

MyD88 = diferenciação primária de resposta mielóide gene 88

NFKB1A = fator nuclear kappa de cadeia leve gene potencializador na inibição de células B, alfa

NFKB1E = fator nuclear kappa de cadeia leve gene potencializador na inibição de células B, epsilon

NF- κ B = fator nuclear kappa B

ng = nanograma

nM = nanomolar

p38 = kinase ativadora de proteína mitógeno 38

PBS = solução salina tamponada

PBS T = solução salina tamponada contendo 0,05% de Tween 20

PCR = reação em cadeia da polimerase

pmol = picomolar

RNA = ácido ribonucleico

RNAse 1 = Ribonuclease I

SAPK = proteínas kinases ativadas pelo estresse

TAB1 = proteína 1 ligada a TAK1

TBK-1 = proteína kinase serina/treonina ou kinase 1 ligadora – TANK

TE = tolerância à endotoxina

TGF- β = fator transformador de crescimento beta

TIR = domínio citoplasmáticos tipo Toll/1L-1R

TIRAP = adaptador de proteína contendo domínio TIR

TLR-1 = receptor toll-like -1

TLR-2 = receptor toll-like -2

TLR-3 = receptor toll-like -3

TLR-4 = receptor toll-like -4

TLR-6 = receptor toll-like -6

TLR-7 = receptor toll-like -7

TLR-8 = receptor toll-like -8

TLR-9 = receptor toll-like -9

TLRs = receptores Toll-like

TNFAIP3(A20) = proteína 3 indutora de fator de necrose tumoral alfa

TNF- α = fator de necrose tumoral

TOLLIP = proteína de interação TOLL

TRAM = cadeias de translocação associada a proteína 1 de membrana

TRIF ou TICAM1 = adaptador contendo domínio TIR induzindo Interferon- β

USP = Universidade de São Paulo

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1** - Via de sinalização de TLR-4 ativada. (A) Seguindo a ligação do LPS aos receptores e ativação da via TLR-4 através de duas principais moléculas adaptadoras MyD88, e TRIF. Na via dependente de MyD88, IRAK4 IRAK1 e são fosforilados, em seguida, o complexo se dissocia e ativa TRAF6. TRAF6 ativa a MAP quinase ERK, JNK e p38, bem como o complexo IKK. IKK fosforila I κ B α , levando a sua degradação, libertando NF κ B para entrar no núcleo e ativar a transcrição de genes. Na via dependente TRIF, TBK-1 fosforila IRF3, que dimeriza e, em seguida, entra no núcleo para transcrever os genes tipo IFN-1 induzíveis. Sinalização TRIF também leva a uma resposta retardada de NF κ B. Fonte: (FOSTER; MEDZHITOV, 2009).....27
- FIGURA 2** - Delineamento experimental. LPS₁ indica o primeiro estímulo com lipopolissacarídeo nas diferentes concentrações (1 ou 10 ng/mL ou tampão PBS 1x (0 ng/mL); LPS₂, o estímulo secundário com lipopolissacarídeo (1 ou 10 ng/mL) ou tampão PBS (0 ng/mL). Os momentos da colheita (0, 2, 4 e 8 horas) das amostras de sangue para a extração de RNA também estão indicados na figura.....31
- FIGURA 3** - Diagrama de Venn com a correlação entre diferentes interações. tempo, dose e tempo-dose. ANOVA 2 fatores com teste de correlação múltipla Benjamini-Hochberg $p < 0,05$34
- FIGURA 4** - Distribuição dos 58 genes relacionados às vias de sinalização do TLRs e outras possíveis vias que participam. Distribuição dos genes conforme a categoria de classificação geradas pelo GeneOntology – Panther Classification System (<http://geneontology.org/page/go-enrichment-analysis>).....36
- FIGURA 5** - Vias de sinalização MyD8-dependente e TRIF-dependente dos receptores TLR-2 e -4., gerados pelo KEGG, via DAVID. Proteínas destacadas com estrelas vermelhas representam os genes, da via de TLRs, encontrados na correlação tempo, dose e tempo-dose, nas análises do GeneSpring VS 13.1 ($p < 0,05$) (<https://david.ncifcrf.gov/home.jsp>).36
- FIGURA 6** – Perfil de expressão dos transcritos dos receptores (A) TLR-4 e (B) -2, normalizados e com “fold change” ≥ 2 , após estimulação com a

primeira dose de 0, 1 ou 10 ng de LPS/mL (tempos 2 e 4) e 4 horas após a segunda estimulação com LPS (tempo 8).....40

FIGURA 7 - Perfil de expressão do transcrito MyD88 normalizado e com "fold change" ≥ 2 , após estimulação com a primeira dose de 0, 1 ou 10 ng de LPS/mL (tempos 2 e 4) e 4 horas após a segunda estimulação com LPS (tempo 8).41

FIGURA 8 - Perfil de expressão dos transcritos dos receptores (A) TRAM2 e (B) TRIF, normalizados e com "fold change" ≥ 2 , após estimulação com a primeira dose de 0, 1 ou 10 ng de LPS/mL (tempos 2 e 4) e 4 horas após a segunda estimulação com LPS (tempo 8).42

FIGURA 9 - Perfil de expressão dos transcritos: (A) TNF- α , (B) IL-1b, (C) IL-6 e (D) IL-10 normalizados e com "fold change" ≥ 2 , após estimulação com a primeira dose de 0, 1 ou 10 ng de LPS/mL (tempos 2 e 4) e 4 horas após a segunda estimulação com LPS (tempo 8).452

FIGURA 10 - Perfil de expressão dos transcritos: (D) IL-10 e (E) TNFAIP3, normalizados e com "fold change" ≥ 2 , após estimulação com a primeira dose de PBS 1x, 1 ou 10 ng de LPS/mL (tempos 2 e 4) e 4 horas após a segunda estimulação (tempo 8).....43

INDUÇÃO DIFERENCIAL DAS VIAS MyD88 E TRIF-DEPENDENTES EM LEUCÓCITOS TOTAIS DE EQUINOS ESTIMULADOS COM LPS DE *E. coli*

RESUMO - A resposta imune inata é a principal responsável pela defesa do hospedeiro contra endotoxinas de bactérias Gram-negativas. Tal resposta se dá através dos receptores Toll-like-4 e -2, seja pela via MyD88-dependente, TRIF-dependente ou ambas. Entretanto, uma resposta exagerada pode resultar em muitos danos para o organismo e levar até mesmo ao choque séptico. Uma das formas de controle desta resposta se dá através da tolerância à endotoxina (TE). Por isso o presente estudo tem por objetivo investigar a indução diferencial dos receptores TLR-4 e 2, suas vias de sinalização MyD88 e TRIF-dependentes e avaliar outros possíveis genes relacionados a estas vias após indução da TE. Foi coletado sangue total de cavalos saudáveis (n=6), o qual foram estimulados com diferentes doses (0, 1 ou 10ng de LPS/mL) LPS de *E.coli* no momento 0 e 4 horas após o primeiro estímulo e 4 horas após o segundo estímulo. O “pool” (n=6) de RNA das amostras, coletado 0, 2, 4 e 8 horas, foi utilizado para a transcrição do cDNA. A hibridização do cDNA marcado com Cy-3 foi realizada em uma lâmina 4x44 contendo sequências específicas da espécie equina. Foi identificado durante a TE, nas diferentes doses de LPS, um aumento de transcritos dos receptores TLR-4 e -2, TNFAIP3 e IL-10 e uma diminuição de outros transcritos de genes importantes, tais como: MyD88, IL1- β , TNF- α , TRAM2, o que caracteriza e esclarece, de certa forma, as alterações na sinalização do TLR nas condições de tolerância à endotoxina.

Palavras-Chave: linfotóxina- α ; receptor 4 toll-like; receptor 2 toll-like; interleucina-1; interleucina-6

DIFERENCIAL INDUCTION OF MyD88 AND TRIF-DEPENDENT PATHWAY IN EQUINE LEUKOCYTES STIMULATED WITH LPS FROM *E. coli*

SUMMARY - The innate immune response is the main responsible for the host's defense against endotoxins from Gram-negative bacteria. Such response occurs via Toll-like-4 and -2 receptors, MyD88-dependent pathway, TRIF-dependent pathway or both. However, an exaggerated response can induce many damages to the organism, including septic shock. One way to control this exacerbated response is through endotoxin tolerance (ET). The goals of the present study were to investigate TLR-4 and 2 receptors, their signaling through MyD88 e TRIF-dependent pathways and evaluate other possible genes related to this ways after ET induction. Blood samples were collected from healthy horses (n=6) which were stimulated with different doses (0, 1 or 10ng of LSP/mL) of LPS from *E.coli*, for 0 and 4 hours after the first stimulus and 4 hours after second stimulus. The pool (n=6) of RNA, extracted from the samples collected at 0, 2, 4 e 8 hours, was used for the transcription of the cDNA. The hybridization of the cDNA marked with Cy-3 was done in one slide 4x44 containing specific sequences from the equine species. We identified during the ET, on the different doses of LPS, an increase of transcripts for the receptors TLR-4 and -2, TNFAIP3 and Il-10 and a reduction of transcripts of other important genes, such as: MyD88, IL1 β , TNF- α , TRAM2, what characterizes and enlightens the changes in TLR signaling during endotoxin tolerance.

Key-words: linfotoxin- α , toll-like receptor 4; toll-like receptor 2; interleukin-1, interleukin-6.

I INTRODUÇÃO

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 (BAYSTON; COHEN, 1990), sendo responsável por grandes perdas econômicas relacionadas aos custos com tratamento, possíveis complicações e morte (LOHMANN et al., 2003).

Os efeitos clínicos causados pelas endotoxinas incluem depressão, taquicardia, pirexia, taquipnéia e laminite, e em casos mais graves 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). Esses sinais clínicos estão presentes a despeito 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 Gram-negativa (MOORE, 2001).

O lipopolissacarídeo é o componente bacteriano mais importante na fisiopatologia da endotoxemia (MOORE, 2001) e ele é liberado quando ocorre replicação bacteriana rápida, lise ou morte do microorganismo (MORRIS; MOORE, 1989; OLSON et al., 1995).

O lúmen intestinal do equino contém normalmente uma grande quantidade de endotoxinas (MORRIS; MOORE, 1989), 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. Desta maneira alcançam a corrente circulatória (COLLATOS, 1995; MOORE, 1995), o que acarreta a ativação das células do hospedeiro, as quais são responsáveis pela mediação dos eventos patológicos, uma vez que passam a produzir mediadores inflamatórios frente à endotoxina (BARTON et al., 1996; MOORE, 1995; MORRIS; MOORE, 1989; MORRISON et al., 1994; ROBERTS, 1995; SEETHANATHAN et al., 1990). Os leucócitos são as células responsáveis pela resposta à endotoxemia (WRIGHT et al., 1990). Esta célula possui a capacidade de reconhecer o LPS e de ativar o sistema imune inato pela liberação de vários mediadores diferentes, 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 de neutrófilos, sua degranulação e aderência ao endotélio, indução de febre, aumento da síntese de catecolaminas e atividade pró-coagulante. Com isso ocorre microtrombose, extravasamento capilar e necrose hemorrágica em órgãos vitais como pulmão, coração, fígado, rins e trato gastrintestinal (GYETKO et al., 1992).

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 (BERETA et al., 1990) e na indução da febre (LEMAY et al., 1990) (OPP et al., 1989). As maiores concentrações de IL-6 coincidem com a resposta febril induzida pela endotoxina (MOORE, 1999), e a concentração desta citocina está aumentada em relação a valores basais de 1 a 8 horas após o estímulo com LPS (BUENO et al., 1999).

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 pode relacionar-se a desativação dos fagócitos mononucleares e a inibição da síntese de citocinas pró-inflamatórias (FIORENTINO et al., 1991).

Foram identificados receptores da resposta inata, Toll-like (TLRs) (HASHIMOTO et al., 1988; BAKER et al., 1997; MEDZHITOV et al. 1997), que são glicoproteínas de membrana integral tipo I, responsáveis por fazer a comunicação entre o meio externo e interno da célula (MOORE, 2001). 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 e na atividade de produtos de microorganismos invasores (TAKEUCHI; AKIRA, 2001).

Embora o LPS seja um potente ativador celular, desafios repetidos à endotoxina podem levar a uma falta de sensibilidade temporária das células para subsequente estimulação com o lipopolissacarídeo (BISWAS; LOPEZ-COLLAZO, 2009; OGAWA et al., 2003). Esta insensibilidade temporária é conhecida como tolerância à endotoxina (TE) e ocorre em diferentes tipos celulares e em diferentes modelos experimentais. A tolerância ao LPS é considerada uma resposta adaptativa que se desenvolve como um mecanismo de proteção contínua para atenuar a resposta do hospedeiro infectado contra os organismos invasores, como as bactérias e desse modo reduzir o efeito tóxico e a produção excessiva de mediadores inflamatórios (OGAWA et al., 2003). Macrófagos de ratos e monócitos de humanos apresentam estado de tolerância em resposta à reestimulação, *in vivo* e *in vitro*, com LPS (BISWAS; LOPEZ-COLLAZO, 2009). Repetidas doses de LPS em macrófagos e monócitos de humanos conduz a uma diminuição das citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF- α e IL-1 (YOZA et al., 2000). Como resultado à TE, há a mudança de uma resposta pró-inflamatória para uma resposta com características anti-inflamatórias (COLLINS; CARMODY, 2015).

Sabe-se que a TE, além de ser um mecanismo de proteção contra o choque séptico, causado pela endotoxemia, possui uma resposta variada entre as espécies (MOORE, 2001). Visto que a espécie equina é uma das mais sensíveis às variações da resposta à endotoxemia e das respostas a tolerância à endotoxina, além de ser utilizada como modelo experimental para a sepse em humanos, torna-se necessário um conhecimento mais profundo sobre as alterações celulares que ocorrem no estado de TE nesta espécie, tanto a nível dos receptores TLRs quanto a nível dos segundos mensageiros das suas vias de sinalização.

II REVISÃO DE LITERATURA

Grande parte de produtos oriundos de bactérias Gram negativas, como a *Escherichia coli* (*E. coli*) e a *Salmonella spp*, tem capacidade de desencadear alterações fisiológicas e imunológicas, tanto em humanos, como em animais. Uma destas alterações é a síndrome clínica conhecida como endotoxemia, que se origina da resposta ao lipopolissacarídeo (LPS) presente na membrana externa das bactérias Gram-negativas como *E. coli*. O LPS é uma endotoxina termoestável liberada na forma insolúvel após lise bacteriana, decorrente da autólise da lise externa mediada por complemento e da lisozima da digestão fagocítica celular ou então da replicação rápida destas bactérias (MORRISON; ULEVITCH, 1978). Estruturalmente, todas as formas de LPS das bactérias são compatíveis e suas moléculas são compostas por 3 porções: uma região polissacarídica externa (antígeno O), uma região central monossacarídica e uma porção chamada de lipídio-A, que é um constituinte da parte interna da membrana e rico em ácidos graxos (MORRISON; ULEVITCH, 1978).

O lipídio-A é a porção do LPS associada à toxicidade, sendo responsável pela maioria dos efeitos deletérios da endotoxina (CROSS, 2002; MOORE, 2001). Na maioria dos mamíferos, a presença do LPS na corrente sanguínea leva a uma rápida resposta, desencadeando uma cascata inflamatória, sendo que, a espécie equina é uma das mais sensíveis, pois uma dose de apenas 0,025 mg/kg é suficiente para desencadear os sinais clínicos desta síndrome (MOORE, 2001). Outro agravante para esta espécie é a grande quantidade de endotoxinas presente no trato gastro intestinal de animais saudáveis, uma vez que, as bactérias Gram-negativas fazem parte da flora intestinal e sofrem morte celular e rápidas replicações neste ambiente. Contudo, quando os equinos apresentam alterações gastrointestinais ou dor abdominal (síndrome cólica), há um desequilíbrio da barreira do epitélio intestinal o que favorece a entrada do LPS na circulação sanguínea, prova

disso é que de 35 a 45% dos animais com enfermidades gastrointestinais possuem endotoxinas na circulação sanguínea (MOORE, 2001).

Os achados clínicos mais comuns em equinos com quadro de endotoxemia incluem: anormalidade da coloração de membranas mucosas que se inicia com uma “linha tóxica” ao redor dos dentes, prolongamento do tempo de preenchimento capilar, aumento das frequências respiratória e cardíaca, febre e hemoconcentração (CAMPEBELL et al., 2007).

O termo endotoxemia, concebido Pfeiffer, foi criado para nomear as toxinas que não eram identificadas em organismos vivos (MOORE, 2001) e acreditava-se que estas endotoxinas estavam presentes no interior das bactérias, uma vez que, era possível descrever biologicamente sua atividade em culturas filtradas de bactérias Gram-negativas (MORRISON et al., 1994). Entretanto, estudos subsequentes mostraram que estas toxinas não eram provenientes do interior da bactéria e sim de sua membrana externa e que consistiam em lipopolissacarídeos (MOORE, 2001).

Quando as endotoxinas atingem a corrente circulatória, podem interagir com proteínas circulantes e células sanguíneas ou podem ser removidas por macrófagos fixados nos tecidos do fígado, baço e pulmão (MOORE, 2001). As células mononucleares, por exemplo, os monócitos do sangue ou macrófagos dos tecidos, são cruciais no “policiamento” tanto dos tecidos quanto do sistema sanguíneo (MORRISON; ULEVITCH, 1978) e o LPS tem capacidade de induzi-las (PAIK et al., 2003). Uma vez ativadas pelo LPS, estas células produzem uma gama de citocinas pró-inflamatórias, incluindo TNF- α , IL-1, IL-6, IL-12 (CROSS, 2002; NOMURA et al., 2000), interferon- β (IFN- β), citocinas da classe das quimiocinas, responsáveis pelo controle da migração de células imunes para locais com reações inflamatórias ou infecções, (ZÍDEK et al., 2009) e até mesmo síntese de óxido nítrico sintase induzida (iNOS) (PALSSON-MCDERMOTT; O’NEILL, 2004).

O TNF- α , por sua vez, estimula a síntese de outros mediadores inflamatórios (interleucinas, eicosanóides) da resposta de fase aguda e da febre. Ele também parece ser responsável pela síntese e liberação de mediadores anti-inflamatórios como IL-10 (MOORE, 2001), que parece operar como desativador dos fagócitos mononucleares e também como inibidor da síntese de citocinas pró-inflamatórias (CAVAILLON et al., 2003; MOORE, 2001). O interferon- γ (IFN- γ) induz a transcrição de componentes da resposta inflamatória de fase aguda como a ceruloplasmina (ANDERSON, 2010).

Em 1990 descobriu-se que o receptor de superfície celular CD14, denominado antígeno de diferenciação de agrupamento CD14, presente em células mononucleares, atua como um dos principais receptores de LPS (BEUTLER; POLTORAK, 2000). Porém para que o LPS se ligue de forma eficiente ao CD14 ele deve estar acoplado a uma proteína ligadora do LPS (LBP) e só assim formar o complexo LPS-LBP-CD14 (MORRISON et al., 1994; THOMAS et al., 2006). Aparentemente, a ligação deste complexo (LPS-LBP-CD14) na superfície celular por si só não é suficiente para induzir o sinal de transdução e consequentemente levar à ativação celular e à produção de TNF- α e outras citocinas (CAVAILLON et al., 1996). Esta ineficiência na ativação celular pode ser explicada pelo fato de o receptor CD14 não possuir um domínio trans membrana e, por conseguinte, não conseguir ativar de forma direta o sistema mensageiro secundário ou o caminho para transdução de sinais, responsável pela síntese e liberação dos mediadores pró-inflamatórios e anti-inflamatórios (MOORE, 2001).

Contudo, ao estudarem os genes da *Drosophila*, identificaram a presença de outros receptores na superfície celular, denominados Toll-like (TLRs), que são responsáveis por discriminar moléculas patogênicas de moléculas corpóreas (TAKEDA et al., 2003) e por induzirem a expressão dos genes envolvidos na resposta inflamatória, ou seja, iniciarem a via de transdução de sinais (DOBROVOLSKAIA et al., 2003; TAKEDA; AKIRA, 2005; TAKEDA, 2005). Isto é possível uma vez que os TLRs, ao contrario do CD-14,

são dotados de componentes intracelulares e transmembrana que permitem a comunicação entre os elementos exteriores e interiores das células (KAWAI; AKIRA, 2009; MOORE, 2001), levando à produção de citocinas (IL-1, IL-6, IL-12, IL-10 e TNF- α) (LI et al., 2010; LI; QIN, 2005).

Os TLRs são membros da superfamília dos receptores interleucina 1 (IL-1R) que compartilham grande homologia dos domínios citoplasmáticos Toll/IL-1R (TIR) e um domínio extracelular rico em repetições de leucinas (TSAN; GAO, 2007). Já foram identificados treze membros da família de receptores Toll-likes em mamíferos, dos quais onze são expressos em humanos (TSAN; GAO, 2007), sendo estes receptores distribuídos diferentemente nas células. Os receptores Toll-like 1 (TLR-1), Toll-like-2 (TLR-2) e Toll-like-4 (TLR-4) são expressos na superfície celular, enquanto que os Toll-like-3 (TLR-3), Toll-like-7 (TLR-7), Toll-like-8 (TLR-8) e Toll-like-9 (TLR-9) foram demonstrados em compartimentos intracelulares (TAKEDA; AKIRA, 2005).

Funcionalmente, cada receptor possui papel diferenciado. O Toll-like-2 está envolvido na resposta a uma variedade de componentes bacterianos, incluindo o LPS (TAKEDA; AKIRA, 2005; TAKEDA et al., 2003). Estudos recentes indicaram que o receptor Toll-like-2 é o primeiro a traduzir o sinal molecular de LPS de certas bactérias Gram-negativas (não enterobactérias), embora o principal receptor Toll-like envolvido na sinalização de LPS seja o Toll-like-4 (TLR-4) (DOBROVOLSKAIA et al., 2003). É possível que o receptor Toll-like-2 interaja com outros TLRs para explicar a sinalização em certas bactérias Gram-negativas não enterobactérias (HIRSCHFELD et al., 2001), pois alguns autores (OZINSKY et al., 2000) acreditam que o domínio TIR do TLR-2 é ativado não por uma interação homotípica e sim por uma interação heterotípica como o domínio TIR do TLR-1 ou TLR-6 (MIYAKE, 2006).

O Toll-like-4 é o principal reconhecedor dos componentes microbianos, o LPS (DOBROVOLSKAIA et al., 2003; TAKEDA; AKIRA, 2005; TAKEDA et al., 2003; TAKEUCHI; AKIRA, 2001; YANG et al., 2011) e para alguns ele também

está envolvido na quimiotaxia de macrófagos (WU et al., 2009). Contudo, para que o TLR-4 torne-se responsivo ao LPS e exerça sua função é necessária sua associação com a proteína acessória de diferenciação mielóide-2 (MD-2) (PAIK et al., 2003), da qual ele é estritamente dependente (BRANDL et al., 2005). Quanto à via de sinalização intracelular, esta é elucidada pelo domínio TIR que é conservado entre as regiões citoplasmáticas de todos os receptores da família Toll-like (TSAN; GAO, 2007; YAMAMOTO et al., 2003) e, assim como os receptores IL-1 e IL-18, ele demonstra capacidade de se ligar com adaptadores moleculares intracelulares, favorecendo a cascata de sinalização (DOBROVOLSKAIA et al., 2003).

A evolução desta cascata só é viável devido à interação dos domínios TIRs dos TLRs com domínios TIRs específicos que contém proteínas adaptadoras, tais como: Fator de Diferenciação Mielóide 88 (MyD88), Adaptador-like MyD88 (MAL ou TIRAP), adaptador contendo domínio TIR induzindo Interferon- β (TRIF ou TICAM1) e a cadeia de translocação associada a proteína 1 de membrana (TRAM) (DOBROVOLSKAIA et al., 2003; KENNY et al., 2009; LI; QIN, 2005). As proteínas quinases associadas ao IL-1RI (IRAKs) têm um importante papel nas vias de sinalização e por isso alguns as consideram como mediadores centrais da sinalização dos TLRs (TAKEDA; AKIRA, 2005). Acredita-se que a IRAK-1 seja um componente integral e essencial das vias de sinalização do LPS, TNF- α e da IL-1, que regula o fator nuclear kappa B (NF- κ B) (LOCKETT et al., 2008) (Figura 1).

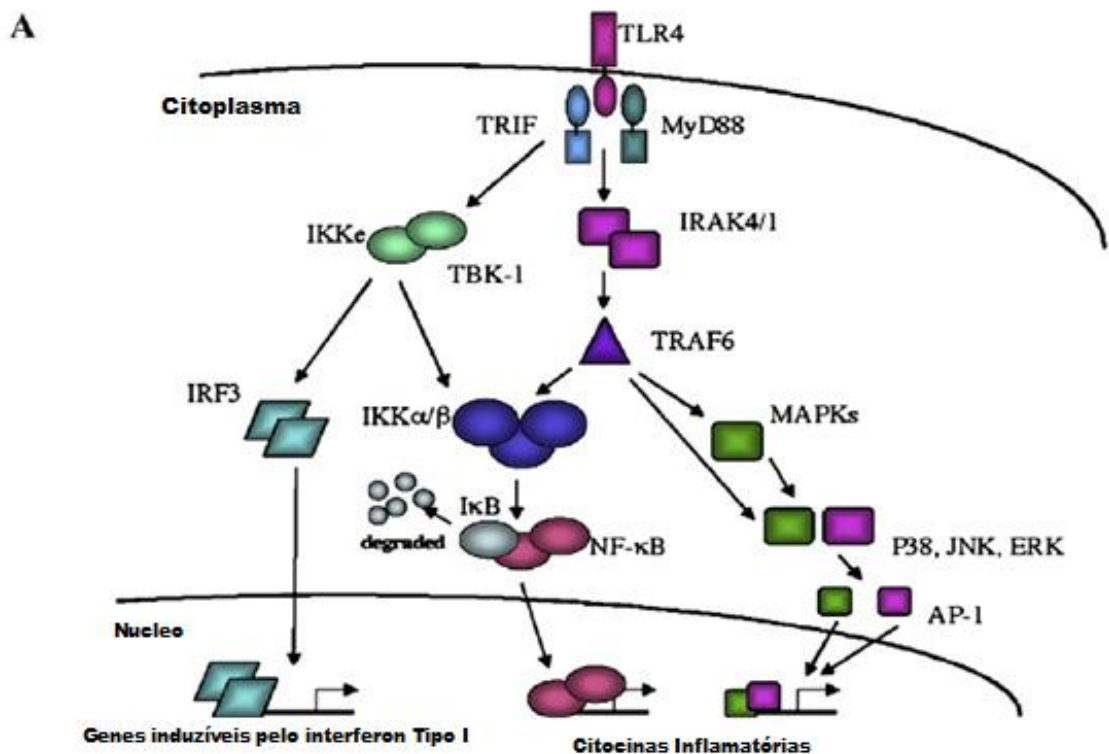


FIGURA 1 - Via de sinalização de TLR-4 ativada. (A) Seguindo a ligação do LPS aos receptores e ativação da via TLR-4 através de duas principais moléculas adaptadoras MyD88, e TRIF. Na via dependente de MyD88, IRAK4 IRAK1 e são fosforilados, em seguida, o complexo se dissocia e ativa TRAF6. TRAF6 ativa a MAP quinase ERK, JNK e p38, bem como o complexo IKK. IKK fosforila IκB, levando a sua degradação, libertando NFκB para entrar no núcleo e ativar a transcrição de genes. Na via dependente TRIF, TBK-1 fosforila IRF3, que dimeriza e, em seguida, entra no núcleo para transcrever os genes tipo IFN-1 induzíveis. Sinalização TRIF também leva a uma resposta retardada de NFκB. Fonte: (FOSTER; MEDZHITOV, 2009).

Apesar de divergirem quanto ao reconhecimento de padrões moleculares associados à danos (DAMPs) (VARTANIAN et al., 2011) e de padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs), os TLRs compartilham as vias de sinalização intracelular, através do recrutamento de moléculas adaptadoras que conduzem a ativação de fatores de transcrição (TSAN; GAO, 2007). Com isso, o resultado final desta cascata de sinalização é a ativação dos fatores de transcrição como NF-κB e dos fatores regulatórios de interferon (IFN) sendo que os produtos finais desta cascata são as citocinas, quimiocinas assim como algumas moléculas anti-inflamatórias (KENNY et al., 2009; TSAN; GAO, 2007). A maioria dos sinais de ativação da cascata de ativação do NF-κB tem início na membrana plasmática e convergem a nível do complexo IKK, o

qual contém quinase- α I κ B α (IKK α) e IKK β (LOCKETT et al., 2008), levando à fosforilação destas proteínas inibidoras e consequentemente à translocação do NF- κ B para o núcleo da célula (LI et al., 2010; SILVERMAN, 2001) gerando a ativação de mais de 200 genes (LOCKETT et al., 2008).

A exposição repetitiva à endotoxina (LPS), independentemente da dose utilizada, resulta em uma resposta inflamatória reprimida, com diminuição das citocinas pró-inflamatórias, definida como “tolerância à endotoxina” (TE) (CARRENHO, 2009). Esta já foi documentada em modelos *in vitro* utilizando células endoteliais da microcirculação intestinal de humanos (OGAWA et al., 2003), *in vivo* utilizando camundongos (ARIGA et al., 2014) e *ex vivo* utilizando células mononucleares de humanos (FONTAINE et al., 2014). Muitas simulações neste último modelo têm demonstrado um decréscimo na expressão de citocinas (CROSS, 2002). Isto também foi observado em um estudo do nosso grupo sobre a modulação da expressão de citocinas em equinos durante a TE, no qual foi possível demonstrar a diminuição de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 e IL-6), aumento da citocina anti-inflamatória IL-10 e aumento da expressão dos receptores Toll-like-2 e -4, mostrando que a tolerância nesta espécie possa estar relacionada ao mecanismo de ativação das vias de sinalização intracelulares (CARRENHO, 2009). Há relatos de que os mediadores das vias de sinalização e da transdução, como o fator nuclear- κ B (NF- κ B), IRAKs, a proteína MyD88, ERK, e proteínas kinases ativadas pelo estresse (SAPK), dentre outros, possam estar inibidos durante a tolerância em macrófagos e monócitos de humanos (CAVAILLON et al., 2003). Contudo, durante o estado de tolerância as respostas são muito variáveis (CROSS, 2002) sendo que, há ainda, a tolerância cruzada, que ocorre tanto entre os diferentes receptores TLRs quanto entre os diferentes PAMPs (CAVAILLON et al., 2003; GNAUCK et al., 2015). Sabe-se também que a regulação do estado da TE ocorre em diversos níveis das vias de sinalização (QUINN et al., 2012). Em análises moleculares, a TE associou-se à redução dos complexos TLR-4-MyD88, à perturbações da

atividade da enzima IRAK-1 e à defeitos na ativação do NF- κ B (BISWAS et al., 2007; FAN; COOK, 2004). Também já foi descrito a regulação deste estado através dos microRNAs, sendo os miR-221, miR-579, miR-125b, miR-155 e o miR-146a, os mais importantes nesta regulação (QUINN et al., 2012). Pesquisas também apontam fatores epigenéticos na regulação destas vias de sinalização. Células do epitélio alveolar tolerantes, provenientes do pulmão de camundongos ou de uma linhagem celular de camundongos (MLE-12), tratadas com um inibidor específico da atividade deacetilase de histonas, a triscotatina (TSA), apresentam uma reversão do fenótipo de tolerância (NEAGOS et al., 2015).

Devido aos inúmeros fatores que podem envolver e levar ao quadro de tolerância, tanto em outras espécies quanto na espécie equina, assim como os diferentes padrões da resposta do TLR-4 e -2 em leucócitos de equinos quando induzidos à TE, encontrados por estudos do nosso grupo (CARRENHO, 2009). O presente trabalho tem por objetivo investigar os mecanismos celulares das vias de sinalização MyD88-dependente e TRIF-dependentes através da avaliação da expressão dos segundos mensageiros envolvidos na resposta celular desencadeada pelos receptores TLR-4 e TLR-2, bem como identificar novos genes que contribuam para essa diferença na resposta celular ao LPS, através da técnica global de microarranjos de oligonucleotídeos, em um modelo *ex vivo* de indução à TE em leucócitos de equinos.

III MATERIAL E MÉTODO

3.1 Animais

Foram utilizadas seis éguas (não prenhes) adultas e saudáveis, com idade média de 8 anos ($8\pm$), peso médio de 450 kg ($450\pm$), pertencentes à raça Quarto-de-Milha. Os animais foram avaliados clinicamente, vermifugados com Eqvalan¹ e possuíam valores normais de hemograma e sem histórico anterior de doença gastrointestinal ou de cirurgia abdominal. O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética e Bem-Estar da Unesp-Araçatuba (2008/007550).

3.2 Modelo *ex vivo*

As amostras de sangue dos equinos foram colhidas por venopunção jugular em tubos contendo EDTA² e incubadas durante 8 horas na ausência (PBS 1x estéril, 0,01 M e pH 7,2) ou presença (1 ou 10 ng/mL) de LPS, derivado de *Escherichia coli* (O55:B5),³ sendo que, após 4 horas do início da incubação, as amostras foram reestimuladas com tampão PBS 1x (0,01 M e pH 7,2) ou com LPS de *E. coli* (1 ou 10 ng/mL) (CARRENHO, 2009). As amostras do grupo controle (14,5 mL de sangue total, mantidas em tubos falcons de 15 mL) foram estimuladas com 500 μ L de tampão PBS 1x estéril (0,01 M e pH 7,2), enquanto que as amostras de sangue total dos grupos tratados foram estimuladas com 500 μ L de uma solução contendo 1 ou 10 ng de LPS/mL, derivado de *E. coli* (O55:B5), e em seguida incubadas por 8 horas à 37°C, com

¹ Eqvalan Pasta Merial, Campinas, SP, Brasil

² EDTA K3 1, BD Vacutainer Plymouth, Devon, Reino Unido

³ *Escherichia coli* (O55:B5)[®] Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA

5% de CO₂, em uma rotisserie⁴. Alíquotas de 500 µL foram retiradas nos momentos 0, 2, 4 e 8, para a extração de RNA (Figura 2).

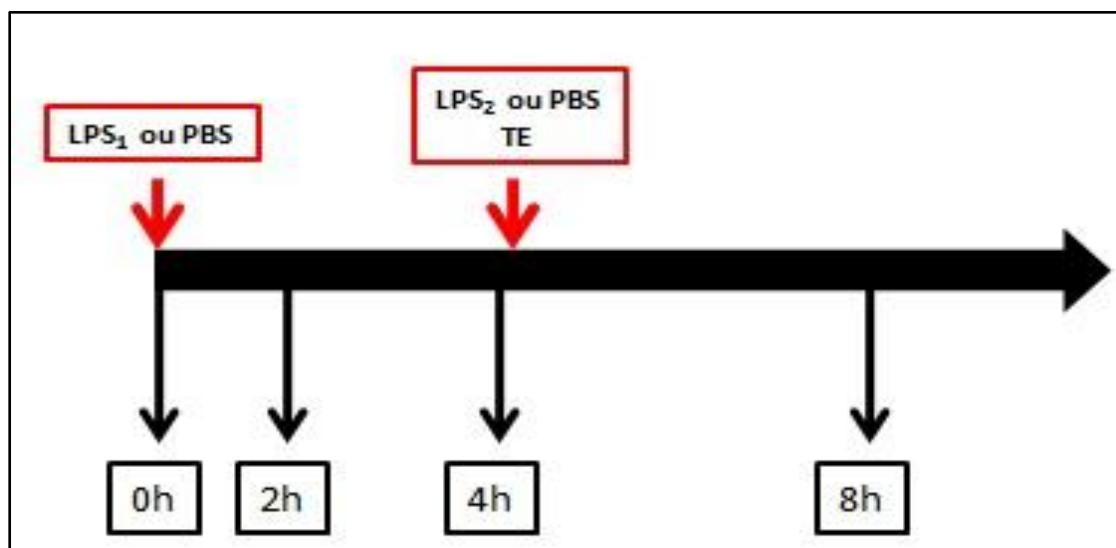


FIGURA 2 - Delineamento experimental. LPS₁ indica o primeiro estímulo com PBS 1x ou lipopolissacarídeo nas diferentes concentrações (1 ou 10 ng/mL). LPS₂, demonstra o estímulo secundário com tampão PBS 1x ou lipopolissacarídeo (1 ou 10 ng/mL). Os momentos da colheita (0, 2, 4 e 8 horas) das amostras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

3.3 Purificação de RNA mensageiro de sangue total

De cada amostra incubada com ou sem LPS, 500 µL de sangue total foram transferidos para tubos eppendorf para a lise e isolamento total do RNA com Trizol⁵, segundo as instruções do fabricante. O RNA extraído das amostras foi quantificado por espectrofotômetro⁶ e armazenado em freezer - 80°C.

3.4 “Pools” e Tratamento das amostras

⁴ Labquake Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, EUA

⁵ Trizol, Thermo Fisher Scientific Inc, Grand Island, NY, EUA

⁶ Nanovue Spectrophotometer, GE Healthcare, Indio, CA, EUA

Os “pools” (n=6) foram feitos conforme os diferentes tratamentos (PBS 1x, 1 ou 10 ng de LPS/mL) e os diferentes momentos (0, 2, 4 e 8 horas) e preparados para a concentração final de 1000ng de RNA/pool. Em seguida estes foram tratados com DNase 1 e passaram por colunas RNeasy para a remoção do DNA genômico, conforme o protocolo do kit comercial⁷. Os “pools” tratados e livres de DNA genômico foram quantificados em espectrofotômetro⁶, a qualidade do RNA foi checada em geis de agarose 1,2%, corados com GelRed⁸, e logo após armazenados a -80°C.

3.5 Síntese de cDNA, Transcrição, Marcação e Purificação

Foram adicionados aos “pools” 2 µL RNA Spike-In Kit, One-Color⁹ para o controle das reações. Já a síntese de cDNA foi realizada à partir de uma concentração de 34 ng de RNA total por “pool”, conforme o protocolo Low Input Quick Amp Labeling Kit, One-Color¹⁰. Também utilizou-se o T7 Promoter primer, o 5x First Strand Buffer, o DTT (0,1 M), o dNTP (10 mM) e o AffinityScript RNase Block Mix¹¹ para estas reações. A transcrição e a incorporação da Cyanine 3-CTP foram feitas conforme o protocolo Low Input Quick Amp Labeling Kit, One-Color⁹.

Após a purificação dos “pools”, feita pelo do RNeasyMini Kit¹², estes foram quantificados em espectrofotômetro⁶ e através dos valores gerados realizou-se o cálculo de rendimento e eficiência da reação, cujo os valores para lâminas 4x44k são no mínimo de 1,65 µg de cRNA e 6 pmol Cy-3 por µg de cRNA, respectivamente.

⁷ Qiagen RNeasy mini spin columns, Qiagen Inc, Valencia, CA, EUA

⁸ GelRedTM Nucleic Acid Gel Stain, 10,000X in water - 0,5 ml – Biotium Inc., Hayward, CA, EUA

⁹ RNA Spike-In Kit, One-Color, Agilent Technologies Corp., Santa Clara, CA, EUA

¹⁰ Low Input Quick Amp Labeling Kit, One-Color®, Agilent Technologies Corp., Santa Clara, CA, EUA

¹¹ AffinityScript RNase Block Mix, Agilent Technologies Corp., Santa Clara, CA, EUA

¹² RNeasyMini Kit, Qiagen Inc., Valencia, CA, EUA

3.6 Hibridização e leitura do *microarranjo* de oligonucleotídeos

O preparo para hibridização, que ocorreu em lâminas de vidro espotadas com “genes” da espécie equina (4x44K)¹³, foi feito através do Agilent Hybridization Kit¹⁴ com a adição do 10x Bloking Agent, 25x fragmentation Buffer e 2x Hybridization Buffer HI-RPM, conforme o protocolo Low Input Quick Amp Labeling Kit, One-Color⁹. As lâminas foram incubadas por 17 horas a 65°C em uma estufa de hibridização rotacional¹⁵, usando um sistema automático. Após esta etapa elas foram lavadas em tampões de lavagem Gene Expression Wash Buffer Kit¹⁶, embebidas na solução de acetonitrila¹⁷ e posteriormente na solução de estabilização¹⁸. A leitura das lâminas foi feita no aparelho G2565CA Microarray scanner¹⁹ com o Scan Control Software 8,5²⁰.

3.7 Análise do *microarranjo* de oligonucleotídeos

Os dados brutos gerados pelo scanner foram analisados usando software GeneSpring²¹, e os mesmos princípios foram aplicados para todas as análises. Neste software, após a subtração dos sinais de “background”, os valores foram ajustados com um “threshold” de 1,0 e normalizados pelo percentil 75 para cada gene. A análise estatística ANOVA 2 fatores (com teste de correlações múltiplas Benjamini-Hochberg $p < 0,05$) foi utilizada, e os valores gerados foram filtrados com base em um “fold change” (FC) maior ou igual a 2 conforme os diferentes tempos e doses. As listas dos genes diferencialmente expressos, geradas pelo GX/MPP v.13.1, foram exportadas

¹³ Horse Gene Expression Microarray, 4x44K Agilent Technologies Corp., Santa Clara, CA, EUA

¹⁴ Agilent Hybridization Kit, Agilent Technologies Corp., Santa Clara, CA, EUA

¹⁵ Hybridization oven rotator for Agilent Microarray Hybridization Chambers, Agilent Technologies Corp., Santa Clara, CA, EUA

¹⁶ Gene Expression Wash Buffer Kit, Agilent Technologies Corp., Santa Clara, CA, EUA

¹⁷ Acetonitrile, Agilent Technologies Corp., Santa Clara, CA, EUA

¹⁸ Stabilization Dry Solution, Agilent Technologies Corp., Santa Clara, CA, EUA

¹⁹ G2565CA Microarray scanner, Agilent Technologies Corp., Santa Clara, CA, EUA

²⁰ Scan Control Software 8,5, Agilent Technologies Corp., Santa Clara, CA, EUA

²¹ GeneSpring Gene Expression (GX) and Mass Profiler Professional (MPP)13.1, Agilent Technologies Corp., Santa Clara, CA, EUA

para o site Gene Ontology²², para o DAVID²³ e para o site KEGG²⁴, avaliando-se assim as principais vias metabólicas envolvidas.

IV RESULTADOS

Após a normalização dos dados e da análise estatística, pelo software GeneSpring, um diagrama de Venn foi gerado com as três possíveis correlações experimentais: tempo, dose e tempo-dose. Com isso identificamos 32.736 transcritos na correlação tempo, 20.888 na correlação dose e 26.176 na correlação tempo-dose. Grande parte dos transcritos relacionados às vias de sinalização do TLR-4 e -2 foram encontrados na intersecção entre as três interações (16.891) (Figura 3).

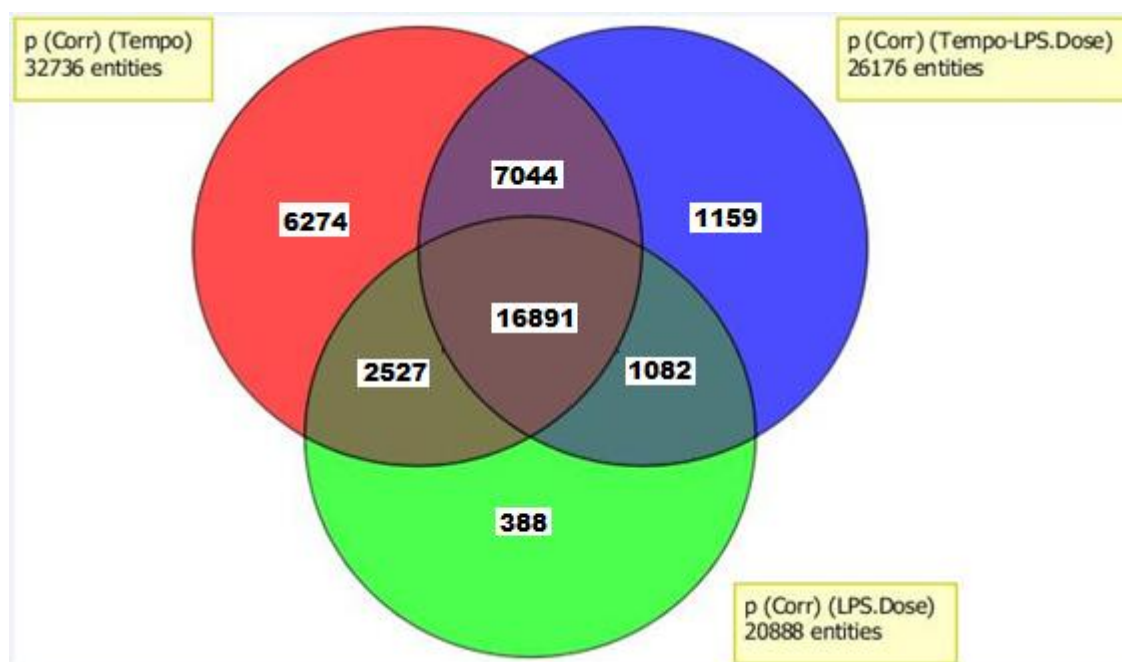


FIGURA 3 - Diagrama de Venn com a correlação entre diferentes interações: tempo, dose e tempo-dose. ANOVA 2 fatores com teste de correlações múltiplas Benjamini-Hochberg $p < 0,05$.

²² Gene Ontology Enrichment Analysis, disponível em: <<http://geneontology.org/page/go-enrichment-analysis>>

²³ DAVID Bioinformatic Database, disponível em: <<https://david.ncifcrf.gov/home.jsp>>

²⁴ Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, disponível em: <<http://www.genome.jp/kegg/>>

A lista de interações simples, com os EnsemblID dos 26.176 genes, entre as diferentes doses de LPS (1 e 10 ng/mL de LPS) e nos diferentes momentos (0, 2, 4 e 8 horas) da correlação tempo, dose e tempo-dose foi exportada para o Gene Ontology – Panther Classification System²², usando como base o banco de dados humanos, e um total de 6492 mil genes foram identificados e classificados conforme suas possíveis vias de sinalizações. Dentro desta classificação selecionamos a via de sinalização dos receptores TLRs, na qual, encontrou-se 44 genes e outras possíveis vias de sinalização que estes genes participam (Figura 4).

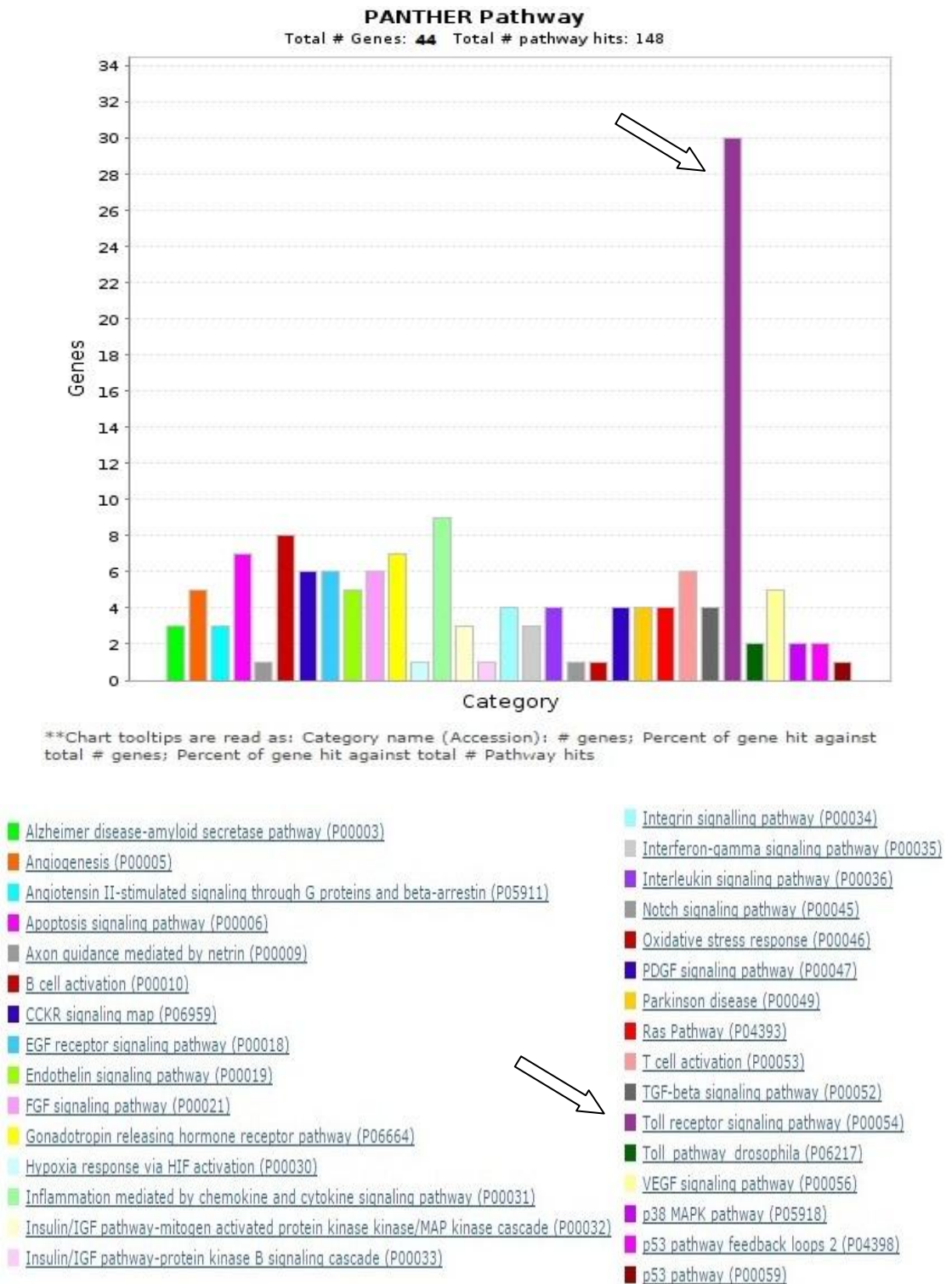


FIGURA 4 - Distribuição dos 44 genes relacionados às vias de sinalização do TLRs e outras possíveis vias que participam. Distribuição dos genes conforme a categoria de classificação geradas pelo GeneOntology – Panther Classification System (<http://geneontology.org/page/go-enrichment-analysis>).

Ao exportarmos para o DAVID²¹, a mesma lista de interações simples citada acima, geramos a cascata de sinalização, via KEGG²², tanto do TLR-4 quanto do TLR-2 e de outros genes da sinalização dos receptores TLRs (Figura 5).

FIGURA 5 - Vias de sinalização MyD8-dependente e TRIF-dependente dos receptores TLR-2 e -4., gerados pelo KEGG, via DAVID. Proteínas destacadas com estrelas vermelhas representam os genes, da via de TLRs, encontrados na correlação tempo, dose e tempo-dose, nas análises do GeneSpring VS 13.1 ($p < 0,05$) (<https://david.ncifcrf.gov/home.jsp>).

Ao analisarmos os valores de “fold change” (Apêndice A e B), presentes na lista das interações simples (correlação tempo, dose e tempo-doses, com 26.176 genes), dos principais genes (TLR-4, TLR-2, MyD88, TRAM2, TRIF, TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10 e TNFAIP3) relacionados às vias de sinalização dos TLRs-4 e -2, tendo como base a lista dos 44 genes encontrados no Gene Ontology – Panther Classification System²², observamos que: os transcritos do receptor TLR-4 estavam regulados positivamente, exceto para o grupo controle da TE (8 horas). O aumento dos transcritos destes receptores, 2 horas após o estímulo primário, foi consideravelmente maior para as doses de 1 e 10 ng/mL de LPS, sendo que, os valores da ultima dose foram maiores do que os da primeira. Após 4 horas da primeira sensibilização não houve grande diferença entre os valores de FC dos transcritos, tanto para o grupo controle quanto para os grupos tratados (1 ou 10 ng/mL de LPS). Quatro horas após o estímulo secundário com LPS houve aumento no número dos transcritos, tanto para a dose 1 quanto para a dose 10 ng/mL de LPS, quando comparadas ao grupo controle deste mesmo tempo. Os valores de FC dos transcritos do receptor TLR-2 foram discretamente menores nos grupos tratados (1 ou 10 ng/mL de LPS) do que no grupo controle 2 horas após estímulo primário com o LPS. Contudo, os valores de FC, tanto 4 horas após a primeira dose de LPS quanto na indução da TE (4 horas após a segunda sensibilização), foram maiores para as doses 1 e 10 ng/mL de LPS, quando comparados aos seus respectivos grupos controles (Figura 6 a-b).

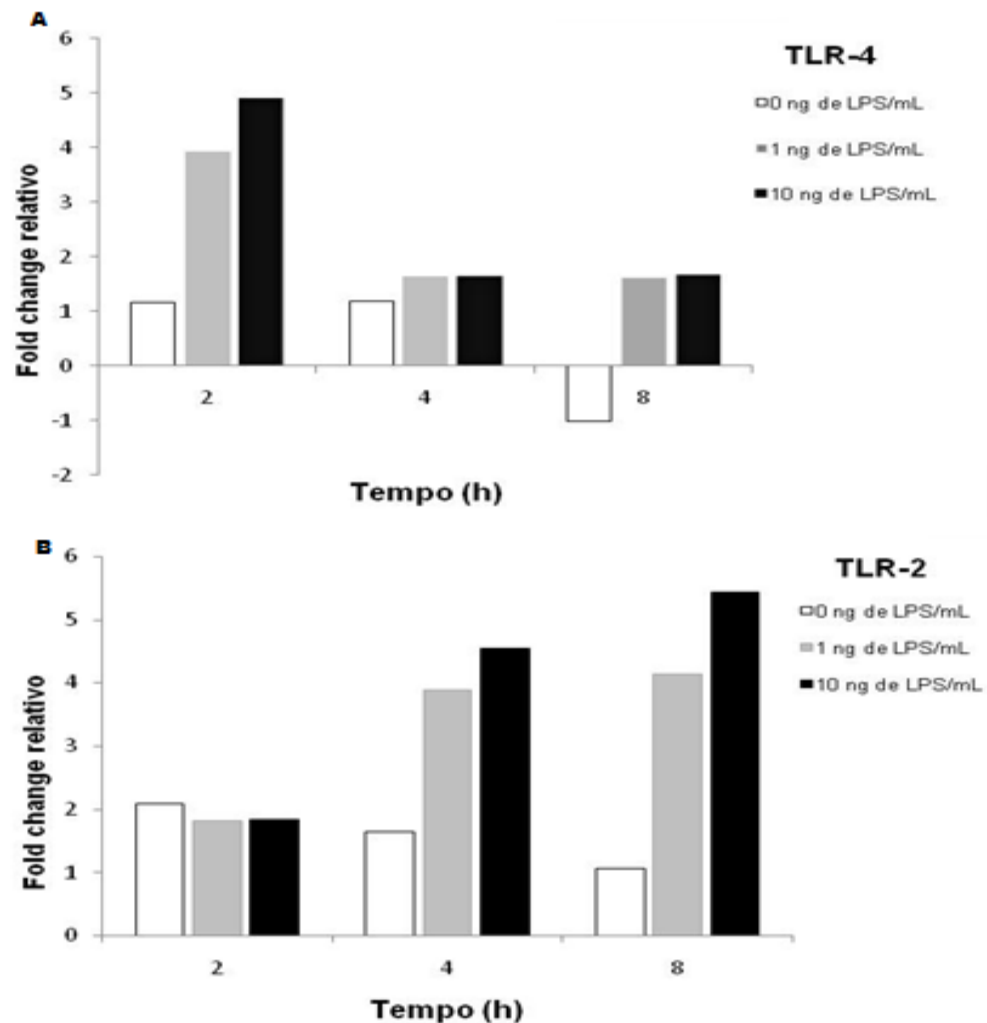


FIGURA 6 – Perfil de expressão dos transcritos dos receptores (A) TLR-4 e (B) -2, normalizados e com “fold change” ≥ 2 , após estimulação com a primeira dose de PBS 1x, 1 ou 10 ng de LPS/mL (tempos 2 e 4) e 4 horas após a segunda estimulação (tempo 8).

Quanto à via de sinalização dependente do marcador de diferenciação mieloide-88 encontramos, 2 horas após a primeira dose de LPS, valores negativos de FC tanto para o grupo controle quanto para o grupo estimulado com 1 ng/mL de LPS. Entretanto o valor de FC, neste mesmo tempo, para a dose 10 ng/mL de LPS foi positivo. A dose 10 ng/mL de LPS, 4 horas após o estímulo primário com LPS, apresentou valor de FC maior que a amostra do grupo controle e do grupo tratado com 1 ng/mL de LPS. Ao analisarmos os transcritos do MyD88 na TE observamos que o grupo controle apresentou

valores de FC positivos em contrapartida os grupos tratados (1 ou 10 ng/mL de LPS) apresentaram valores de FC negativos, porém os tratamentos parecem não diferir entre si (Figura 7).

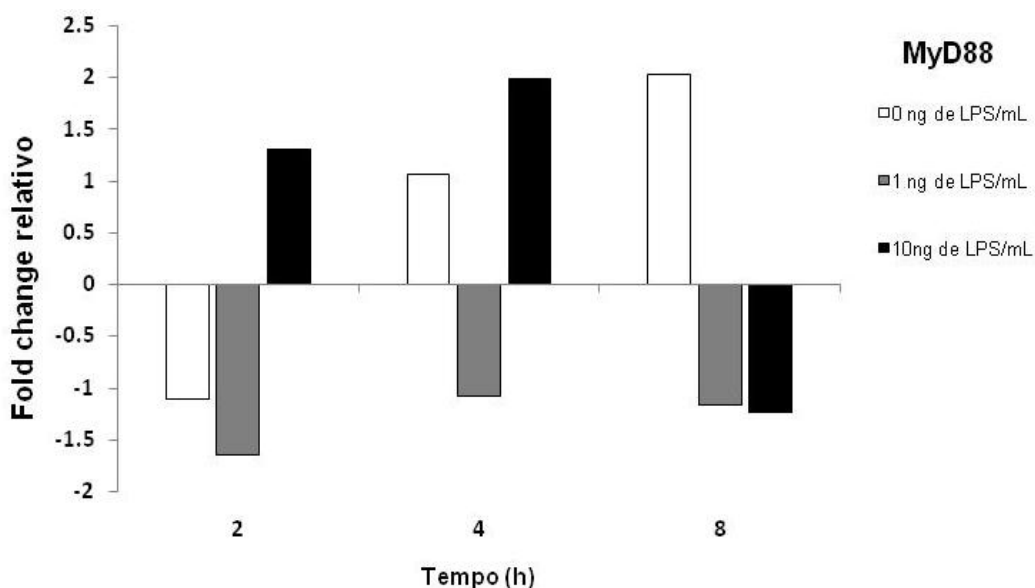


FIGURA 7 - Perfil de expressão do transcrito MyD88 normalizado e com “fold change” ≥ 2 , após estimulação com a primeira dose de PBS 1x, 1 ou 10 ng de LPS/mL (tempos 2 e 4) e 4 horas após a segunda estimulação (tempo 8).

Ao analisarmos a segunda via de sinalização utilizada pelos receptores TLR-4 e -2, a TRIF-dependente, identificamos valor positivo de FC do transcrito TRAM2 2 horas após o primeiro estímulo com a dose de 1 ng/mL de LPS, ao contrário do grupo controle e do tratado com 10 ng/mL de LPS que apresentaram valores negativos de FC, sendo que os valores foram maiores para o primeiro grupo. Quatro horas após a primeira sensibilização com LPS os valores de FC deste transcrito foram negativos para todos os grupos, todavia os valores do grupo controle são menores que os valores dos grupos tratados. Entre os grupos tratados, o valor do transcrito é menor para a dose de 1 ng/mL de LPS em relação à dose de 10 ng/mL de LPS. O mesmo foi observado para a TE (4 horas após estímulo secundário com LPS), porém neste momento o

grupo sensibilizado com 1 ng/mL de LPS demonstrou um valor de FC menor quando comparado ao grupo controle e ao grupo sensibilizado com 10 ng/mL de LPS. O transcrito seguinte desta via de sinalização, o TRIF, exibiu valores de FC semelhantes para o grupo controle nas diferentes horas (2, 4 e 8 horas). Já os valores de FC dos grupos tratados (1 ou 10 ng/mL de LPS), 2 e 4 horas após a primeira exposição ao LPS e 4 horas após a segunda exposição ao LPS, estão aumentados. Tais aumentos são mais evidentes 2 horas e diminuem conforme o tempo, sendo que os valores dos grupos tratados com 10 ng/mL de LPS são muito próximos tanto para 4 horas quanto para a TE (4 horas após estímulo secundário com LPS) (Figura 8 a-b).

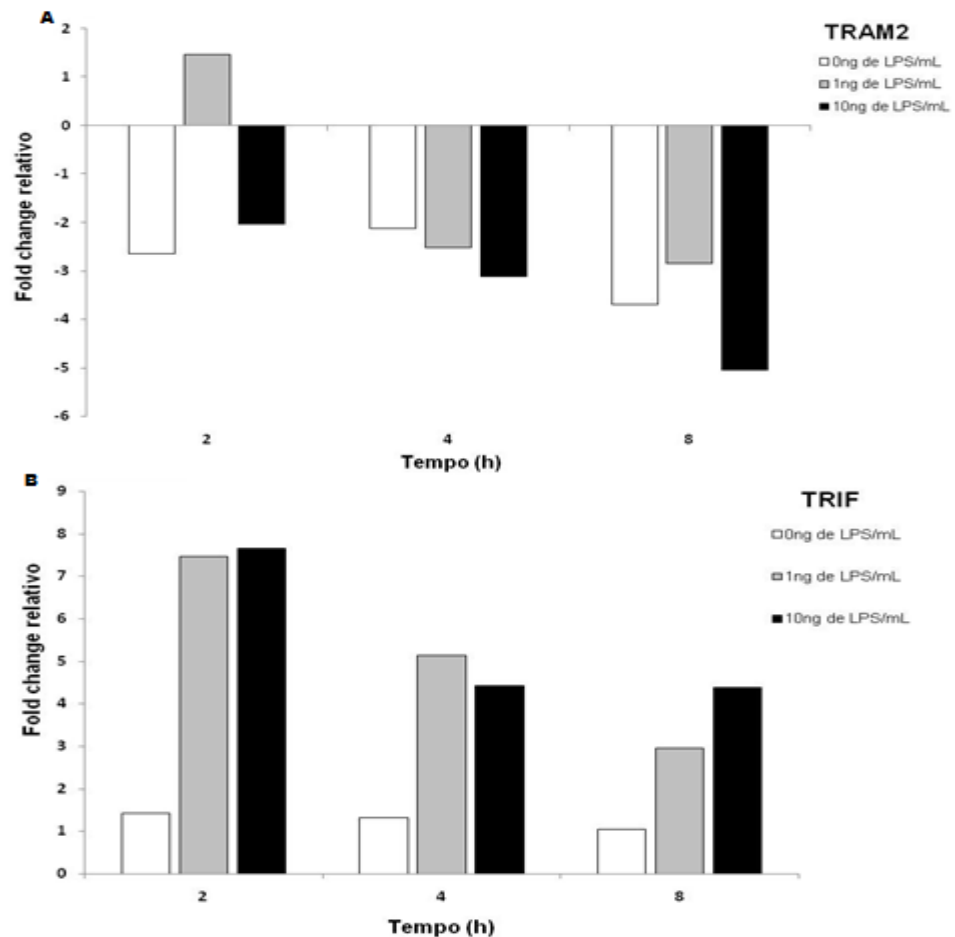


FIGURA 8 - Perfil de expressão dos transcritos dos receptores (A) TRAM2 e (B) TRIF, normalizados e com “fold change” ≥ 2 , após estimulação com a primeira dose de PBS 1x, 1 ou 10 ng de LPS/mL (tempos 2 e 4) e 4 horas após a segunda estimulação (tempo 8).

Os valores de FC para o TNF- α são negativos em todos os momentos avaliados (2, 4 e 8 horas). Esses valores são menores para os grupos tratados (1 e 10 ng/mL de LPS) quando comparados com o grupo controle, 2 horas em seguida a primeira sensibilização com LPS. Passado quatro horas após esta sensibilização, os valores de FC do grupo tratado com 1 ng/mL de LPS mostrou-se menor do que os valores do grupo controle e do grupo tratado com 10 ng/mL de LPS, sendo que o valor do primeiro grupo é inferior ao do segundo. Posteriormente, 8 horas após o primeiro estímulo com LPS (4 horas após a indução da TE), o valor do grupo controle foi consideravelmente maior quando comparado aos valores dos grupos tratados. Quanto às citocinas IL-1 β os valores de FC para os grupos controles foram semelhantes para todas às 2, 4 e 8 horas. Já os valores de FC, para os grupos estimulados com 1 ou 10 ng/mL de LPS, foram decaindo ao longo do tempo (2, 4 e 8 horas). A IL-6, semelhante à IL-1 β , apresentou uma queda nos valores de FC no decorrer do tempo. Entretanto essa queda foi muito mais acentuada e os valores de FC do grupo controle em todo o período analisado foram negativos. A IL-10, ao contrário das outras citocinas, apresentou valores de FC positivos e elevados para os grupos tratados (1 e 10 ng/mL de LPS) durante a TE (4 horas após a segunda exposição ao LPS). Todavia estes valores são maiores para as doses 10 ng/mL de LPS quando comparados às doses de 1 ng/mL de LPS. No que se refere ao grupo controle, este apresentou valores de FC negativos para todos os momentos (2, 4 e 8 horas). O transcrito do TNFAIP3 demonstrou baixos valores de FC para o grupo controle nos diferentes momentos (2, 4 e 8 horas), enquanto que, nos grupos tratados (1 ou 10 ng/mL de LPS) os valores de FC estão elevados. Os valores maiores foram encontrados 2 horas após o primeiro estímulo com LPS, sendo que a dose 10 ng/mL de LPS apresentou um valor maior que a dose 1 ng/mL de LPS. Este comportamento foi semelhante 4 horas após o primeiro estímulo com LPS, contudo os valores de FC foram um pouco mais baixos. Na TE, os valores de FC foram muito menores do que os observados nos outros tempos, não havendo diferença entre as doses 1 e 10

ng/mL de LPS, porém diferença entre o grupo controle deste momento (Figura 9 a-c e Figura 10 d-e).

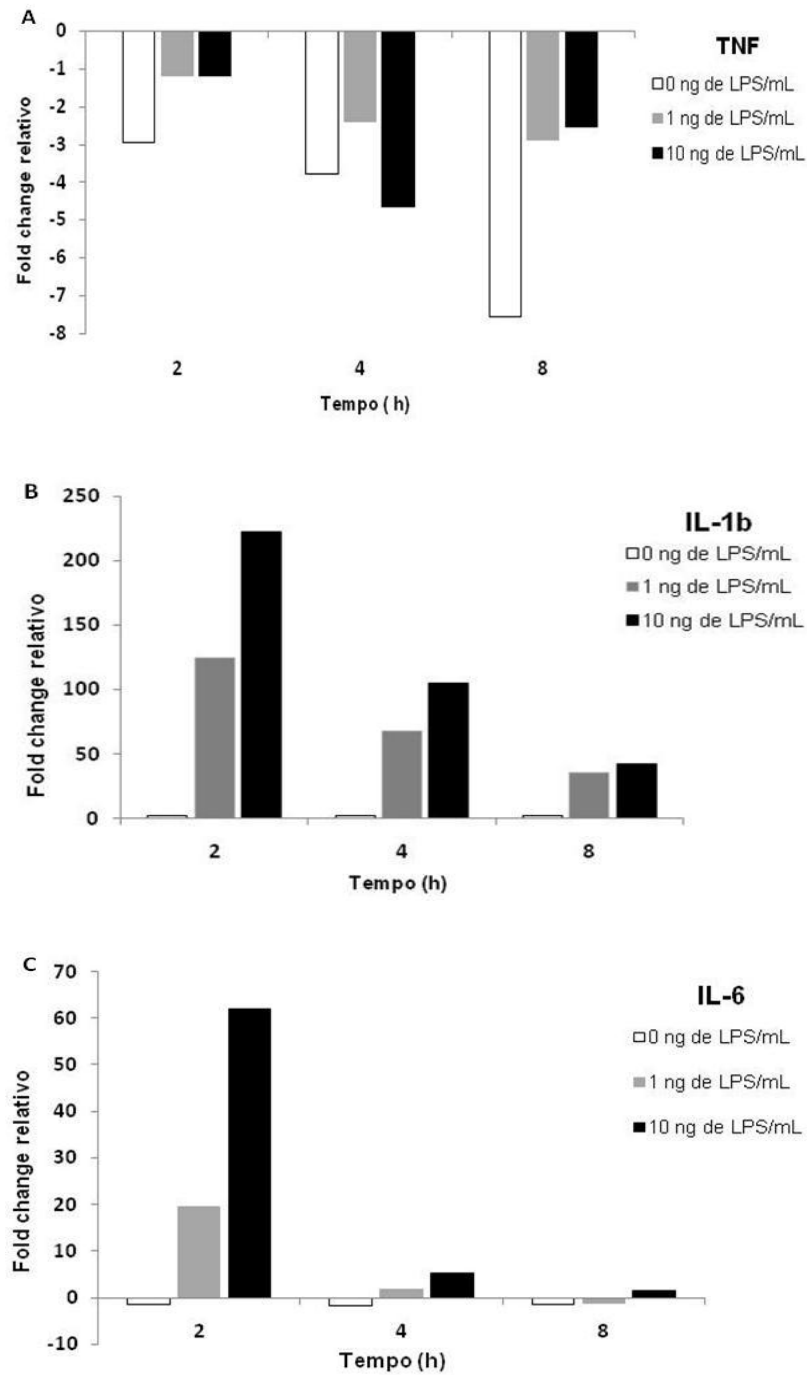


FIGURA 9 - Perfil de expressão dos transcritos: (A) TNF- α , (B) IL-1b, (C) IL-6, normalizados e com “fold change” ≥ 2 , após estimulação com a primeira dose de PBS 1x, 1 ou 10 ng de LPS/mL (tempos 2 e 4) e 4 horas após a segunda estimulação (tempo 8).

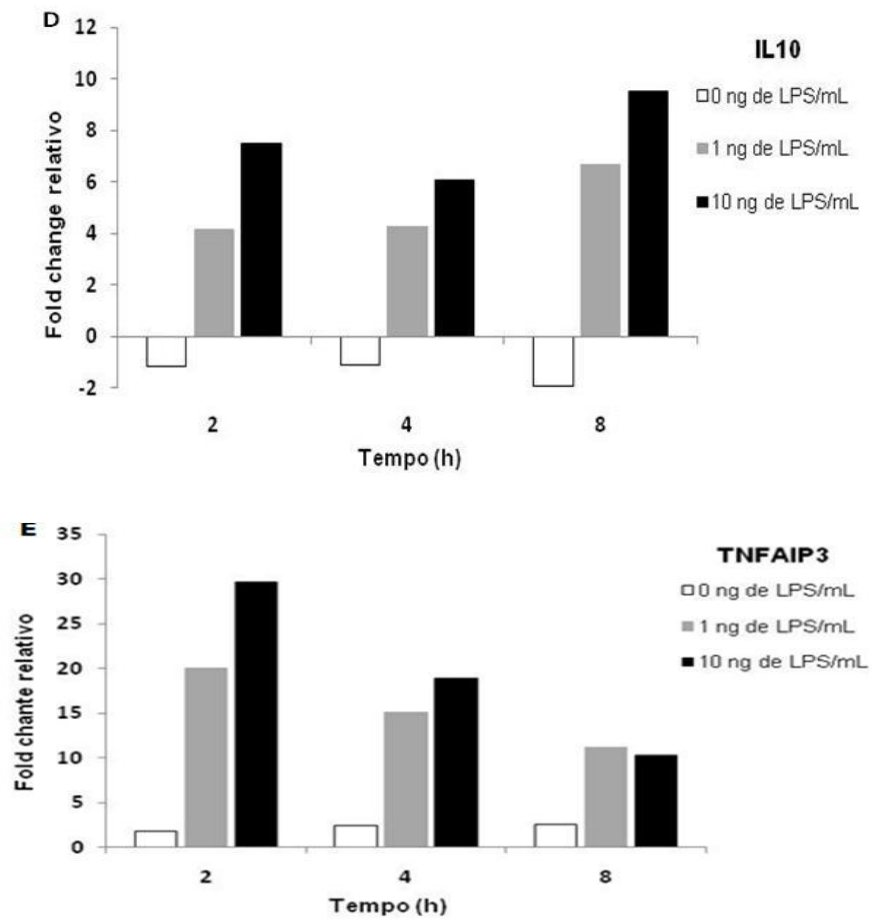


FIGURA 10 - Perfil de expressão dos transcritos: (D) IL-10 e (E) TNFAIP3, normalizados e com “fold change” ≥ 2 , após estimulação com a primeira dose de PBS 1x, 1 ou 10 ng de LPS/mL (tempos 2 e 4) e 4 horas após a segunda estimulação (tempo 8).

V DISCUSSÃO

A capacidade dos receptores TLRs em reconhecer o LPS e desencadear uma resposta inflamatória, com liberação de citocinas pró-inflamatórias (HAFENRICHTER et al., 1994), se dá pela sua conformação e pelo seu domínio intracelular TIR (TAKEDA; AKIRA, 2004). A evolução desta resposta pode ocorrer através de duas vias, a MyD88-dependente e a TRIF-dependente (DOBROVOLSKAIA et al., 2003; KENNY et al., 2009; LI; QIN, 2005), as quais podem atuar em conjunto ou separadamente (TAKEDA et al., 2003). Porém, durante o estado de tolerância, a célula silencia a resposta à endotoxina, com consequente diminuição da produção e liberação das citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 e IL-6), sugerindo alterações na sinalização destas vias (CARRENHO, 2009).

A tolerância é gerada após a exposição das células a repetidos estímulos com LPS (OGAWA et al., 2003; YOZA et al., 2002). Um dos primeiros relatos dessa alteração celular descreveu uma redução da febre em coelhos após repetidas injeções da vacina tifóide (BISWAS; LOPEZ-COLLAZO, 2009). Modelos *in vitro* de tolerância também confirmaram que macrófagos de ratos e monócitos de humanos, expostos a doses sub-ótimas de LPS, perdem a capacidade de respostas à doses maiores destas endotoxinas (BISWAS; LOPEZ-COLLAZO, 2009; FRELLSTEDT et al., 2012). Os estímulos secundários com LPS alteram a sinalização intracelular dos receptores Toll-like, gerando uma queda na produção e na liberação de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1, IL-6 e principalmente o TNF- α (BISWAS; LOPEZ-COLLAZO, 2009; FRELLSTEDT et al., 2012; JANSKÝ et al., 2003), que é considerado um marcador dessa alteração celular (CAVAILLON et al., 1994). Esta resposta diminuída ao LPS também foi ratificada em modelos experimentais que utilizam macrófagos e linfócitos B de camundongos naturalmente hiporesponsíveis ao LPS (C3H/HeJ^{Lps-d}), devido à uma mutação

no *locus lps*, os quais são irresponsáveis a mitógenos, adjuvantes ou propriedades imunogênicas do LPS (POLTORAK et al., 1998).

Após usarmos a análise estatística e filtrarmos os valores pelo “fold change” maior ou igual a dois, observamos um sucesso na indução da tolerância à endotoxina 4 horas após a re-estimulação de leucócitos totais de equinos com 10 ng LPS/mL. Neste estudo, sua confirmação deu-se pela redução na expressão das citocinas como IL-1 β , IL-6 e principalmente de TNF- α , como descrito em células mononucleares periféricas de equinos e células da medula óssea de camundongos (BISWAS; LOPEZ-COLLAZO, 2009; FRELLSTEDT et al., 2012). Durante a TE, os TLRs encontravam-se regulados positivamente no momento 8 horas, coincidindo com os resultados da expressão superficial destes receptores em linfócitos, monócitos e neutrófilos na espécie equina utilizando o mesmo modelo experimental realizado anteriormente pelo nosso grupo de pesquisa (CARRENHO, 2009). Logo, para que entendêssemos o processo de sinalização e da indução da TE em equinos, foi necessário pesquisar a expressão dos genes, tanto das vias de sinalização MyD88-dependente quanto das via TRIF-dependente, na tentativa de elucidar quais genes poderiam ser responsáveis por este mecanismo.

Já foi demonstrado em camundongos, e em outras espécies, que a intensidade da resposta gerada pelos receptores TLRs e a tolerância à endotoxina são dose-dependentes de LPS (MORRIS et al., 2015). Macrófagos periféricos de camundongos, quando estimulados com diversas doses de 100 ng de LPS/mL, durante 24 horas, tiveram uma redução drástica na produção de IL-6 e IL-12. No entanto, estas células, quando pré-incubadas com 10 ng de LPS/mL, demonstraram uma redução parcial destas citocinas enquanto que na pré-estimulação com 1 ng de LPS/mL a redução das citocinas foi mínima (NOMURA et al., 2000). A indução da TE em leucócitos totais de equinos foi significativamente mais alta quando a estimulação foi feita com 10 ng de LPS/mL, quando comparada às doses de 1 ng de LPS/mL (CARRENHO,

2009). No presente estudo, ficou evidente que duas horas após o primeiro estímulo o aumento do transcrito TLR-4 foi dose dependente. Porém 4 horas após o primeiro estímulo e 4 após o segundo estímulo com LPS (indução da TE) não foram dose dependentes. Já a expressão das citocinas IL-1 β , IL-6 resultou em valores relativos de “fold change” mais baixos quando administrou-se a dose de 10 ng de LPS/mL. Isto também se repetiu nos momentos 2 e 4 horas, indicando que a estimulação da resposta inflamatória, nos leucócitos de equinos, via receptores TLR-4 também é dose dependente. Porém, para a expressão de MyD88, observamos que seu valor estava diminuído 2 horas após a estimulação com 1 ng de LPS/mL, indicando que a resposta inflamatória ao LPS é dose e tempo dependente. A indução de TE nos macrófagos peritoneais de camundongos, com doses de 10 ng de LPS/mL, também foi tempo dependente, na qual ocorreu a redução parcial da produção de citocinas pró-inflamatórias após 3 horas de indução, sendo que, após 24 horas a indução foi total (NOMURA et al., 2000).

Para melhor entendermos a resposta temporal ao LPS e ao estado de TE celular, acompanhamos a análise tanto do grupo controle quanto dos grupos tratados (1 ou 10 ng LPS/mL) durante os diferentes momentos (2, 4 e 8 horas). Com esta análise, vimos que a expressão dos TLRs e das citocinas IL-1, IL-6 e TNF- α foram maiores após 2 horas em relação aos momentos 4 e 8. Já no momento 8 (4 horas após a reestimulação com LPS) a expressão destas citocinas estavam diminuídas quando comparadas com o grupo controle, caracterizando assim a TE. Entretanto, os transcritos dos receptores TLRs encontraram-se aumentados às 8 horas, coincidindo com resultados previamente descritos, nos quais ambos os receptores tiveram sua expressão aumentada na superfície de linfócitos, monócitos e neutrófilos durante estado de tolerância ao LPS (CARRENHO, 2009). A expressão dos receptores TLRs, durante 24 e 48 horas após a indução de TE (0,5 μ g/mL de LPS), em células endotélias da microcirculação intestinal humana (HIMECs) também não sofreu alteração (OGAWA et al., 2003). Estes achados sugerem que, semelhante ao

presente estudo, a TE ocasiona alterações na expressão de moléculas que participam das vias de sinalização intracelular dos TLR-4 e -2 e não propriamente na expressão destes receptores. Como as proteínas ligadoras de LPS (LBP) tem papel importante na opsonização destas moléculas e na ativação do complemento (WRIGHT et al., 1990) incute-se que a inalteração ou até mesmo o aumento do número de transcritos dos TLRs, bem como o aumento da expressão destes receptores na superfície celular (CARRENHO, 2009) possa ser um mecanismo de segurança que ocorre frente à endotoxemia, mesmo que, as vias de sinalização dos TLRs estejam atenuadas.

O MyD88 contém dois domínios de interação proteica sendo que o seu domínio TIR se associa com o domínio TIR dos receptores TLRs e receptor para IL-1 (FUJIHARA et al., 2003; MUZIO et al., 1997). Esta ligação é fundamental para o progresso da resposta ao LPS, e isto foi elucidado em experimentos onde camundongos *MyD88^{-/-}* não produziram citocinas da resposta inflamatória clássica (TNF- α , IL-1 e IL-6) em retorno à qualquer tipo de ligante dos TLRs (TAKEDA; AKIRA, 2004). Assim, sugere-se que a indução da TE, no presente estudo, foi gerada por uma diminuição da expressão deste gene. Todavia, esta baixa expressão não ocorreu somente para o MyD88, mas também para o receptor para IL-1(IL1R1) 4 horas após o segundo estímulo com LPS. Desta forma, a TE induzida neste modelo experimental em equinos, para a via MyD88-dependente, possivelmente foi causada pela diminuição tanto de MyD88 quanto do IL1R1, uma vez que a sinalização no interior da célula só acontece quando a primeira molécula ativada recruta a segunda (TAKEDA; AKIRA, 2004).

Como vimos acima, animais “knockout” para MyD88, perdem a capacidade de produzir as citocinas pró-inflamatórias clássicas geradas pelos TLRs após estimulação com LPS. Entretanto, em um caso de estimulação do TLR-4, a ativação de NF- κ B e JNK foi detectada após indução com LPS, até mesmo em camundongos MyD88 knockout (TAKEDA; AKIRA, 2004). Os camundongos *MyD88^{-/-}* só conseguiram responder ao LPS, via TLR-4, devido à ativação da

via TRIF-dependente (BOHANNON et al., 2013). Embora esta via não seja a de eleição da cascata de sinalização dos TLR-4, ela é responsável pela indução de interferons tipo I (IFN α/β) importantes na resposta contra bactérias e vírus. No presente estudo, um dos principais genes desta via, o TRAM2, demonstrou-se aumentado no momento 2 horas com a dose 1 ng LPS/mL, porém este aumento parece ser compensatório, uma vez que no mesmo momento e na mesma dose houve uma queda do transcrito MyD88.

O TNF- α é produzido por macrófagos e células dendríticas e tem função de mediador da resposta inflamatória aguda contra bactérias e outros microrganismos infecciosos (CAGIOLA et al., 2006). Devido sua importância como produto da resposta ao LPS, é considerado um dos marcadores de indução de TE (ALLEN et al., 1996; FRELLSTEDT et al., 2012) e a ação prolongada pode desencadear muitos danos às células e até mesmo choque séptico (HAAS et al., 1990). Estudos com células CD14⁺, isoladas de baço de suínos induzidas à TE, demonstrou uma produção menor do TNF- α 4 horas após a reestimulação com LPS, sendo que o pico desta alteração ocorreu 24 horas após a TE (CAGIOLA et al., 2006). Em estudos prévios do nosso grupo, com linfócitos, monócitos e neutrófilos de equinos, o TNF- α demonstrou comportamento semelhante ao estudo realizado em suíno, onde sua expressão foi baixa 4 horas após a indução da TE e se manteve até às 24 horas (CARRENHO, 2009). No atual estudo, a expressão do TNF- α foi baixa após a indução da TE (8 horas), porém sua expressão apresentou-se ainda mais diminuída no grupo controle, neste mesmo tempo e diminuída 2 horas após o primeiro estímulo com LPS, tanto para a dose 1 ng/mL de LPS quanto para a dose 10 ng/mL de LPS. A queda na expressão TNF- α no grupo controle após o segundo estímulo de LPS, e 2 horas após o primeiro estímulo, pode ser decorrente do estresse oxidativo que estas células sofreram nestes períodos, uma vez que foram encubadas sem meio de cultura, ou até mesmo devido a um mecanismo de defesa celular que pode ocorrer através da regulação da A20 (TNFAIP3), uma vez que sua expressão está alta nos momentos 2 e 4

após a primeira estimulação com LPS para as doses 1 e 10 ng/mL de LPS. O domínio N-terminal A20 (TNFAIP3) é um enzima que remove as cadeias de lisina-63 ligadas à ubiquitina da proteína de interação com receptor (RIP). A RIP é um mediador essencial do complexo de sinalização do receptor proximal TNF-1 e quando sofre ubiquitinação pela A20, gera diminuição do NF- κ B, o qual é de extrema importância para a regulação da expressão do TNF- α (O'REILLY; MOYNAGH, 2003; WERTZ et al., 2004), justificando assim o baixo nível de transcritos do TNF- α 2 e quatro 4 horas após a estimulação primária ao LPS.

A interleucina-1 é uma proteína de 15 a 18 kDa produzida principalmente nos monócitos sanguíneos e promove a resposta imune de fase aguda com ações similares ao TNF- α (HAAS et al., 1990). Porém, já foi descrito que a adição primária de LPS em leucócitos de equinos gerou um aumento acentuado na expressão de gênica da IL-1, enquanto que a dose secundária de LPS, gerou redução de IL-1 no momento 8 em relação ao momento 4 (CARRENHO, 2009). A estimulação de macrófagos alveolares de equinos com 100 ng/mL de LPS resultou em um pico de IL-1 β 3 horas após o estímulo (WALDSCHMIDT et al., 2013). Em outro modelo *ex vivo*, com sangue total de humanos, foi observado que o aumento da IL-1 ocorreu entre 3 a 6 horas após estímulo (BLANKLEY et al., 2014). Células esplênicas CD14⁺ de suínos, em um estudo *in vitro*, sofreram estimulação inicial com LPS proveniente de *Salmonella typhimurium* (0, 1, 1 e 10 μ g/mL) e 4 e 24 horas após a co-estimulação com 10 μ g/mL do mesmo LPS apresentaram aumento significativo na expressão de IL-1 β após os estímulos primários, entretando seus valores após a TE permaneceram inalterados (CAGIOLA et al., 2006). Contudo, no presente estudo o principal aumento da IL-1 ocorreu 2 horas pós o estímulo com 10 ng de LPS/mL, no qual o valor do seu “fold change” foi de 449 (expressão 449 vezes maior que as amostras do grupo controle). Quatro horas após o segundo estímulo com LPS, a IL-1 ainda apresentava um valor relativo de “fold change” acima de 2 para a dose 10 ng de LPS/mL (expressão 5,56

vezes maior que as amostras do grupo controle), porém este valor foi 3 vezes menor do que a mesma condição após 2 horas. Embora a IL-1 esteja aumentada no momento 8, para ambas as doses, seu valor de “fold change” relativo é menor em relação ao tempo 2 horas, indicando que a TE induziu a redução da sua expressão, mesmo que estes valores não sejam negativos.

A IL-6 é uma citocina pró-inflamatória multifuncional, de 26 kDa, que participa da patogenicidade de alterações crônicas graves e é produzida por monócitos, neutrófilos e células endoteliais, dentre outras células do sistema de defesa (SOUZA et al., 2008), logo, sua regulação é rigorosa. Normalmente, indivíduos saudáveis apresentam níveis da IL-6 não detectáveis ao menos que passem por traumas, infecções ou outros tipos de estresse, nestes casos, sua expressão é rapidamente detectável e, assim como o TNF- α e a IL-1 β , é um fator crucial da resposta inflamatória de fase aguda (ERSHLER; KELLER, 2000). Para alguns pesquisadores o nível plasmático de IL-6 pode ser usado com um marcador da presença de bacteremia (MARTIN et al., 2001). No presente estudo, os níveis de transcritos da IL-6 aumentaram 2 horas após o estímulo primário e diminuíram consideravelmente 4 horas após a indução da TE, ratificando achados recentes do nosso grupo, que identificaram diminuição drástica dos valores desta citocina após a indução de TE em leucócitos de equinos, em um modelo *ex vivo* (CARRENHO, 2009), e que estes valores permaneceram baixos até 16 horas após TE. Um modelo *in vitro* de TE, em células endoteliais da microcirculação intestinal de humanos, mostrou que a expressão IL-6 diminuiu 24 e 48 horas após a reestimulação com 0,5 μ g/mL de LPS (OGAWA et al., 2003). O que também foi elucidado em um modelo *ex vivo* com sangue total de suínos (CASTEGREN et al., 2012), no qual a IL-6 teve sua expressão diminuída 6 horas após a TE (doses de 1 e 4 μ g/mL de LPS). Estes achados enfatizam a produção de IL-6 em resposta a seguidas doses de LPS, e sua importância como uma citocina pró-inflamatória.

A IL-10 é produzida pela maioria dos leucócitos, incluindo linfócitos B e T, neutrófilos, células “natural killer”, eosinófilos, células dendríticas e possui a habilidade de inibir a produção de citocinas pró-inflamatórias (LEON et al., 1998; SAXENA et al., 2014). Seu efeito anti-inflamatório é comprovado pela resposta febril exacerbada e prolongada retratada em camundongos “knockout” para IL-10, após a estimulação com doses de LPS (50 µg/mL) (LEON et al., 1998). Células dendríticas IL-10^{-/-}, oriundas do fêmur e tíbia de camundongos, também demonstraram uma incapacidade em responder a estímulos com LPS, inativando a via de sinalização dos TLRs (ZHOU et al., 2012).

Um modelo *ex vivo* de TE provou que a reestimulação de células mononucleares periféricas de humanos (PBMCs), com doses de 100 ng/mL de LPS, resulta em um aumento da expressão da IL-10, 6 horas após a TE (FONTAINE et al., 2014). Contudo em um modelo *in vivo* humano, cuja dose de LPS (2 ng/kg/dia) foi ministrada durante 5 dias consecutivos, a resposta anti-inflamatória da IL-10 mostrou-se inalterada durante o período avaliado (DRAISMA et al., 2009). Resultado semelhante foi observado em um modelo *ex vivo* com sangue total de suínos, onde a expressão da IL-10 não foi alterada após a TE, tanto para a dose de 1 µg/mL de LPS quanto para a dose 4 µg/mL de LPS (CASTEGREN et al., 2012). Em vacas leiteira, o tecido mamário foi reestimulado com LPS (0,2 µg/mL), 72 e 240 horas após estimulação intramamária prévia com a mesma dose de LPS, demonstrou a inibição da expressão tanto de citocinas pró-inflamatórias (IL-6 e TNF-α) quanto da citocina anti-inflamatória (IL-10) (PETZL et al., 2012). Já os macrófagos peritoneais de camundongos jovens e idosos quando estimulados e reestimulados com 1 µg/mL de LPS para indução de TE, apresentaram aumento da concentração de IL-10 24 horas após a TE (SUN et al., 2012). No presente estudo observamos aumento dos transcritos da IL-10 em todos os momentos (2, 4 e 8 horas) em relação ao grupo controle quando avaliados na mesma hora, sendo que, 4 horas após a reestimulação com LPS este aumento foi maior, corroborando com estudos prévios do nosso grupo, que detectaram

um aumento da expressão desta citocina 24 após a indução de TE em leucócitos de equinos (CARRENHO, 2009). Estes achados sugerem a importância da IL-10 no estado de TE, porém as diferentes alterações da IL-10 nas diferentes espécies indica a necessidade de estudos mais detalhados sobre seu comportamento e sobre sua ativação e inativação.

VI CONCLUSÃO

A co-estimulação de leucócitos totais de equinos com LPS de *E. coli* levou à alterações nas cascatas de sinalização, tanto da via MyD88-dependente quanto da TRIF-dependente com consequente indução da TE, que caracterizou-se pela queda do número de transcritos das citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 β e IL-6) e pelo aumento dos transcritos da citocina anti-inflamatória IL-10. Observou-se que tal estado de tolerância, no presente estudo, foi decorrente de alterações do transcrito MyD88, da via MyD88-dependentes e dos transcritos TRIF e TRAM, da via TRIF-dependente. Também relacionou-se a interação do gene TNFAIP3 com a atenuação dos níveis de citocinas na endotoxemia, assim como a identificação de outros genes: TIRAP, TBK1, TOLLIP, MAP3PK3, MAP2K1, MAPK1, MAPK14, MAPK3, NFKBIE, NFKBIA, TAB1, MAP3K8, IL1R1. Sendo assim, este estudo possibilitou a visão global do estado de TE, nas duas vias utilizadas pelos TLR-4 e -2, na espécie equina pela técnica de microarranjo de oligonucleotídeos.

VII REFERÊNCIAS

AKASHI, S.; SHIMAZU, R.; OGATA, H.; NAGAI, Y.; TAKEDA, K.; KIMOTO, M.; MIYAKE, K. Cutting edge: cell surface expression and lipopolysaccharide signaling via the toll-like receptor 4-MD-2 complex on mouse peritoneal macrophages. **Journal of immunology**, v. 164, n. 7, p. 3471–3475, 2000.

ALLEN, G. K.; CAMPBELL-BEGGS, C.; ROBINSON, J. a; JOHNSON, P. J.; GREEN, E. M. Induction of early-phase endotoxin tolerance in horses. **Equine veterinary journal**, v. 28, n. 4, p. 269–274, 1996.

ANDERSON, P. Post-transcriptional regulons coordinate the initiation and resolution of inflammation. **Nature Reviews Immunology**, v. 10, n. 1, p. 24–35, 2010.

ARIGA, S. K.; ABATEPAULO, F. B.; MELO, E. S. A.; VELASCO, I. T.; SILVA, F. P.; LIMA, T. M.; SORIANO, F.G. Endotoxin tolerance drives neutrophil to infectious site. **Shock**, v. 42, n. 2, p. 168-173, 2014.

BAKER, B.; ZAMBRYSKI, P.; STASKAWICZ, B.; DINESH-KUMAR, S. P. 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 Veterinary Journal**, v. 28, n. 3, p. 382-389, 1996.

BAYSTON, K. F.; COHEN, J. Bacterial endotoxin and current concepts in the diagnosis and treatment of endotoxaemia. **Journal of Medical Microbiology**, v. 31, n. 2, p. 73–83, 1990.

BERETA, J.; SZUBA, K.; FIERS, W.; GAULDIE, J.; KOJ, A. Transforming growth factor-beta and epidermal growth factor modulate basal and interleukin-6-induced amino acid uptake and acute phase protein synthesis in cultured rat hepatocytes. **FEBS letters**, v. 266, n. 1-2, p. 48–50, 1990.

BEUTLER, B.; POLTORAK, A. The search for Lps: 1993-1998. **Journal of Endotoxin Research**, v. 6, n. 4, p. 269–293, 2000.

BISWAS, S. K.; LOPEZ-COLLAZO, E. Endotoxin tolerance: new mechanisms, molecules and clinical significance. **Trends in Immunology**, v. 30, n. 10, p. 475–487, 2009.

BISWAS, S. K.; BIST, P.; DHILLON, M. K.; KAJIJI, T.; DEL FRESNO, C.; YAMAMOTO, M.; LOPEZ-COLLAZO, E.; AKIRA, S.; TERGAONKAR, V. Role

for MyD88-Independent, TRIF Pathway in Lipid A/TLR4-Induced Endotoxin Tolerance. **The Journal of Immunology**, v. 179, n. 6, p. 4083–4092, 2007.

BLANKLEY, S.; GRAHAM, C. M.; HOWES, A.; BLOOM, C. I.; BERRY, M. P. R.; CHAUSSABEL, D.; PASCUAL, V.; BANCHEREAU, J.; LIPMAN, M.; O’GARRA, A. Identification of the key differential transcriptional responses of human whole blood following TLR2 or TLR4 ligation in-vitro. **PloS One**, v. 9, n. 5, p. e97702, 2014.

BOHANNON, J. K.; HERNANDEZ, A.; ENKHBAATAR, P.; ADAMS, W. L.; SHERWOOD, E. R. The immunobiology of toll-like receptor 4 agonists: from endotoxin tolerance to immunoadjuvants. **Shock**, v. 40, n. 6, p. 451-462, 2013.

BRANDL, K.; GLÜCK, T.; HARTMANN, P.; SALZBERGER, B.; FALK, W. A designed TLR4/MD-2 complex to capture LPS. **Journal of Endotoxin Research**, v. 11, n. 4, p. 197–206, 2005.

BUENO, A. C.; SEAHORN, T. L.; CORNICK-SEAHORN, J.; HOROHOV, D. W.; MOORE, R. M. Plasma and urine nitric oxide concentrations in horses given below a low dose of endotoxin. **American Journal of Veterinary Research**, v. 60, n. 8, p. 969–976, 1999.

CAGIOLA, M.; GIULIO, S.; MIRIAM, M.; KATIA, F.; PAOLA, P.; MACRÌ, A.; PASQUALI, P. In vitro down regulation of proinflammatory cytokines induced by LPS tolerance in pig CD14+ cells. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 112, n. 3-4, p. 316–320, 2006.

CAMPEBELL, R. C.; PEIRÓ, J. R.; ROSA, P. C. S.; VALADÃO, C. A. A.; BECHARA, G. H. Endotoxemia por lipopolissacarídeo de Escherichia coli, em eqüinos: efeitos de antiinflamatórios nas concentrações sérica e peritoneal do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, n. 4, p. 837–843, 2007.

CARRENHO, L. C. A. **Avaliação ex vivo da expressão de TLR-2 e TLR-4 em leucócitos de equinos e sua relação com a tolerância a endotoxina**. 2009. 72f. Dissertação Mestrado - Faculdade de Odontologia e Curso de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista: Julio de Mesquita Filho, Araçatuba, 2009

CASTEGREN, M.; LIPCSEY, M.; SÖDERBERG, E.; SKORUP, P.; ERIKSSON, M.; LARSSON, A.; SJÖLIN, J. Differences in organ dysfunction in endotoxin-tolerant pigs under intensive care exposed to a second hit of endotoxin. **Shock**, v. 37, n. 5, p. 501–510, 2012.

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. **Journal of Endotoxin Research**, v. 1, p. 21–29, 1994.

CAVAILLON, J.-M.; ADRIE, C.; FITTING, C.; ADIB-CONQUY, M. Endotoxin tolerance: is there a clinical relevance? **Journal of Endotoxin Research**, v. 9, n. 2, p. 101–107, 2003.

CAVAILLON, J.-M.; MARIE, C.; CAROFF, M.; LEDUR, A.; GODARD, I.; POULAIN, D.; FITTING, C.; HAEFFNER-CAVAILLON, N. CD14/LPS receptor exhibits lectin-like properties. **Innate Immunity**, v. 3, n. 6, p. 471–480, 1996.

COLLATOS, C. Clinical conditions associate with endotoxemia. In: American association of equine practioners, 41, 1995. **Indianápolis. Proceedings. Indianapolis AAEP**, p.103-106, 1995.

COLLINS, P. E.; CARMODY, R. J. The Regulation of Endotoxin Tolerance and its Impact on Macrophage Activation. **Critical Reviews in Immunology**, v. 35, n. 4, p. 293–323, 2015.

CROSS, A. S. Endotoxin tolerance-current concepts in historical perspective. **Journal of Endotoxin Research**, v. 8, n. 2, p. 83–98, 2002.

DOBROVOLSKAIA, M. a; MEDVEDEV, A. E.; THOMAS, K. E.; CUESTA, N.; TOSHCHAKOV, V.; REN, T.; CODY, M. J.; MICHALEK, S. M.; RICE, N. R.; VOGEL, S. N. Induction of in vitro reprogramming by Toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 agonists in murine macrophages: effects of TLR “homotolerance” versus “heterotolerance” on NF-kappa B signaling pathway components. **Journal of Immunology**, v. 170, n. 1, p. 508–519, 2003.

DRAISMA, A.; PICKKERS, P.; BOUW, M. P. W. J. M.; VAN DER HOEVEN, J. G. Development of endotoxin tolerance in humans in vivo. **Critical Care Medicine**, v. 37, n. 4, p. 1261–7, 2009.

ERSHLER, W. B.; KELLER, E. T. Age - associated increased interleukin-6 gene expression, late-life diseases, and frailty. **Annual Reviews Medicine**, v. 51, p. 245–270, 2000.

FAN, H.; COOK, J. A. Molecular mechanisms of endotoxin tolerance. **Journal of Endotoxin Research**, v. 10, n. 2, p. 71–84, 2004.

FIORENTINO, D. F.; ZLOTNIK, A.; MOSMANN, T. R.; HOWARD, M.; O’GARRA, A. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. **Journal of Immunology**, v. 147, n. 11, p. 3815–3822, 1991.

FLACH, R.; FLOHE, S.; LASCHINSKI, M.; HOFMANN, K.; KREUZFELDER, E.; SCHADE, F. U. Interleukin-10 is downregulated in mononuclear cells from endotoxin tolerant humans. **Innate Immunity**, v. 4, n. 3, p. 189–195, 1997.

FONTAINE, M.; PLANEL, S.; PERONNET, E.; TURREL-DAVIN, F.; PIRIOU, V.; PACHOT, A.; MONNERET, G.; LEPAPE, A.; VENET, F. S100A8/A9 mRNA

Induction in an Ex Vivo Model of Endotoxin Tolerance: Roles of IL-10 and IFN γ . **PLoS ONE**, v. 9, n. 6, p. e100909, 2014.

FOSTER, S. L.; MEDZHITOV, R. Gene-specific control of the TLR-induced inflammatory response. **Clinical Immunology**, v. 130, n. 1, p. 7–15, 2009.

FRELLSTEDT, L.; MCKENZIE, H. C.; BARRETT, J. G.; FURR, M. O. Induction and characterization of endotoxin tolerance in equine peripheral blood mononuclear cells in vitro. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 149, n. 1-2, p. 97–102, 2012.

FUJIHARA, M.; MUROI, M.; TANAMOTO, K.; SUZUKI, T.; AZUMA, H.; IKEDA, H. Molecular mechanisms of macrophage activation and deactivation by lipopolysaccharide: roles of the receptor complex. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 100, n. 2, p. 171–194, 2003.

GNAUCK, A.; LENTLE, R. G.; KRUGER, M. C. The characteristics and function of bacterial lipopolysaccharides and their endotoxic potential in humans. **International Reviews of Immunology**, p. 1–31, 2015.

GYETKO, M. R.; SHOLLENBERGER, S. B.; SITRIN, R. G. Urokinase expression in mononuclear phagocytes: cytokine-specific modulation by interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 51, n. 3, p. 256–263, 1992.

HAAS, J. G.; BAEUERLE, P. a; RIETHMULLER, G.; ZIEGLER-HEITBROCK, H. W. Molecular mechanisms in down-regulation of tumor necrosis factor expression. **Proceeding of the National Academic of Sciences U.S.A**, v. 87, p. 9563–9567, 1990.

HAFENRICHTER, D. G.; ROLAND, C. R.; MANGINO, M. J.; FLYE, M. W. The Kupffer cell in endotoxin tolerance: mechanisms of protection against lethal endotoxemia. **Shock**, v. 2, n. 4, p. 251–256, 1994.

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, p. 674-678, 1993.

HIRSCHFELD, M.; WEIS, J. J.; TOSHCHAKOV, V.; SALKOWSKI, C. A.; CODY, M. J.; WARD, D. C.; QURESHI, N.; MICHALEK, S. M.; VOGEL, S. N. Signaling by Toll-Like Receptor 2 and 4 Agonists Results in Differential Gene Expression in Murine Macrophages. **Infectology & Immunology**, v. 69, n. 3, p. 1477–1482, 2001.

HODGSON, J. C. Endotoxin and mammalian host responses during experimental disease. **Journal of Comparative Pathology**, v. 135, n. 4, p. 157–175, 2006.

JANSKÝ, L.; REYMANOVÁ, P.; KOPECKÝ, J. Dynamics of cytokine production in human peripheral blood mononuclear cells stimulated by LPS or infected by *Borrelia*. **Physiological Research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca**, v. 52, n. 6, p. 593–598, 2003.

KAWAI, T.; AKIRA, S. The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition. **International Immunology**, v. 21, n. 4, p. 317–337, 2009.

KENNY, E. F. et al. MyD88 adaptor-like is not essential for TLR2 signaling and inhibits signaling by TLR3. **Journal of immunology**, v. 183, n. 6, p. 3642–3651, 2009.

KIKU, Y.; KUSANO, K.; MIYAKE, H.; FUKUDA, S.; TAKAHASHI, J.; INOTSUME, M.; HIRANO, S.; YOSHIHARA, T.; TORIBIO, R. E.; OKADA, H.; YOSHINO, T. Flow cytometric analysis of peripheral blood mononuclear cells induced by experimental endotoxemia in horse. **The Journal of Veterinary Medical Science / the Japanese Society of Veterinary Science**, v. 65, n. 8, p. 857–863, 2003.

LEMAY, L. G.; OTTERNESS, I. G.; VANDER, A. J.; KLUGER, M. J. In vivo evidence that the rise in plasma IL 6 following injection of a fever-inducing dose of LPS is mediated by IL 1 beta. **Cytokine**, v. 2, n. 3, p. 199–204, 1990.

LEON, L. R.; KOZAK, W.; KLUGER, M. J. Role of IL-10 in Inflammation: Studies Using Cytokine Knockout Mice. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 856, n. 1 MOLECULAR MEC, p. 69–75, 1998.

LI, X.; QIN, J. Modulation of Toll?interleukin 1 receptor mediated signaling. **Journal of Molecular Medicine**, v. 83, n. 4, p. 258–266, 2005.

LI, X.; JIANG, S.; TAPPING, R. I. Toll-like receptor signaling in cell proliferation and survival. **Cytokine**, v. 49, n. 1, p. 1–9, 2010.

LOCKETT, A.; GOEBL, M. G.; HARRINGTON, M. A. Transient membrane recruitment of IRAK-1 in response to LPS and IL-1beta requires TNF R1. **American Journal of Physiology. Cell Physiology**, v. 295, n. 2, p. C313–323, 2008.

LOHMANN, K. L.; VANDENPLAS, M.; BARTON, M. H.; MOORE, J. N. Lipopolysaccharide from *Rhodobacter sphaeroides* is an agonist in equine cells. **Journal of Endotoxin Research**, v. 9, n. 1, p. 33–37, 2003.

MARTIN, H.; OLANDER, B.; NORMAN, M. Reactive hyperemia and interleukin 6, interleukin 8, and tumor necrosis factor-alpha in the diagnosis of early-onset

neonatal sepsis. **Pediatrics**, v. 108, n. 4, p. E61, 2001.

MEDZHITOV R; PRESTON-HURLBURT P; JANEWAY CA JR. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. **Nature**, v. 388, n. 6640, p. 394–397, 1997.

MIYAKE, K. Roles for accessory molecules in microbial recognition by Toll-like receptors. **Journal of Endotoxin Research**, v. 12, n. 4, p. 195–204, 2006.

MOORE, J.N. Endotoxemia and septicemia as causes of shock. In: COLAHAN, P.T.; MAYHEW, I.G.; MERRITT, A.M.; MOORE, J.N. **Equine Medicine and Surgery**, 5.ed. Missouri: Mosby, p. 218-224, 1999.

MOORE, J.N. Introduction to endotoxemia. In: American Association Equine Practice, 41. 1995. **Proceedings Lexington: AAEP**, 1995.

MOORE, J. N. Milne lecture : gastrointestinal disease II : A Perspective on Endotoxemia. **Proceedings of the Annual Convention of the AAEP**, v. 47, 2001.

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. **The Cornell Veterinarian**, v. 79, n. 3, p. 231–247, 1989.

MORRIS, M. C.; GILLIAM, E. A.; LI, L. Innate Immune Programing by Endotoxin and Its Pathological Consequences. **Frontiers in Immunology**, v. 5, p. 1–8, 2015.

MORRISON, D. C.; ULEVITCH, R. J. The Effects of Bacterial Endotoxins on Host Mediation Systems. **American Journal of Pathology**, p. 527–601, 1978.

MORRISON, D. C.; DANNER, R. L.; DINARELLO, C. A.; MUNFORD, R. S.; NATANSON, C.; POLLACK, M.; SPITZER, J. J.; ULEVITCH, R. J.; VOGEL, S. N.; MCSWEEGAN, E. Bacterial endotoxins and pathogenesis of Gram-negative infections: current status and future direction. **Innate Immunity**, v. 1, n. 2, p. 71–83, 1994.

MUZIO, M.; NI, J.; FENG, P.; DIXIT, V. M. IRAK (Pelle) family member IRAK-2 and MyD88 as proximal mediators of IL-1 signaling. **Science**, v. 278, n. 5343, p. 1612–1615, 1997.

NEAGOS, J.; STANDIFORD, T. J.; NEWSTEAD, M. W.; ZENG, X.; HUANG, S. K.; BALLINGER, M. N. Epigenetic Regulation of Tolerance to Toll-Like Receptor Ligands in Alveolar Epithelial Cells. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 53, n. 6, p. 872–881, 2015.

NOMURA, F.; AKASHI, S.; SAKAO, Y.; SATO, S.; KAWAI, T.; MATSUMOTO,

M.; NAKANISHI, K.; KIMOTO, M.; MIYAKE, K.; TAKEDA, K.; AKIRA, S. Cutting edge: endotoxin tolerance in mouse peritoneal macrophages correlates with down-regulation of surface toll-like receptor 4 expression. **Journal of Immunology**, v. 164, n. 7, p. 3476–3479, 2000.

OGAWA, H.; RAFIEE, P.; HEIDEMANN, J.; FISHER, P. J.; JOHNSON, N. A.; OTTERSON, M. F.; KALYANARAMAN, B.; PRITCHARD, K. A.; BINION, D. G. Mechanisms of Endotoxin Tolerance in Human Intestinal Microvascular Endothelial Cells. **The Journal of Immunology**, v. 170, n. 12, p. 5956–5964, 2003.

OLSON, N. C.; HELLYER, P. W.; DODAM, J. R. Mediators and vascular effects in response to endotoxin. **The British Veterinary Journal**, v. 151, n. 5, p. 489–522, 1995.

OPP, M.; OBAL, F.; CADY, A.B. Interleukin-6 is pyrogenic but not somnogenic. **Physiology & Behave**. v. 45, p. 1069-1072, 1989.

O'REILLY, S. M.; MOYNAGH, P. N. Regulation of Toll-like receptor 4 signalling by A20 zinc finger protein. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 303, n. 2, p. 586–593, 2003.

OZINSKY, A.; UNDERHILL, D. M.; FONTENOT, J. D.; HAJJAR, A. M.; SMITH, K. D.; WILSON, C. B.; SCHROEDER, L.; ADEREM, A. The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 25, p. 13766–13771, 2000.

PAIK, Y.-H.; SCHWABE, R. F.; BATALLER, R.; RUSSO, M. P.; JOBIN, C.; BRENNER, D. A. Toll-like receptor 4 mediates inflammatory signaling by bacterial lipopolysaccharide in human hepatic stellate cells. **Hepatology**, v. 37, n. 5, p. 1043–1055, 2003.

PALSSON-MCDERMOTT, E. M.; O'NEILL, L. A. J. Signal transduction by the lipopolysaccharide receptor, Toll-like receptor-4. **Immunology**, v. 113, n. 2, p. 153–162, 2004.

PETZL, W.; GUNTHER, J.; PFISTER, T.; SAUTER-LOUIS, C.; GOETZE, L.; VON AULOCK, S.; HAFNER-MARX, A.; SCHUBERTH, H. J.; SEYFERT, H. M.; ZERBE, H. Lipopolysaccharide pretreatment of the udder protects against experimental *Escherichia coli* mastitis. **Innate Immun**, v. 18, n. 3, p. 467–477, 2012.

QUINN, E. M.; WANG, J.; REDMOND, H. P. The emerging role of microRNA in regulation of endotoxin tolerance. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 91, n. 5, p. 721–727, 2012.

POLTORAK, A.; X. HE, I. SMIRNOVA, M.Y. LIU, C.V. HUFFEL, X. DU, D. BIRDWELL, E. ALEJOS, M. SILVA, C. GALANOS, M. FREUDENBERG, P. RICCIARDI-CASTAGNOLI, B. LAYTON; BEUTLER, B. Defective LPS Signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr Mice: Mutations in *Tlr4* Gene. **Science**, v. 282, n. 5396, p. 2085-2088, 1998.

ROBERTS, M.C. Endotoxemia and inflammatory mediators in equine colitis. **Proceedings Annual Meeting Indianapolis AAEP**, v. 41, p. 107-111, 1995.

SAXENA, A.; KHOSRAVIANI, S.; NOEL, S.; MOHAN, D.; DONNER, T.; HAMAD, A. R. A. Interleukin-10 paradox: A potent immunoregulatory cytokine that has been difficult to harness for immunotherapy. **Cytokine**, v. 74, n. 1, p. 27–34, 2014.

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. **American Journal of Veterinary Research**, v. 51, n. 8, p. 1221–1225, 1990.

SILVERMAN, N. NF-kappaB signaling pathways in mammalian and insect innate immunity. **Genes & Development**, v. 15, n. 18, p. 2321–2342, 2001.

SMITH, C. L.; DOWLING, B. A.; DART, A. J. Recent advances in equine abdominal surgery. **Veterinary Journal**, v. 170, n. 1, p. 41–51, 2005.

SOUZA, J. R. M.; OLIVEIRA, R. T.; BLOTTA, M. H. S. L.; COELHO, O. R. Serum levels of interleukin-6 (Il-6), interleukin-18 (Il-18) and C-reactive protein (CRP) in patients with type-2 diabetes and acute coronary syndrome without ST-segment elevation. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 90, n. 2, p. 86–90, 2008.

SUN, Y.; LI, H.; YANG, M. F.; SHU, W.; SUN, M. J.; XU, Y. Effects of aging on endotoxin tolerance induced by lipopolysaccharides derived from *porphyromonas gingivalis* and *escherichia coli*. **PLoS ONE**, v. 7, n. 6, p. 1–9, 2012.

TAKEDA, K. Evolution and integration of innate immune recognition systems: the Toll-like receptors. **Journal of Endotoxin Research**, v. 11, n. 1, p. 51–55, 2005.

TAKEDA, K.; AKIRA, S. TLR signaling pathways. **Seminars in Immunology**, v. 16, n. 1, p. 3–9, 2004.

TAKEDA, K.; AKIRA, S. Toll-like receptors in innate immunity. **International Immunology**, v. 17, n. 1, p. 1–14, 2005.

TAKEDA, K.; KAISHO, T.; AKIRA, S. Toll-like receptors. **Annual Review of**

Immunology, v. 21, n. 1, p. 335–376, 2003.

TAKEUCHI, O.; AKIRA, S. Toll-like receptors: their physiological role and signal transduction system. **International Immunopharmacology**, v. 1, n. 4, p. 625–635, 2001.

THOMAS, P.; LAZURE, D. A.; MOUSSA, R.; BAJENOVA, O.; BURKE, P. A.; GANGULY, A.; FORSE, R. A. Identification of two novel LPS-binding proteins in Kupffer cells: implications in TNF-alpha production. **Journal of Endotoxin Research**, v. 12, n. 6, p. 352–357, 2006.

TSAN, M.-F.; GAO, B. Pathogen-associated molecular pattern contamination as putative endogenous ligands of Toll-like receptors. **Journal of Endotoxin Research**, v. 13, n. 1, p. 6–14, 2007.

VARTANIAN, K. B.; STEVENS, S. L.; MARSH, B. J.; WILLIAMS-KARNESKY, R.; LESSOV, N. S.; STENZEL-POORE, M. P. LPS preconditioning redirects TLR signaling following stroke: TRIF-IRF3 plays a seminal role in mediating tolerance to ischemic injury. **Journal of Neuroinflammation**, v. 8, n. 1, p. 140, 2011.

WALDSCHMIDT, I.; PIROTTIN, D.; ART, T.; AUDIGIÉ, F.; BUREAU, F.; TOSI, I.; EL ABBAS, S.; FARNIR, F.; RICHARD, E.; DUPUIS, M.-C. Experimental model of equine alveolar macrophage stimulation with TLR ligands. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 155, n. 1-2, p. 30–37, 2013.

WERTZ, I. E.; O'ROURKE, K. M.; ZHOU, H.; EBY, M.; ARAVIND, L.; SESHAGIRI, S.; WU, P.; WIESMANN, C.; BAKER, R.; BOONE, D. L.; MA, A.; KOONIN, E. V.; DIXIT, V. M. De-ubiquitination and ubiquitin ligase domains of A20 downregulate NF-kB signalling. **Nature**, v. 430, n. 7000, p. 694–699, 2004.

WRIGHT, S. D. et al. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. **Science**, v. 249, n. 4975, p. 1431–1433, 1990.

WU, T.-T.; CHEN, T.-L.; CHEN, R.-M. Lipopolysaccharide triggers macrophage activation of inflammatory cytokine expression, chemotaxis, phagocytosis, and oxidative ability via a toll-like receptor 4-dependent pathway: validated by RNA interference. **Toxicology Letters**, v. 191, n. 2-3, p. 195–202, 2009.

YAMAMOTO, M.; SATO, S.; HEMMI, H.; UEMATSU, S.; HOSHINO, K.; KAISHO, T.; TAKEUCHI, O.; TAKEDA, K.; AKIRA, S. TRAM is specifically involved in the Toll-like receptor 4-mediated MyD88-independent signaling pathway. **Nature Immunology**, v. 4, n. 11, p. 1144–1150, 2003.

YANG, Q.; CALVANO, S. E.; LOWRY, S. F.; ANDROULAKIS, I. P. A dual negative regulation model of Toll-like receptor 4 signaling for endotoxin preconditioning in human endotoxemia. **Mathematical Biosciences**, v. 232, n.

2, p. 151–163, 2011.

YOZA, B. K.; HU, J. Y.-Q.; MCCALL, C. E. Inhibition of histone deacetylation enhances endotoxin-stimulated transcription but does not reverse endotoxin tolerance. **Journal of Endotoxin Research**, v. 8, n. 2, p. 109–114, 2002.

YOZA, B. K.; HU, J. Y.; COUSART, S. L.; MCCALL, C. E. Endotoxin inducible transcription is repressed in endotoxin tolerant cells. **Shock**, v. 13, n. 3, p. 236–243, 2000.

ZHOU, F.; CIRIC, B.; LI, H.; YAN, Y.; LI, K.; CULLIMORE, M.; LAURETTI, E.; GONNELLA, P.; ZHANG, G.-X.; ROSTAMI, A. IL-10 deficiency blocks the ability of LPS to regulate expression of tolerance-related molecules on dendritic cells. **European Journal of Immunology**, v. 42, n. 6, p. 1449–1458, 2012.

ZÍDEK, Z.; ANZENBACHER, P.; KMONÍCKOVÁ, E. Current status and challenges of cytokine pharmacology. **British Journal of Pharmacology**, v. 157, n. 3, p. 342–361, 2009.

VIII APÊNDICES

8.1 Apêndice A – Tabela dos valores de “fold change” e a regulação dos genes IL-10, IL-1 β , IL-6, MyD88 e TICAM1 (TRIF) e seus respectivos EnsemblID e GenebankAccession.

8.2 Apêndice B – Tabela dos valores de “fold change” e a regulação dos genes TLR-4, TLR-2, TRAM2, TNF- α e TNFAIP3 (A20) e seus respectivos EnsemblID e GenebankAccession.

APÊNDICE A — Tabela dos valores de “fold change” e a regulação dos genes IL-10, IL-1 β , IL-6, MyD88 e TICAM1 (TRIF) e seus respectivos EnsemblID e GenebankAccession. Dados gerados pela análise no software GeneSpring ao analisarmos as interações simples da correlação tempo, dose e tempo-dose (com 26.176 genes). ANOVA 2 fatores com teste de correlações múltiplas Benjamini-Hochberg p < 0,05.

FOLD CHANGE	GENE SYMBOL				
	IL10	IL1B	IL6	MYD88	TICAM1
([2-0] vs [0-0])	-1,1570832	1,5926164	-1,4689944	1,054186	1,4285128
Regulation	down	up	down	up	up
([2-1] vs [0-0])	4,1253905	124,56355	19,581457	-1,6395975	7,466436
Regulation	up	up	up	down	up
([2-10] vs [0-0])	7,5103245	222,5786	62,032784	1,3069265	7,659981
Regulation	up	up	up	up	up
([4-0] vs [0-0])	-1,1402282	2,09899	-1,6307956	1,6580116	1,3137162
Regulation	down	up	down	up	up
([4-1] vs [0-0])	4,273254	67,4417	1,6961445	-1,082421	5,144012
Regulation	up	up	up	down	up
([4-10] vs [0-0])	6,0739183	105,21847	5,3639035	1,9890404	4,419417
Regulation	up	up	up	up	up
([8-0] vs [0-0])	-1,9545557	2,3362324	-1,3704377	2,0266297	1,039772
Regulation	down	up	down	up	up
([8-1] vs [0-0])	6,673496	35,086937	-1,0831903	-1,1665864	2,962193
Regulation	up	up	down	down	up
([8-10] vs [0-0])	9,547626	41,95908	1,5110271	-1,2336475	4,375447
Regulation	up	up	up	down	up
EnsemblID	ENSECAT00000009338	ENSECAT00000000066	ENSECAT00000017492	ENSECAT00000002299	ENSECAT00000004884
GenbankAccession	NM_001082490	NM_001082526	NM_001082496	XM_001488549	XM_005611476

APÊNDICE B — Tabela dos valores de “fold change” e a regulação dos genes TLR-4, TLR-2, TRAM2, TNF- α e TNFAIP3 (A20) e seus respectivos EnsemblID e GenbankAccession. Dados gerados pela análise no software GeneSpring ao analisarmos as interações simples da correlação tempo, dose e tempo-dose (com 26.176 genes). ANOVA 2 fatores com teste de correlações múltiplas Benjamini-Hochberg $p < 0,05$.

FOLD CHANGE	GENE SYMBOL				
	TLR2	TLR4	TNF	TNFAIP3	TRAM2
([2-0] vs [0-0])	2,0998461	1,162193	-2,9357755	1,7147148	-2,6564102
Regulation	up	up	down	up	down
([2-1] vs [0-0])	1,8154798	3,9239378	-1,169163	19,988369	1,4514196
Regulation	up	up	down	up	up
([2-10] vs [0-0])	1,8481104	4,8837147	-1,1824691	29,61304	-2,0327713
Regulation	up	up	down	up	down
([4-0] vs [0-0])	1,6362078	1,1749916	-3,7794015	2,471089	-2,1333287
Regulation	up	up	down	up	down
([4-1] vs [0-0])	3,8942485	1,6214268	-2,388301	15,107737	-2,5145228
Regulation	up	up	down	up	down
([4-10] vs [0-0])	4,5470266	1,6440024	-4,643018	18,928522	-3,125604
Regulation	up	up	down	up	down
([8-0] vs [0-0])	1,0646323	-1,0238024	-7,555481	2,5871444	-3,6956468
Regulation	up	down	down	up	down
([8-1] vs [0-0])	4,1413703	1,6021578		11,178497	-2,8544154
Regulation	up	up	down	up	down
([8-10] vs [0-0])	5,441588	1,6690583	-2,5272987	10,320568	-5,03633
Regulation	up	up	down	up	down
EnsemblID	ENSECAT00000019013	ENSECAT00000010707	ENSECAT00000002048	ENSECAT00000010015	ENSECAT00000011439
GenbankAccession	NM_001081796	NM_001099769	NM_001081819	XM_001504414	XM_001499006