

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS**

**IMPORTÂNCIA DO RECEPTOR TOLL-SÍMILE 4 (*"TOLL-LIKE RECEPTOR 4"*) NA
DISFUNÇÃO DA BARREIRA INTESTINAL APÓS TRAUMA E CHOQUE HEMORRÁGICO
EXPERIMENTAL**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS DA FACULDADE DE
MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA-UnB**

LUIZ GUILHERME CINTRA VIDAL REYS

Orientador

Prof. Dr. Paulo Gonçalves de Oliveira

Co-orientador

Prof. Dr. Raul Coimbra

Brasília – 2013

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade de Brasília. Acervo 1013517.

Reys, Luiz Guilherme Cintra Vidal.
R466i Importância do receptor Toll-símile 4 ("Toll-Like Receptor 4") na disfunção da barreira intestinal após trauma e choque hemorrágico experimental / Luiz Guilherme Cintra Vidal Reys. -- 2013.
62 f. : il. ; 30 cm.

Tese (doutorado) - Universidade de Brasília, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, 2013.
Inclui bibliografia.
Orientação: Paulo Gonçalves de Oliveira ; Coorientação: Raul Coimbra.

1. Mucosa intestinal. 2. Choque hemorrágico. 3. Intestinos - Cirurgia. I. Oliveira, Paulo Gonçalves de. II. Coimbra, Raul. III. Título.

CDU 616.34

**IMPORTÂNCIA DO RECEPTOR TOLL-SÍMILE 4 (“*TOLL-LIKE RECEPTOR 4*”) NA
DISFUNÇÃO DA BARREIRA INTESTINAL APÓS TRAUMA E CHOQUE HEMORRÁGICO
EXPERIMENTAL**

LUIZ GUILHERME CINTRA VIDAL REYS

Orientador e Co-orientador

Prof. Dr. Paulo Gonçalves de Oliveira

Professor Associado da Faculdade de Medicina, Área de
Clínica Cirúrgica, da Universidade de Brasília – DF, Brasil

Prof. Dr. Raul Coimbra

Professor Livre-Docente do Departamento de Cirurgia, Chefe
da Divisão de Trauma, Cuidados Cirúrgicos Intensivos e
Queimados da Universidade da Califórnia em San Diego –
Califórnia, Estados Unidos da América

**Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências
Médicas da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, como
requisito parcial para obtenção do Grau de Doutor (Área de
Concentração: Medicina)**

Brasília

2013



**RELATÓRIO DE DEFESA DE TESE
DOUTORADO**

Universidade de Brasília - UnB
Decanato de Pesquisa e Pós-Graduação - DPP
Secretaria de Administração Acadêmica - SAA

1 - Identificação do Aluno

Nome Luiz Guilherme Cintra Vidal Reys		Matrícula 09/0151836
Curso Ciências Médicas		
Área de Concentração Medicina	Código 7943	Departamento FMD

2 - Sessão de Defesa de Tese

Título
"IMPORTÂNCIA DO RECEPTOR TOLL-SIMILE 4 ("TOLL-LIKE RECEPTOR 4") NA DISFUNÇÃO DA BARREIRA INTESTINAL APÓS TRAUMA E CHOQUE HEMORRÁGICO EXPERIMENTAL."

3 - Comissão Examinadora

Nome	Função	Assinatura
PAULO GONCALVES DE OLIVEIRA (Doutor)	Membro Interno vinculado ao programa (Presidente) Faculdade de Medicina	
JAIME MARTINS DE SANTANA (Doutor)	Membro Interno vinculado ao programa Departamento de Biologia Celular	
JOAO BATISTA DE SOUSA (Doutor)	Membro Interno vinculado ao programa Faculdade de Medicina	
LEOPOLDO LUIZ DOS SANTOS NETO (Doutor)	Membro Interno vinculado ao programa Faculdade de Medicina	
EDUARDO CREMA (Doutor)	Membro Externo não vinculado ao programa Universidade Federal do Triângulo Mineiro	
RONALDO MAFIA CUENCA (Doutor)	Membro Interno não vinculado ao programa (Suplente) Faculdade de Medicina	

4 - Resultado

A Comissão Examinadora, em 13/12/2013 após exame da **Defesa de Tese** e arguição do candidato, decidiu:

Pela aprovação da **Tese** Pela aprovação da **Tese**, com revisão de forma, indicando o prazo de até 30 dias para apresentação definitiva do trabalho revisado.

Pela reprovação da **Tese** Pela reformulação da **Tese**, indicando o prazo de _____ para nova versão.

Preencher somente em caso de revisão de forma:

- O aluno apresentou a revisão de forma e a **Tese** foi aprovada.
- O aluno apresentou a revisão de forma e a **Tese** foi reprovada.
- O aluno não apresentou a revisão de forma.

Autenticação
Presidente da Comissão Examinadora

13,12,13
Data

Assinatura/Carimbo

Autenticação
Coordenador do Curso

Ciente
Aluno

_____/_____/_____
Data Assinatura/Carimbo

13,12,13
Data

Assinatura/Aluno

Este relatório não é conclusivo e não tem efeitos legais sem a aprovação do Decanato de Pesquisa e Pós-graduação da Universidade de Brasília.

Aprovação do Decanato de Pesquisa e Pós-Graduação

Decisão:

Homologar

_____/_____/_____
Data

Assinatura do Decano

Ao meu pai, Elmo Reys, "*in memoriam*".

Dedicado à
minha esposa Marineide,
impulso ao levantar vôo.

Ao sul da Califórnia,
energia para seguir viagem.

Pai e Mãe,
exemplos na vida e ninho seguro para repouso
estratégico.

As minhas filhas Manuela, Daniela e Luiza, asas
que me permitiram voar...

AGRADECIMENTOS

Ao Professores Doutores Paulo Gonçalves de Oliveira e Raul Coimbra pelo companheirismo, amizade e confiança na condução dos trabalhos.

Aos Professores Doutores Anamélia Lorenzetti Bocca, Jaime Martins de Santana, André Luiz Vianna, Florêncio Figueiredo e Leopoldo Luiz dos Santos Neto, por terem aberto as portas de seus corações e mentes para me auxiliar em momentos críticos, e dos quais muito me orgulho em ser colega de profissão e amigo.

Aos colegas da Departamento de Cirurgia da Universidade da Califórnia de San Diego (UCSD), da Divisão de “*Trauma, Surgical Critical Care and Burns - UCSD*” e da Clínica Cirúrgica do HUB-UnB, pelos conhecimentos compartilhados, convivência sincera e divertida, comportamentos raríssimos nos dias de hoje.

Aos meus colegas do laboratório de “*Basic Science and Clinical Research – UCSD Trauma Division*”, Yan T. Ortiz-Pomales, Michael Krzyzaniak, Carrie Peterson, Willian Loomis, Nicole Lopez, Gerald Cheadle, Alexandra Borboa, Emily Ambum, Anne Hageny, X. Dang, J. Lee, J. Putnam, S. Y. Ryu, Brian Eliceiri, Andrew Baird, Vishal Bansal e Todd W. Costantini, pela convivência diária e pela ajuda durante meu “*Fellowship*”.

À Universidade de Brasília – Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas, Secretaria de Estado de Saúde do Distrito Federal, E.S.C.S./F.E.P.E.C.S e Ministério da Saúde pela concessão de licença para doutorado no exterior com manutenção de proventos parciais, responsáveis pela minha permanência no exterior.

"O erro não se torna verdade por se difundir e multiplicar facilmente. Do mesmo modo,
a verdade não se torna erro pelo fato de ninguém a ver."

Mahatma Ghandi

Reflexões sobre outras sociedades possíveis.

E haverá ainda quem tenha talento para dar uma boa aula.
Aplauso sem dinheiro. Porque nada é perfeito.
E as coisas são o que são.

Já que a sociedade triunfa sobre nossa singularidade afetiva,
a vida boa pressupõe um alinhamento.
Uma adequação entre nossas inclinações e o que os demais esperam de nós.
Para que nos aplaudam. Ou, para que apanhemos menos.
Não gostou? Muitos não se conformam.
Afinal, alinhar-se com uma sociedade injusta em busca de uma vida boa parece
indigno.
Para estes inconformados, esta vida boa seria bem outra. Desalinhada. Engajada.
Num processo transformador. Num movimento revolucionário.
A vida que vale a pena ser vivida...

Clóvis de Barros Filho

RESUMO

Introdução: A ativação do receptor Toll-símile 4 ou "*Toll-Like Receptor-4 (TLR4)*" após lesão estéril leva à disfunção de órgãos em locais distantes. Tem sido demonstrado anteriormente que a ruptura da barreira intestinal e alteração em proteínas das junções apertadas segue-se ao choque trauma/choque hemorrágico (T/HS), no entanto, o papel de TLR4, este processo permanece obscuro. Foi postulado que o aumento da permeabilidade e a ruptura da barreira intestinal após T/HS é um processo TLR4 dependente, portanto, silenciar o gene TLR4 teria um efeito protetor sobre a disfunção intestinal induzida por T/HS. **Método:** Camundongos machos C57BL/6J (TLR4^{+/+} do tipo selvagem ou "*wild-type*" [WT]) e C57BL/10ScN (TLR4^{-/-} transgênico ou "*knockout*" [KO]) foram distribuídos aleatoriamente e submetidos a T/HS (laparotomia mediana + choque hemorrágico com pressão arterial média mantida em 35mmHg por 60 minutos) ou submetidos a operação simulada. Após 4h, a permeabilidade ao isotiocianato de fluoresceína (FITC)-dextrano administrado intraluminalmente foi avaliada por quantificação da fluorescência do plasma. Amostras intestinais foram analisadas para a presença das proteínas das junções apertadas, ocludina e ZO-1, por imunohistoquímica. **Resultados:** As concentrações séricas de FITC-dextran 4kDa estavam diminuídas no grupo TLR4^{-/-}[KO] em comparação com camundongos TLR4^{+/+}[WT] quando submetidos ao modelo de T/HS (38,96 vs 164,26 µg/ml, respectivamente, p<0,05). Não foram observadas diferenças na permeabilidade intestinal entre os camundongos TLR4^{-/-}[KO] e os animais do grupo simulação TLR4^{+/+}[WT]. Os camundongos KO tiveram preservação das concentrações de ocludina e ZO-1 após a lesão T/HS em ensaios de imunohistoquímica, mas as concentrações estavam reduzidas em animais WT. **Conclusão:** Camundongos com TLR4^{-/-}[KO] demonstraram menor permeabilidade intestinal ao FITC-dextrano do que camundongos WT após lesão por T/HS resultantes de alterações nas proteínas das junções apertadas, ocludina e ZO-1. Estes achados sugerem que a maior permeabilidade e a ruptura da barreira intestinal após lesão por T/HS é um processo TLR4-dependente.

Palavras-chave: Receptor Toll-like 4, mucosa intestinal, junções intercelulares, traumatismo múltiplo, choque hemorrágico.

ABSTRACT

Objective: Toll-like receptor 4 (TLR4) activation after sterile injury leads to organ dysfunction at distant sites. Has been shown previously that intestinal barrier breakdown and alteration of tight junction proteins follows trauma/hemorrhagic shock (T/HS); however, the role of TLR4 in this process remains unclear. Was postulated that increased intestinal permeability and barrier breakdown after T/HS is a TLR4 dependent process; hence, knocking down the TLR4 gene would have a protective effect on T/HS-induced intestinal dysfunction. **Method:** Male C57BL/6J (TLR4 wild type [WT]) and C57BL/10ScN (TLR4 knockout [K0]) mice were assigned randomly to either T/HS (femoral catheterization + laparotomy + hemorrhagic shock) or sham injury. At 4h, permeability to intraluminally administered fluorescein isothiocyanate (FITC)-dextran was assessed by measuring the fluorescence of the serum. Intestinal samples were analyzed for the presence of the tight junction proteins, occludin and ZO-1, by immunohistochemistry. **Results:** Serum concentrations of FITC-dextran were decreased in K0 mice compared with WT mice after T/HS injury (38,96 $\mu\text{g/ml}$ and 164,26 $\mu\text{g/ml}$, respectively; $p < 0,05$). After injury, no difference in intestinal permeability was observed between the K0 mice and the WT sham-treated mice. The K0 mice had preservation of occluding and ZO-1 concentrations after T/HS injury in immunohistochemistry assays, but concentrations were decreased in WT animals. **Conclusions:** Mice with TLR4K0 have less intestinal permeability to FITC-dextran than WT mice after T/HS injury as a result of alterations in the tight junction proteins occludin and ZO-1. These findings suggest that the greater intestinal permeability and barrier breakdown after T/HS injury is a TLR4-dependent process.

Keywords: Toll-Like Receptor 4, intestinal mucosa, intercellular junctions, multiple trauma, hemorrhagic shock.

ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Eixo entérico-hepático/linfático-pulmonar em resposta ao choque hemorrágico.....	1
Figura 2: “TLR4-knockout <i>Drosophila melanogaster</i> ” com várias hifas de fungos em sua superfície corporal.....	2
Figura 3: Vias de sinalização no receptores Toll-símiles.....	3
Figura 4: Mecanismo de ativação de TLR4 e vias de sinalização inflamatória.....	5
Figura 5: Ativação dos receptores TLR2 pelo TLR4 modulando a lesão pulmonar aguda.....	6
Figura 6: Visão esquemática do histórico das descobertas relacionadas aos receptores Toll-símiles até os dias atuais.....	8
Figura 7: O papel do NAD(P)H-oxidase na inflamação mediada pelo TLR4.....	12
Figura 8: Visão externa e interna do Laboratório de Ciências Básicas e Pesquisa Clínica da Divisão de Trauma, Queimados e Cuidados Críticos da UCSD.....	14
Figura 9: Aspecto morfológico do camundongo C57BL/6 – tipo selvagem ou “Wild Type” [WT] e bancada do modelo experimental de trauma/choque hemorrágico com execução simultânea em dois animais.....	15
Figura 10: Camundongo sendo submetido a cateterização da artéria femoral no modelo experimental de choque hemorrágico, com PAM alvo entre 30-40mmHg.....	16
Figura 11: Esquema didático das etapas do modelo de permeabilidade intestinal “in vivo”.....	17
Figura 12: Imagem do microscópio ótico Olympus FSX100 (Center Valley, PA, USA).....	18
Figura 13: Imagem da bancada do Microscópio Confocal Olympus FluoView™ com varredura à Laser.....	19

Figura 14. Gráfico demonstrativo dos resultados do experimento de permeabilidade intestinal ao FITC-Dextran após T/HS entre os diversos grupos.....	21
Figura 15. Avaliação histopatológica do íleo terminal nos diferentes grupos, de acordo com o escore de lesão.....	22
Figura 16. Gráfico com avaliação histopatológica dos segmentos de intestino delgado (íleo terminal) nos diversos grupos, de acordo com o escore de lesão.....	23
Figura 17. Gráfico de barras demonstrativo da expressão da ocludina intestinal analisada por microscopia confocal, entre os diversos grupos.....	24
Figura 18. Imagens de microscopia confocal demonstrativos da expressão da ocludina intestinal analisada por microscopia confocal, entre os diversos grupos.....	24
Figura 19. Gráfico e imagens da imunohistoquímica para ZO-1 com análise do espaçamento das junções intercelulares por microscopia confocal, entre os diversos grupos.....	26
Figura 20: Representação gráfica das estruturas das junções intercelulares intestinais e proteínas do citoesqueleto.....	29

LISTA DE ABREVIATURAS

BMDC	Bone marrow derived mast cells, mastócitos derivados de medula óssea
CD14	CD14 monocyte differentiation antigen, antígeno CD14
c-Jun	Proto-oncogene jun
CpG	Cytosine-phosphate diester-guanine
DAMPs	Damage-Associated molecular patterns, padrões moleculares associados a dano celular
DNA	Ácido desoxiribonucléico
DNP-IgE	2,4-dinitrophenyl-conjugated mouse IgE
DNP-HAS	Dinitrophenylated human serum albumin
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
FcεR1	High-affinity receptor for IgE
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2'-ethanesulfonic Acid
HMGB1	Proteína High-Mobility Group Box 1
IFN	Interferon
IgE	Imunoglobulina classe E
IL	Interleucina
IKK	Inibidor kappa beta kinase
IRAK	IL-1R-associated kinase, quinase associada ao receptor de IL1
IRF3	Interferon regulatory factor 3, fator regulador de interferon 3
JAK	Janus kinase
JNK	c-Jun terminal protein kinase
KO LPS	Lipopolysaccharides, lipopolissacárides

LBP	LPS binding protein, proteína ligadora de LPS
Mal	MyD88 adaptor-like, adaptador semelhante a MyD88
MD-2	MD-2 protein, lymphocyte antigen 96
MyD88	Myeloid differentiation factor 88
MyD88s	Spliced myeloid differentiation Factor 88
MAPK	Mitogen-Activated protein kinase, proteinocinases ativadas por mitógenos
MYLK	Gene myosin light chain kinase
NF- κ B	Nuclear factor kappa beta, fator nuclear kappaB
NOD	Nucleotide-binding oligomerization domain
PI3K	Phosphoinositide 3-quinase
p-38MPAK	p-38 Mitogen-Activated protein kinase
PAM-3-Cys	Lipopeptide tripalmitoyl-S-glycerylcysteine
PAMPs	Pathogen-Associated molecular patterns, padrões moleculares associados a patógenos
PRR	Pattern recognition receptor, receptor de reconhecimento padrão
RNA	Ácido ribonucléico
SIGIRR	Single Immunoglobulin IL1 Receptor Related Molecule
SOCS	Suppressor of cytokine signaling proteins, supressores da sinalização por citocinas
ST2	Sulfurtransferase 2
STAT1	Signal transducers and activators of transcription 1, transdutor de sinal e ativador de transcrição 1

TAK1	Fator transformador de crescimento, cinase ativada por (TGF) β
TRAF-6	Tumor necrosis factor receptor associated factor 6, fator 6 associado ao receptor de TNF citoplasmático
TGF	Transforming growth factor, fator transformador de crescimento
TICAM	TIR domain-containing adaptor molecule
TIR	Toll-interleukin 1 receptor
TIRAP	TIR domain-containing adaptor protein, receptor de domínio Toll/interleucina
Th2	Linfócito T auxiliar (helper) produtor de IL4, IL5, IL6 e IL10
TLR	Toll-Like receptors, receptores tipo "Toll"
TNF α	Fator de necrose tumoral alfa
TRAM	TRIF-related adaptor molecule, molécula adaptadora relacionada ao TRIF
TREM-1	Triggering receptor expressed on myeloid cells 1
TRIF	TIR-domain containing adaptor inducing interferon- β , proteína adaptadora contida em domínio TIR indutora de IFN β

SUMÁRIO

	Página
INTRODUÇÃO	1
REVISÃO DA LITERATURA.....	7
OBJETIVO.....	13
MATERIAL E MÉTODO.....	14
Trauma/Choque hemorrágico experimental.....	14
Permeabilidade intestinal.....	16
Exame histopatológico.....	17
Imunohistoquímica.....	18
Análise estatística.....	19
RESULTADOS.....	21
Permeabilidade Intestinal ao FITC-Dextran após a lesão por trauma seguido de choque hemorrágico.....	21
Análise histopatológica após a lesão por trauma e choque hemorrágico experimental.....	22
Alterações na expressão intestinal da ocludina analisadas por microscopia confocal.....	23
Expressão da proteína ZO-1 e alterações no espaçamento dos complexos juncionais analisadas por microscopia confocal.....	25
DISCUSSÃO.....	27
PERSPECTIVAS.....	33
CONCLUSÃO.....	34
REFERÊNCIAS.....	35
ANEXO.....	46

INTRODUÇÃO

As lesões traumáticas graves e o choque hemorrágico tem papel fundamental no desencadeamento da resposta imune e estão relacionadas diretamente e indiretamente ao desenvolvimento das síndromes da resposta inflamatória sistêmica (SRIS) e da disfunção de múltiplos órgãos (SDMO) [1, 2, 3].

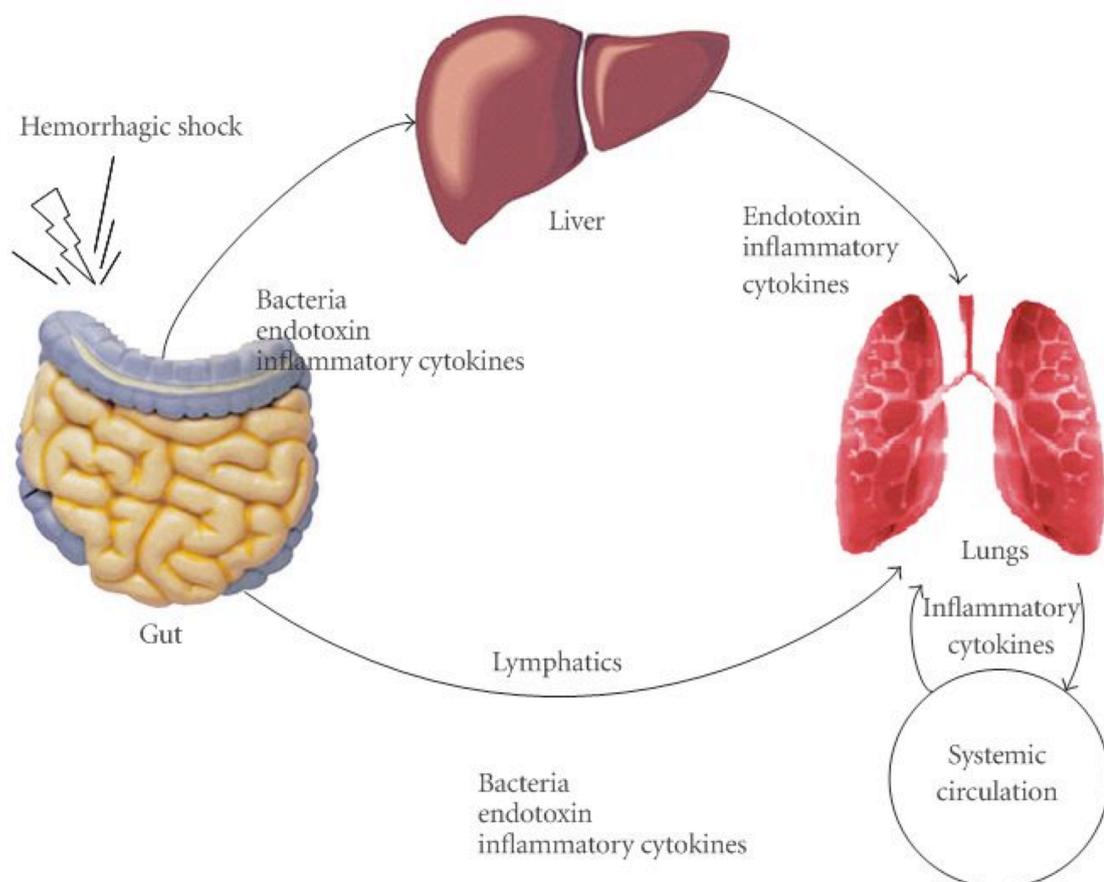


Figura 1: Eixo entérico-hepático/linfático-pulmonar em resposta ao choque hemorrágico. (Reproduzido de Modulation of acetylation: creating a pro-survival and anti-inflammatory phenotype in lethal hemorrhagic and septic shock. Li Y, Alam HB. *J Biomed Biotechnol.* 2011; 2011:523481. Epub 2011 Feb 15.)

A abordagem terapêutica do choque é atualmente quase que exclusivamente de suporte. Com a progressão do conhecimento fisiopatológico, o tratamento tem sido redirecionado, de suporte aos sistemas orgânicos em falência e combate à hipovolemia, rumo às alterações provocadas pela resposta inflamatória desequilibrada ao insulto inicial e aos seus efeitos deletérios sobre a função celular

[Fig.1]. Novas perspectivas tem sido aventadas com foco na resposta inadequada do sistema imune, considerando-se os avanços da biologia molecular e da epigenética, tendo como alvo as características da resposta orgânica à isquemia e reperfusão [1-4].

A descoberta de novos receptores celulares pavimentaram uma via de possibilidades terapêuticas na abordagem do choque hipovolêmico. Evidências tem se acumulado desde então a respeito da participação destes receptores em vários processos inflamatórios estéreis e infecciosos, organizando a resposta inata e modulando a resposta adaptativa [1- 5].

Em 1988 uma proteína transmembrana denominada "Toll" foi descrita no embrião da *Drosophila melanogaster* [Fig.2] e relacionada com a defesa deste inseto contra a invasão de microrganismos e fungos [3].



Figure 3-8
Kuby IMMUNOLOGY, Sixth Edition
© 2007 W.H. Freeman and Company

Figura 2: "*TLR4-knockout Drosophila melanogaster*" com várias hifas de fungos em sua superfície corporal. (Reproduzido de Kuby: Immunology, Sixth Edition, 2007)

Os receptores Toll (TLR) foram caracterizados como uma família de proteínas transmembrana essenciais na imunidade inata da drosófila. Receptores Toll-símiles foram posteriormente identificados em tecidos humanos. Um homólogo humano de "Toll", atualmente conhecido como Toll-símile 4 ou "*Toll-Like Receptor-4 (TLR4)*", demonstrou estar envolvido na expressão gênica de citocinas inflamatórias e

como uma linha de defesa inicial, até que os mecanismos imunes adaptativos sejam ativados. O sistema imune inato utiliza-se de um sistema de defesa evolucionariamente preservado codificado contra grupos de padrões moleculares, enquanto o sistema imune adaptativo baseia-se em respostas antígeno-específicas, com potencialidade para memória imunológica de longo prazo. Esta linha de resistência inicial compreende desde a fagocitose mediada pelo complemento, produção de moléculas co-estimulatórias e citocinas, assim como a produção de interferon [Fig.3], e tem como finalidade induzir respostas rápidas através do sistema imune inato do hospedeiro, que não requer uma exposição prévia aos patógenos [4].

Um dos mais importantes mecanismos da defesa imune inata são os receptores de reconhecimento de padrões (RRP). Estão descritos atualmente 3 classes de RRP: os receptores Toll-símile (TLR), os receptores NOD-símile (NOD) e os receptores RGI-símile (RGI). Os TLR se localizam ao nível de membranas celulares (citoplasmática e endossômica), sendo os receptores NODs e RGIs intracelulares [7].

Toll-símile 4, o receptor de sinalização dominante em mamíferos, desempenha papel importante na imunidade inata [Fig.4] e foi descrito originalmente como receptor de lipopolissacarídeos (LPS) [7-16]. Este receptor pode responder à patógenos (PAMP) e endotoxinas tanto quanto a vários ligantes endógenos, incluindo padrões moleculares associados ao dano celular (DAMP) que são liberados na circulação sistêmica após lesões assépticas [17, 18, 19], tendo sido correlacionado à disfunção cardíaca [20, 21], respiratória [22, 23] e hepatocelular [24, 25]. Entretanto, existe escassez de dados na literatura sobre os mecanismos iniciais de indução da resposta imune inata e o papel dos TLR4 na disfunção intestinal após a lesão por trauma seguido de choque hemorrágico.

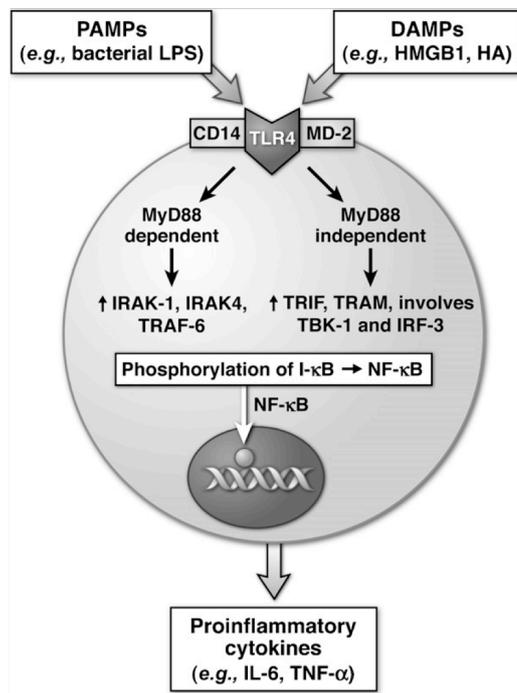


Figura 4: Mecanismo de ativação de TLR4 e vias de sinalização inflamatória. (Reproduzido de L.J. McGhan, D.E. Jaroszewski / Injury, Int. J. Care Injured 43 (2012) 129–136)

Os RRP podem ser divididos funcionalmente em secretores, sinalizadores e endocíticos. RRP sinalizadores reconhecem os ligantes e ativam vias de transdução de sinais que induzem a expressão de uma variedade de genes envolvidos na resposta imune, incluindo os efetores de citocinas, via ativação de NF-kappaB ou MAP-kinases. Os receptores da família Toll parecem ter papel principal na indução da resposta inflamatória e modulação da resposta adaptativa [6].

Os mecanismos moleculares de interação entre os TLRs e outros RRP do sistema inato estão começando a ser desvendados, envolvendo principalmente receptores NOD (nucleotide-binding oligomerization domain), incluindo a função de homeostase imunológica e no reconhecimento de componentes bacterianos e sinais de alarme endógenos, como HMGB1 (high-mobility group box 1) [7, 8].

Uma das funções fundamentais do epitélio intestinal é separar diferentes compartimentos e regular a complexa troca de substâncias entre os mesmos. Em contra-partida, o trato intestinal conta com numerosos mecanismos reguladores e de

defesa da integridade da barreira epitelial. Alterações na permeabilidade intestinal podem estimular uma resposta inflamatória gerando mediadores locais e sistêmicos que desempenham importante papel na disfunção de órgãos distantes [26, 27]. Portanto, a ruptura da função de barreira do epitélio intestinal tem sido correlacionada às síndromes de resposta inflamatória sistêmica (SRIS) e de disfunção de múltiplos órgãos (SDMO) após lesões por choque hemorrágico e queimaduras [Fig.5].

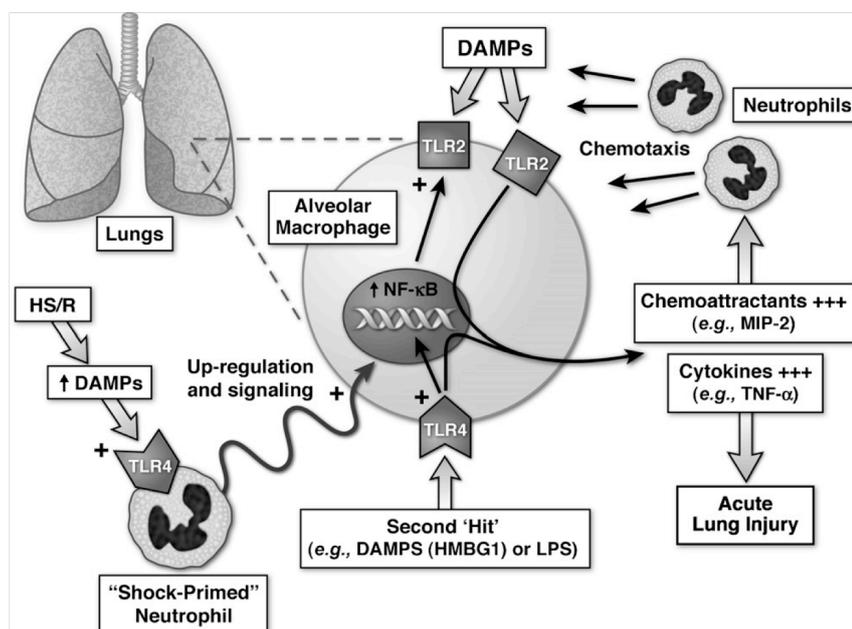


Figura 5: Ativação dos receptores TLR2 pelo TLR4 modulando a lesão pulmonar aguda. (Reproduzido de L.J. McGhan, D.E. Jaroszewski / Injury, Int. J. Care Injured 43 (2012) 129–136)

A hipótese a ser testada é se o aumento da permeabilidade e a ruptura da barreira após T/HS seria um processo dependente do TLR4.

REVISÃO DA LITERATURA

A oportunidade de identificação dos receptores de patógenos relacionados ao sistema imune inato surgiu de uma mutação espontânea em camundongos que aboliu a resposta a endotoxinas. Heppner e cols. (1965), observaram que camundongos C3H/HeJ eram incapazes de responder à endotoxina por uma deficiência atribuída ao locus *lps* [28]. Experimentos foram realizados para identificar a proteína afetada pela mutação visando esclarecer a via de sinalização ativada pelos lipopolissacarídeos (LPS). O conhecimento dos mediadores da resposta ao LPS, em especial o TNF α , caracterizou a via de transdução e também as prováveis características do receptor que iniciaria sua produção. A descoberta da proteína LBP (LPS binding protein) e do CD14 permitiu avanço considerável na caracterização da via de resposta inata ao LPS. Entretanto, pela ausência de um domínio citoplasmático, o CD14 não conseguiria realizar a transdução de sinais, a expressão gênica e a produção de citocinas mediadoras, como o TNF α , sugerindo que o receptor deveria ser uma proteína produzida pelo locus *lps* [29-30]. Estudos genéticos em *Drosophila melanogaster* levaram a descoberta do gene que codifica um receptor transmembrana, designado como "Toll receptor", vital na polarização dorso-ventral embrionária e responsável pela resposta à infecção fúngica nesta espécie (Christiane Nüsslein-Volhard's, 1985). O receptor Toll similar em mamíferos leva a ativação de fatores de transcrição NF-kappaBeta (NF- κ B) responsáveis pela produção de citocinas pró-inflamatórias [36, 37, 38]. Trabalho publicado em 1998 identificou o TLR4 como receptor de LPS envolvido na resposta imune à bactérias Gram negativas em camundongos [39]. Além de ser o receptor responsável pela sinalização inflamatória, existem observações atuais que relacionam o TLR4 à imunomodulação, sobrevivência e a proliferação celular [40]. Os mecanismos de sinalização via TLR4 são progressivamente identificados, com descrição dos papéis desempenhados pela LBP, CD14 e pela glicoproteína MD-2 na resposta imune. A glicoproteína MD-2 age como um adaptador extracelular essencial na sinalização e ativação do TLR4 pela LPS [41]. Estudos posteriores demonstram que a LPS se liga a MD-2 e se acopla ao TLR4 via domínio extracelular, induzindo a agregação e transdução de sinais [42]. Nishitani e colaboradores demonstraram que a região

Glu24Lys47 é o sítio de ligação da MD-2 e que Cys29 e Cys40 são resíduos críticos para a ligação da MD-2 e sinalização induzida por LPS [43].

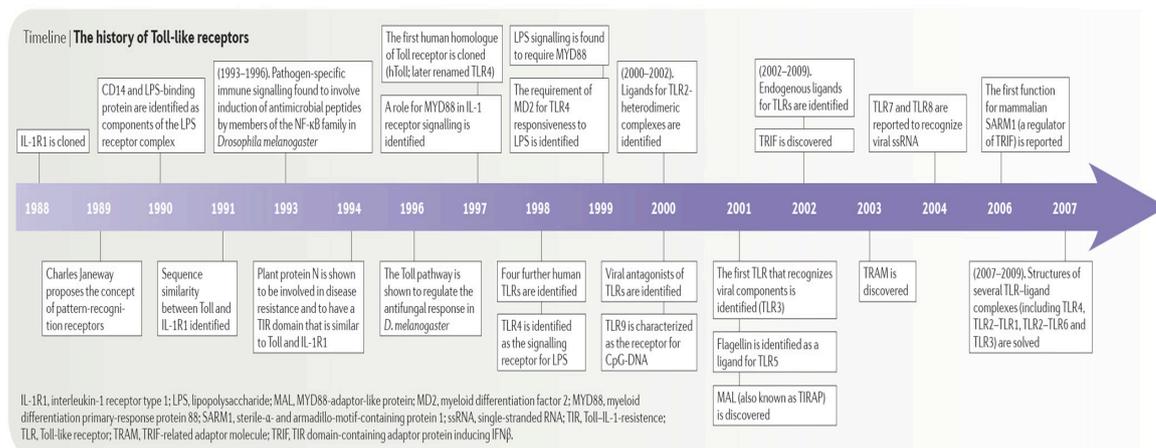


Figura 6: Visão esquemática do histórico das descobertas relacionadas aos receptores Toll-símiles até os dias atuais. (Reproduzido de Nature Reviews Immunology 13, 453–460 (2013) doi:10.1038/nri3446)

Dez subtipos de TLRs foram identificados até o momento [Fig.6]. Estudos recentes tem sugerido que cada tipo de TLR detecta um grupo específico de ligantes. Deste modo, coletivamente, seriam capazes de reconhecer a maioria dos patógenos [44]. Os componentes do grupo TLR são proteínas transmembrana que contém um domínio extracelular composto por 550-950 aminoácidos portadores de 18-31 repetições de leucina e um domínio citoplasmático responsável por iniciar a resposta imune assim que o domínio extracelular reconhece seu ligante, com aproximadamente 200 aminoácidos [45]. O receptor IL-1 foi a primeira molécula descrita em mamíferos com semelhança estrutural com a proteína Toll da mosca doméstica [46]. Em função desta homologia dos genes que codificam o receptor Toll/IL-1 (TIR) a designação de receptor Toll símile (Toll Like Receptor) foi utilizada [40-43]. São membros da superfamília do receptor interleucina 1 que demonstram grande semelhança em seu domínio citoplasmático denominado domínio Toll/IL-1 (TIR). Sinalizam através de vias compartilhadas que inclui uma proteína adaptadora designada proteína de diferenciação mielóide 88 (MyD88), proteínocinases associadas ao receptor de IL-1 (IRAKs) e o fator 6 associado ao receptor TNF (TRAF-6). Essa associação MyD88-IRAK-TRAF6 ativa o fator

transformador de crescimento (TGF) β -ativado proteinocinase 1 (TAK1) levando a ativação de I κ Baquinase (IKK), seguindo-se da degradação de I κ Ba e liberação de NF κ Ba. Também foi descrito que a ativação de TAK-1 resultaria em ativação de proteinoquinas ativadas por mitógenos (MAPKs) [44].

O TLR4 foi o primeiro receptor a ser identificado como reconhecedor de LPS e serviu de base no estudo das interações entre sistema imune e componentes bacterianos [32, 41]. A incapacidade de um animal em reconhecer a LPS aumenta a possibilidade de invasão por bactérias Gram-negativas, e de morte. Entretanto, uma resposta excessiva ao LPS resulta em liberação crítica de mediadores inflamatórios conforme observado em modelos de sepse [44]. Deste modo, cada subtipo de TLR exerce um papel fundamental no reconhecimento de variados patógenos.

Takeda e Akira (2003) descreveram as vias de sinalização pelos TLR. Sumariamente, o reconhecimento de padrões moleculares patogênicos pelo domínio extracelular leva a sua dimerização, com ativação do domínio citoplasmático. Uma molécula adaptadora denominada MYD88 foi descrita inicialmente como essencial para a indução de citocinas como TNF α e IL-12 [50-53]. Entretanto, ativação de TLR específicos levou a pequenas diferenças no perfil expressão gênica [49-51]. Posteriormente outras moléculas adaptadoras foram descritas: proteína adaptadora associada a TIR/adaptador semelhante a MyD88 (Mal), proteína adaptadora contida em domínio TIR indutora de IFN β (TIRF) / molécula 1 contida no domínio TIR (TICAM1) e molécula adaptadora relacionada ao TRIF (TRAM). Cada ligante específico de TLR induz respostas diferenciadas mediadas seletivamente por estas moléculas adaptadoras.

Na via que utiliza MyD88, existe associação entre esta e o domínio TIR do TLR, que quando estimulado, recruta IRAK4 e facilita a fosforilação de IRAK1. a molécula ativada de IRAK1 se associa a TRAF6, resultando em duas rotas específicas de sinalização. A primeira leva a ativação de fatores de transcrição AP1 através de ativação MAPK, e outra ativa o complexo TAK1/TAB que potencializa o complexo IKK, induzindo a degradação de IKK que resulta em translocação nuclear de NF- κ B [52]. Estudos posteriores levaram a identificação de um segundo adaptador

TIRAP/Mal, essencial à sinalização dependente de MyD88 via TLR2 e TLR4, mas não via TLR3, TLR5, TLR7 e TLR9 [53-56].

Em macrófagos deficientes em MyD88 a produção de citocinas inflamatórias não é observada após estimulação do TLR4, apesar de uma ativação retardada de NFkappaB [57], indicando uma via independente na sinalização do TLR4, independente de MyD88.

Kawai e colaboradores, em 2001, demonstraram a ativação do fator de transcrição IRF3 e a fase tardia de ativação do NF- κ B independente de MyD88 após sensibilização do TLR4 [58]. A ativação de IRF3 induzida por TLR4 induz a produção de IFN β que ativa STAT1 e genes induzíveis por interferon [49-51]. Infecções virais ou RNA de dupla hélice ativam IRF3, que induz a produção de IFN β por via não dependente de MyD88, demonstrando que a ativação do TLR3 utiliza uma via independente para a produção de IFN β [59].

Um outro adaptador foi subsequenteiramente identificado, denominado TRIF/TICAM1, essencial nas respostas dos TLR3 e TLR4 independentes da via MyD88 [58-62]. Posteriormente um quarto adaptador TRAM/TICAM2 foi descrito como vital para a resposta ao TLR4 na via independente de MyD88, mas sem significado na resposta do TLR3 [60-63].

Após a descrição do LPS como principal agonista TLR4, outros padrões moleculares de patógenos foram descritos como ligantes aos demais TLRs, como por exemplo: ácido lipoteicóico e peptoglicano aos TLR1, TLR2 e TLR6 [64,65], RNA viral de dupla hélice ao TLR3 [66], flagelina ao TLR5 [67], CpG de DNA bacteriano ao TLR9 [68], compostos imidazólicos e RNA de hélice simples com TR7 e TLR8 [69-71].

O mapeamento das vias de transdução induzidas pelos TLRs, assim como a descoberta de novas moléculas envolvidas na regulação da resposta inflamatória tem produzido caminhos promissores para a abordagem terapêutica do choque hemorrágico, queimaduras e sepse. Uma compreensão atualizada das estruturas moleculares envolvidas na ativação e inibição abriram possibilidades terapêuticas e

de modulação das resposta inflamatórias desencadeados pelos TLRs à variados estímulos patogênicos.

HMGB1 (High Mobility Group Box Chromossomal Protein 1)

Conhecida como fator de transcrição nuclear, esta proteína intranuclear foi identificada (2004) como potente mediador pró-inflamatório quando presente no meio extracelular. Representa um sinal endógeno liberado pelas células necróticas que funciona como importante ligante indutor da resposta inflamatória. Secretado por macrófagos e monócitos, HMGB1 age como citocina sinalizadora de várias vias, incluindo TLRs. A administração de antagonistas a HGMB1 demonstrou efeitos benéficos em modelos de sepse em camundongos [72]. HMGB1 não é normalmente detectável no soro de pessoas saudáveis. Seu nível elevado em pacientes sépticos se correlaciona com a mortalidade [73]. Existem evidências de que seus níveis séricos aumentam significativamente em pacientes com choque hemorrágico dentro das 24h que se segue ao insulto traumático, retornando aos níveis basais quando a condição clínica se estabiliza. [74]. Estas evidências sugerem um papel fundamental das HMGB1 em sua interação com TLR, receptores NOD-símiles e outros na resposta à PAMPs além de modular a resposta inflamatória devido a sinais de dano endógenos (DAMPs). A interação entre HMGB1 e o TLR4 tem sido demonstrada e sugere um promissor alvo terapêutico em modelos de sepse/reperfusão [75]. Wang e colaboradores (1999) observaram diminuição significativa na mortalidade após dose letal de LPS advinda da administração de anticorpos anti-HMGB1 que atingia 70% de sobrevivência em camundongos tratados [73].

Anticorpos antagonizadores tem sido utilizados para inibir a expressão de TLRs buscando modular a resposta imunológica. Meng e colaboradores (2004), sugeriram uma função terapêutica quando anticorpos monoclonais foram utilizados em modelos de sepse mediada pelo TLR2, sendo que a reversibilidade do bloqueio foi importante na recuperação da resposta celular dependente de TLR2 [76].

Portanto, os mecanismos envolvidos na sinalização por TLRs, assim como sua retro-alimentação negativa, tem sido progressivamente esclarecidos em modelos animais mutantes e com técnicas silenciadoras de RNA. O papel dos TLRs na sua interação com receptores NOD-símiles reconhecendo sinais endógenos emitidos por células

danificadas, como no trauma e isquemia, aumentaram sua relevância na modulação imune em condições não infecciosas [Fig.7]. A interação com amplificadores, como HMGB1 integrados na sinalização por TLRs, expuseram oportunidades ímpares de intervenção terapêutica, conforme vem sendo demonstrado em modelos experimentais.

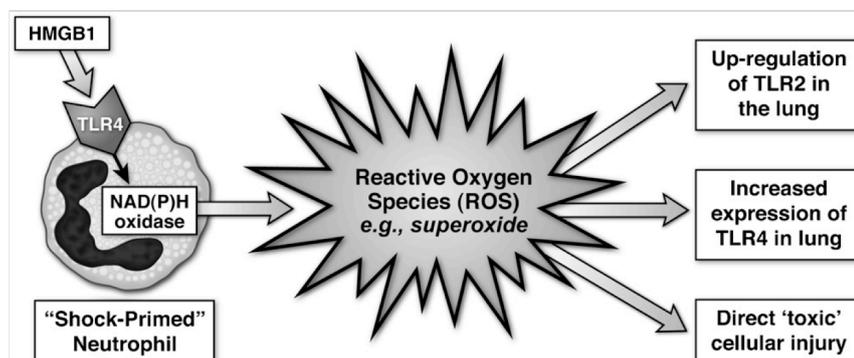


Figura 7: O papel do NAD(P)H-oxidase na inflamação mediada pelo TLR4. (reproduzido de L.J. McGhan, D.E. Jaroszewski / Injury, Int. J. Care Injured 43 (2012) 129–136)

OBJETIVO

Avaliar o papel do TLR4 na mediação da ruptura da barreira intestinal após lesão por trauma/choque hemorrágico experimental (T/HS). A hipótese a ser testada é de que o aumento da permeabilidade do epitélio intestinal é dependente da ativação do receptor TLR4.

MATERIAL E MÉTODO

Trauma/Choque hemorrágico experimental

O presente estudo foi desenvolvido no Laboratório de Cirurgia Experimental da Divisão de Trauma, Queimaduras e Cuidados Intensivos do Departamento de Cirurgia da Universidade da Califórnia em San Diego (UCSD) [Fig.8], de acordo com as normas nacionais (*“Guide for the Care and Use of laboratory Animals of the National Institutes of Health, USA”*) para cuidados aos animais de experimentação, tendo o projeto sido previamente submetido e aprovado pelo Comitê de Cuidados e Utilização de Animais da instituição (*“Institutional Animal Care and Use Committee, IACUC- UCSD; PROTOCOL S09384”*).



Figura 8: Visão externa e interna do Laboratório de Ciências Básicas e Pesquisa Clínica da Divisão de Trauma, Queimados e Cuidados Críticos da UCSD. Com foco em pesquisas sobre resposta fisiopatológica à lesões graves, utiliza modelos celulares, moleculares e técnicas genéticas para o melhor conhecimento sobre as vias de resposta biológica, objetivando melhorar o tratamento de pacientes vítimas de trauma grave e queimaduras.

Foram utilizados no modelo experimental camundongos C57BL/6J (TLR4^{+/+}: *Wild type* [WT]) e C57BL/10ScN (TLR4^{-/-}: *Knockout* [K0]) machos (*Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME, USA*) com 8 a 16 semanas de vida [Fig.9]. Camundongos C57BL/10ScN contém uma deleção espontânea do locus do gene Tlr4(LPS), que codifica a proteína TLR4, resultando em perda de RNA mensageiro (mRNA) e

proteínas, assim como incapacidade de resposta à estimulação aos LPS [77, 78]. Os animais foram alojados no biotério da UCSD com ciclos circadianos de luminosidade a cada 12h e acesso livre à alimento e água. Foram aleatoriamente designados aos grupos por locação casual probabilística. A casualização foi efetivada por sorteio, uma a uma, de fichas semelhantes separadas, identificadas pelas siglas SHAM (grupo controle/operação simulada), ou HS (grupo trauma/choque hemorrágico). Um total de 30 animais foram utilizados e divididos em 2 grupos: 15 animais para o modelo de permeabilidade intestinal e 15 animais para os modelos de coleta de tecidos, com cada grupo subdividido em animais do grupo controle (5 animais) e do grupo estudo (5 animais WT + 5 animais TLR4K0).

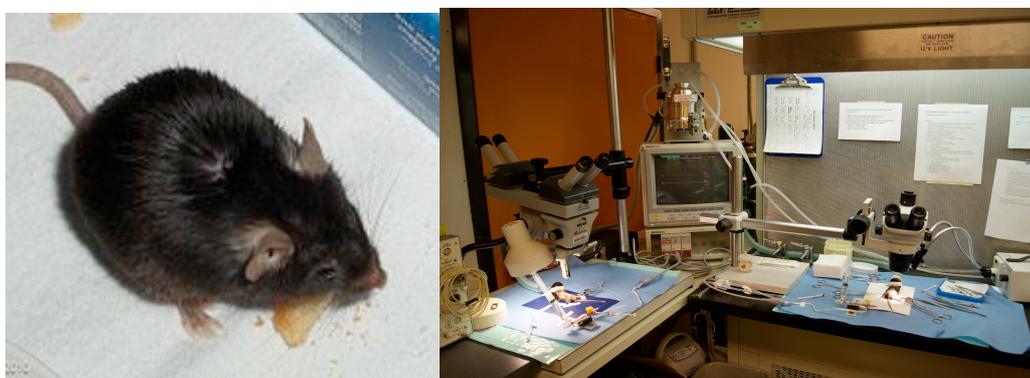


Figura 9: Aspecto morfológico do camundongo C57BL/6 – tipo selvagem ou “*Wild Type*” [WT]; bancada do modelo experimental de trauma/choque hemorrágico com execução simultânea em dois animais. (“*Laboratory of Basic Science & Clinical Research, Trauma Division, UCSD/USA*”).

Os animais foram divididos em três grupos de acordo com o tratamento: 1) WT Sham = grupo controle (submetido apenas à cateterização femoral); 2) grupo WT-T/HS (cateterização femoral + laparotomia mediana 2,5cm + choque hemorrágico experimental + ressuscitação); 3) grupo K0-T/HS (cateterização femoral + laparotomia mediana 2,5cm + choque hemorrágico experimental + ressuscitação).

O peso dos animais variou entre 25-34 gramas. Todos foram submetidos à anestesia geral por isoflurano inalado. Todas as operações foram realizadas por técnica asséptica. Uma incisão na região inguinal esquerda foi realizada e a artéria femoral canulizada com cateter de polietileno com 0,68mm de diâmetro externo (PE10- INTRAMEDIC - Clay Adams™, Becton Dickinson and Company, Sparks, MD, USA). Os grupos de estudo após cateterização da artéria femoral foram submetidos

à laparotomia mediana de 2,5cm com manipulação intestinal por três minutos (trauma) e ao modelo de choque hemorrágico experimental por retirada seqüencial e controlada de sangue arterial na razão de 0,1ml/minuto até atingir a pressão arterial média (PAM) alvo, entre 30-40mmHg. A pressão arterial média (PAM) foi monitorizada por conexão do cateter femoral a transdutor de pressão e fisiógrafo computadorizado (VIRIDIA CMS Model 66/ CPU M1094B, Hewlett-Packard/Phillips, USA) e mantida entre 30-40mmHg por 1 hora [Fig.10]. A temperatura corporal foi mantida em $37\pm 0,2^{\circ}\text{C}$ por meio de sistema de acolchoamento térmico controlado por fluxo de água aquecida (T-PUMP Classic, Model TP650, Gaymar Industries, NY, USA). A ressuscitação hidro-eletrolítica foi realizada nos grupos estudo com solução de Ringer Lactato (RL) em um volume correspondente a três vezes o volume de sangue retirado para a manutenção do choque hemorrágico. Todos os animais receberam analgesia por buprenorfina (0,05mg/kg, subcutânea) imediatamente antes do término da anestesia.



Figura 10: Camundongo sendo submetido a cateterização da artéria femoral no modelo experimental de choque hemorrágico, com PAM alvo entre 30-40mmHg. (*Laboratory of Basic Science & Clinical Research, Trauma Division, UCSD/USA*).

Permeabilidade intestinal

Foi utilizado o ensaio “in vivo” da permeabilidade intestinal com o isotiocianato de fluoresceína (FITC-Dextran) conjugado com Dextran de 4kDa para quantificação dos efeitos da lesão por trauma/choque hemorrágico experimental na função fisiológica de barreira do intestino delgado terminal. Quatro horas após o experimento inicial, período no qual se observa em grau máximo as alterações histopatológicas intestinais [80], os animais foram novamente anestesiados e submetidos a laparotomia mediana. O íleo distal foi identificado e um segmento de 5cm isolado

entre ligaduras de fio de seda. Em seguida foi realizada injeção intraluminal no segmento ileal isolado de 25mg/ml de FITC-Dextran de 4 kDa (Sigma, St. Louis, MO, USA) diluído em 200 μ l de solução salina tamponada por fosfato (PBS), e em seguida a incisão laparotômica fechada. Após 30 minutos, os animais foram novamente anestesiados e coletado sangue por punção cardíaca e subsequentemente submetidos à eutanásia. O soro (plasma) foi separado por centrifugação (10.000RPM/10 minutos) e medido o índice de fluorescência em espectrofotômetro (SpectraMax M5, Molecular Diagnostics, Sunnyvale, CA, USA) calibrado para 520nm de comprimento de onda [Fig.11]. Posteriormente, os resultados foram analisados e ajustados à curva padrão do FITC-Dextran diluído em plasma de camundongo (n=5 animais por grupo).

- Relaparotomia, isolado 5cm íleo distal entre suturas
- Injeção Intraluminal = 25 mg/mL 4kDa FITC-Dextran
- Análise dos níveis séricos FITC-Dextran por Espectrofotometria

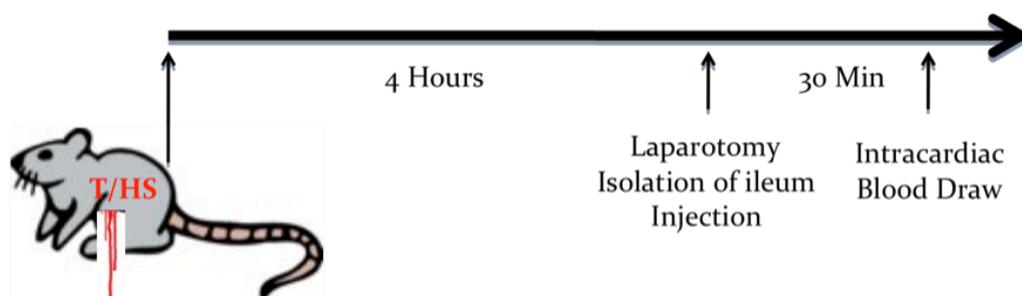


Figura 11: Esquema didático das etapas do modelo de permeabilidade intestinal *"in vivo"*. ("Laboratory of Basic Science & Clinical Research, Trauma Division, UCSD/USA").

Exame histopatológico

Segmentos do íleo terminal (cinco animais por grupo; n=5), após fixação em formol tamponado a 10% e parafina, foram corados pelos métodos de hematoxilina e eosina (Surgipath, Richmond, IL). As lâminas foram examinadas por patologista que desconhecia de que grupo ou subgrupo de animais provinha o material, usando microscópio ótico Olympus FSX100 (Center Valley, PA, USA) para quantificação

histológica dos elementos da reação inflamatória. Imagens das lâminas examinadas foram digitalizadas por meio de software FSX-BSW Ver.02.02 [Fig.12]. Os espécimes foram analisados de acordo com os critérios de Cuzzocrea [79], considerando-se os seguintes indicadores: grau 0, ausência de alterações histológicas; grau 1 (médio), edema focal ou difuso leve; grau 2 (moderado), edema difuso e necrose de vilosidades; grau 3 (intenso), necrose difusa com evidência de infiltrado polimorfonuclear na submucosa; grau 4 (muito intenso), necrose maciça com infiltrado mononuclear disseminado e hemorragia.

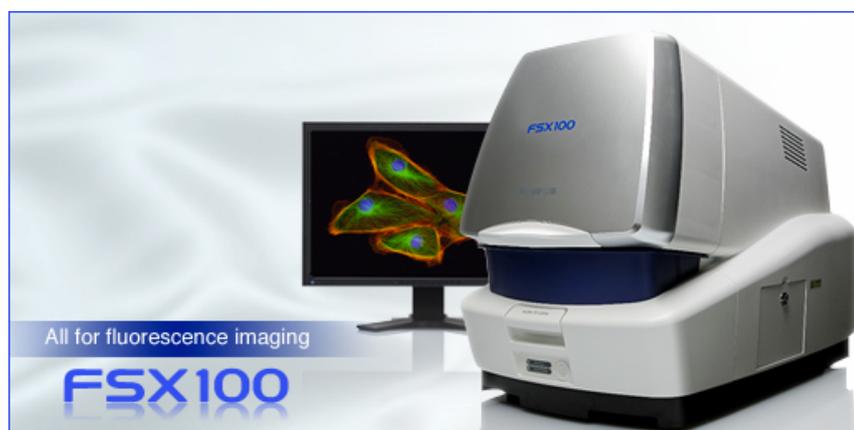


Figura 12: Imagem do microscópio óptico Olympus FSX100 (Center Valley, PA, USA).

Imunohistoquímica

Segmentos do íleo terminal (cinco animais por grupo; n=5) foram preservados em polímero inerte para crio-preservação O.C.T (Tissue-Tek®, Sakura Finetek, USA), resfriados em nitrogênio líquido e estocados a -80°C . Posteriormente, as amostras do tecido intestinal foram submetidas a corte em criostato (Reichert-Jung Cryocut 1800, Reichert Microscopes, Depew, NY) a -20°C , para obtenção de secções finas ($10\mu\text{m}$). As lâminas foram fixadas em 3,7% paraformaldeído (Electron Microscopy Series, Hatfield, PA) por 10 minutos, lavadas em solução de fosfato tamponado PBS a 1%. As lâminas contendo as secções de tecido foram bloqueadas por 1 hora em solução de albumina bovina a 3% (BSA 3%). Após esse processo os tecidos foram incubados por 12 horas com anticorpo para ocludina ou ZO-1 (Invitrogen, Carlsbad, CA) na concentração de 1:100 em solução de BSA a 1% e, posteriormente, incubados com anticorpo secundário Alexa Fluor® 488 (Invitrogen, Carlsbad, CA) na concentração de 1:200 em solução de BSA a 1% por 1 hora. Solução do corante

nuclear azul-fluorescente (D.A.P.I. Invitrogen, Calrsbad, CA) ou 4',6-diamidino-2-fenilindol e do preservativo dos sinais fluorescentes das moléculas alvo (SlowFade®Gold-Invitrogen, Calrsbad, CA) foram adicionadas sequencialmente à preparação. As imagens foram capturadas por microscópio confocal à laser, Olympus FluoView™ [Fig.13], e analisadas em configurações de exposição fixas pelo programa de análise computacional “Advanced Software v6.1, Olympus” em aumento de 60x.



Figura 13: Imagem da bancada do Microscópio Confocal Olympus FluoView™ com varredura à Laser. (“Laboratory of Basic Science & Clinical Research, Trauma Division, UCSD/USA”).

Análise estatística

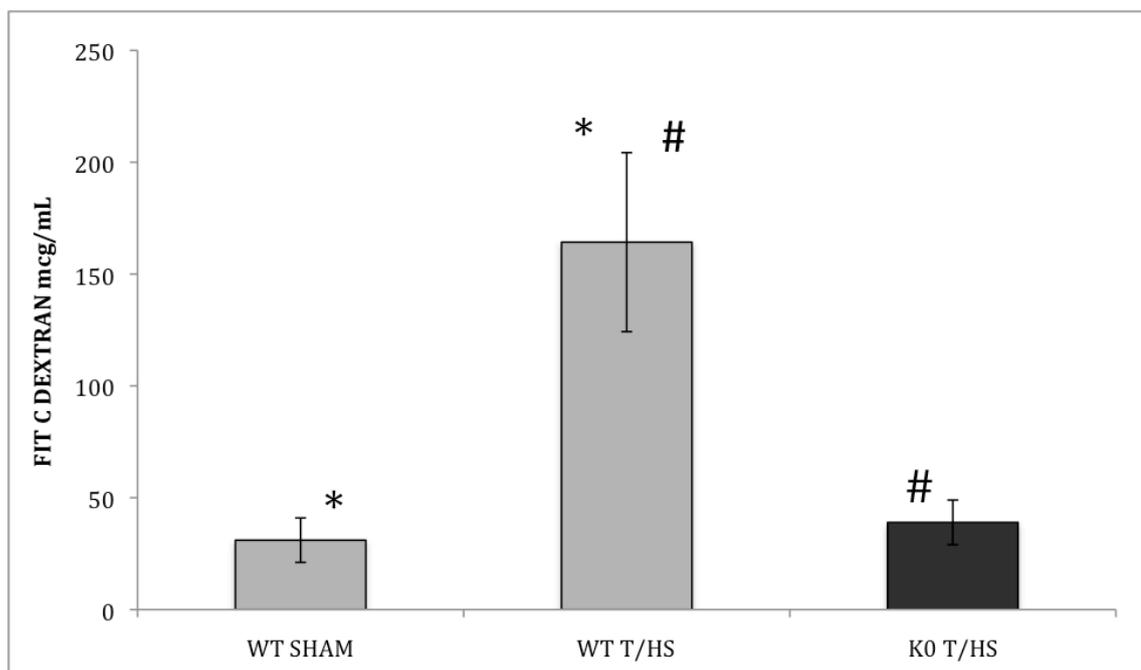
Os dados obtidos foram analisados sob o ponto de vista estatístico em programa computadorizado KaleidaGraphic, versão 4.04, ano 2008. As variáveis paramétricas foram testadas por meio de análise de variância (ANOVA) com correção de Bonferroni. Nos casos de variáveis não paramétricas utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis com “post hoc” teste de Wilcoxon-Mann-Whitney. Os dados foram expressos por sua média \pm erro padrão das médias. Foram considerados significantes os valores de $p < 0,05$.

Todas as etapas do modelo experimental foram realizadas pelo Dr. Luiz Guilherme Cintra Vidal Reys auxiliado pelos técnicos do Laboratório de Ciência Básica e Pesquisa Clínica da UCSD e pelo Dr. Yan Ortiz-Pomales, sob orientação e supervisão do orientador Prof. Dr. Paulo G. de Oliveira e do co-orientador Prof. Dr. Raul Coimbra em todas as fases da pesquisa. A avaliação anatomohistopatológica foi realizada pelo Dr. Paul L. Wolf, Médico Patologista da UCSD, em procedimento blindado quanto a origens dos grupos experimentais dos espécimes analisados. O desenho estatístico do modelo experimental foi delineado pelo Estatístico, Analista de Redes e Programador, Sr. Dale Fortlage da Divisão de Trauma da UCSD. Declaramos não haver conflito de interesses relacionados ao estudo.

RESULTADOS

Permeabilidade Intestinal ao FITC-Dextran após a lesão por trauma seguido de choque hemorrágico

As concentrações séricas do FITC-Dextran encontravam-se elevadas nos animais WT-T/HS em comparação aos animais do grupo controle ($164,26 \pm 40,00 \mu\text{g/mL}$ vs. $31,02 \pm 9,94 \mu\text{g/mL}$; $p < 0,01$; Figura 14). Não foram observadas diferenças significantes entre as concentrações de FITC-Dextran dos animais K0-T/HS e os animais do grupo controle ($38,96 \pm 9,99 \mu\text{g/mL}$ vs. $31,02 \pm 9,94 \mu\text{g/mL}$; $p > 0,05$). As concentrações séricas do FITC-Dextran nos animais K0-T/HS foram significativamente menores do que nos animais WT-T/HS ($38,96 \pm 9,99 \mu\text{g/mL}$ vs. $164,26 \pm 40,00 \mu\text{g/mL}$; $p < 0,05$).



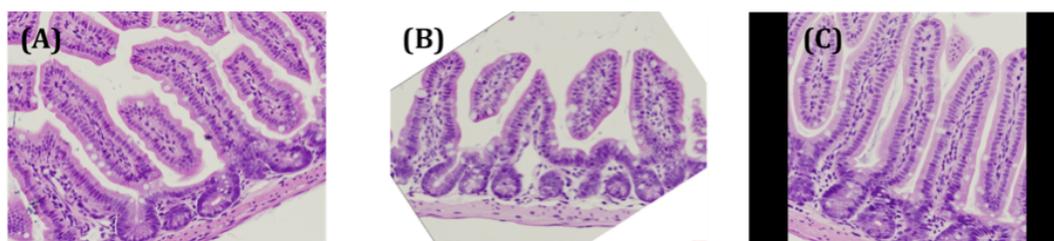
(*) $p=0,003$; (#) $p=0,005$.

WT SHAM (grupo controle de animais $\text{TLR4}^{+/+}$ do tipo selvagem submetidos à operação simulada); WT T/HS (animais $\text{TLR4}^{+/+}$ do tipo selvagem [WT] submetidos a T/HS); K0 T/HS (animais $\text{TLR4}^{-/-}$ knockout [K0] submetidos a T/HS).

Figura 14. Gráfico demonstrativo dos resultados do experimento de permeabilidade intestinal ao FITC-Dextran após T/HS entre os diversos grupos.

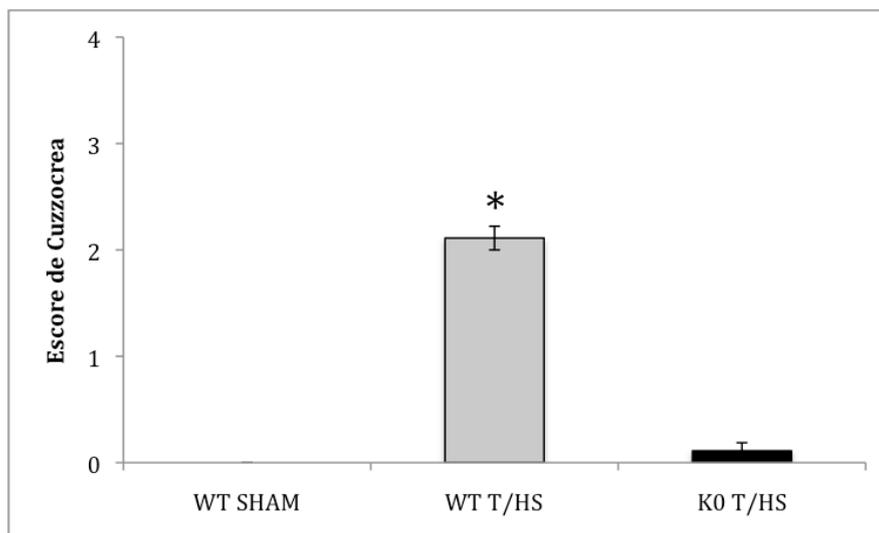
Análise histopatológica após a lesão por trauma e choque hemorrágico experimental

Após 4 horas da lesão experimental, a aparência histológica do íleo terminal dos camundongos WT-T/HS foi marcadamente anormal, com escore médio de lesão intestinal de $2,11 \pm 0,11$ ($p < 0,01$; Fig. 15B e 16) em comparação com os animais controle (escore de lesão intestinal = 0; Fig. 15A e 16). O íleo dos animais WT-T/HS continha número significativo de vilosidades de tamanho reduzido, alterações na polaridade nuclear do epitélio e áreas de necrose focal da mucosa. A aparência histológica do íleo dos animais K0-T/HS foi quase normal (escore de lesão intestinal $0,11 \pm 0,07$; Fig. 15C e 16) e se assemelhava ao padrão encontrado nos animais controle.



(A) Aparência histológica normal do íleo terminal nos animais do grupo controle (WT-Sham) com vilosidades intestinais e da mucosa normais e ausência de células inflamatórias. (B) Íleo terminal de animal do grupo WT-T/HS. As vilosidades estão marcadamente encurtadas e sem uniformidade de tamanho, e áreas focais com perda da polaridade nuclear e necrose. (C) Íleo terminal de animal do grupo K0-T/HS com aspecto histológico semelhante ao grupo controle. Aumento 40x (barra=20 μ m). ("Laboratory of Basic Science & Clinical Research, Trauma Division, UCSD/USA").

Figura 15. Avaliação histopatológica do íleo terminal nos diferentes grupos: (A) WT SHAM, grupo controle de animais TLR4^{+/+} do tipo selvagem submetidos à operação simulada; (B) WT T/HS, animais TLR- 4^{+/+} do tipo selvagem[WT] submetidos a T/HS; (C) K0 T/HS, animais TLR4^{-/-} knockout [K0] submetidos a T/HS.



(*) $p < 0.05$ quando comparado com WT-Sham e K0-T/HS.

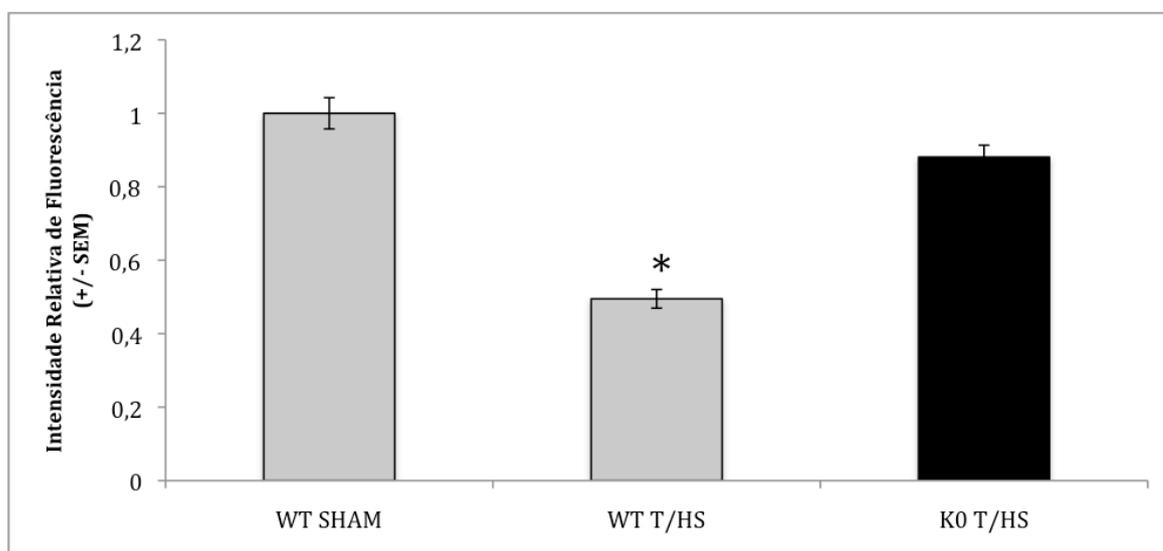
WT SHAM (grupo controle de animais TLR4^{+/+} do tipo selvagem submetidos à operação simulada); WT T/HS (animais TLR4^{+/+} do tipo selvagem [WT] submetidos a T/HS); K0 T/HS (animais TLR4^{-/-} knockout [K0] submetidos a T/HS).

Figura 16. Gráfico com avaliação histopatológica dos segmentos de intestino delgado (íleo terminal) nos diversos grupos, de acordo com o escore de lesão. Escore de Cuzzocrea: grau 0, ausência de alterações histológicas; grau 1 (médio), edema focal ou difuso leve; grau 2 (moderado), edema difuso e necrose de vilosidades; grau 3 (intenso), necrose difusa com evidência de infiltrado polimorfonuclear na submucosa; grau 4 (muito intenso), necrose maciça com infiltrado mononuclear disseminado e hemorragia.

Alterações na expressão intestinal da ocludina analisadas por microscopia confocal

Houve correlação inversa entre os resultados da permeabilidade intestinal com as alterações na expressão da proteína de junção ocludina nos tecidos intestinais coletados 4 horas após o choque hemorrágico experimental [Fig. 17]. Foi observada diminuição significativa na expressão da ocludina intestinal, evidenciada por diminuição no sinal fluorescente nas vilosidades intestinais dos animais WT-HS quando comparados com os animais WT-Sham ($1,00 \pm 0,042$ vs $0,49 \pm 0,03$, respectivamente; $p < 0,0001$) e do grupo K0-HS ($0,49 \pm 0,03$ vs $0,88 \pm 0,03$, respectivamente; $p < 0,0001$). A expressão da proteína ocludina foi analisada e quantificada em unidades fluorescentes relativas baseada na quantificação média dos sinais fluorescentes do grupo controle [Fig. 18]. Não foram observadas

diferenças significantes na expressão da ocludina intestinal entre os grupos WT-Sham e o grupo K0-HS ($1,00 \pm 0,042$ vs $0,88 \pm 0,03$, respectivamente; $p > 0,05$).



(*) $p < 0,0001$ quando comparado com WT-Sham e K0-T/HS.

WT SHAM (grupo controle de animais $TLR4^{+/+}$ do tipo selvagem submetidos à operação simulada); WT T/HS (animais $TLR4^{+/+}$ do tipo selvagem[WT] submetidos a T/HS); K0 T/HS (animais $TLR4^{-/-}$ knockout [K0] submetidos a T/HS).

Figura 17. Gráfico de barras demonstrativo da expressão da ocludina intestinal analisada por microscopia confocal, entre os diversos grupos.

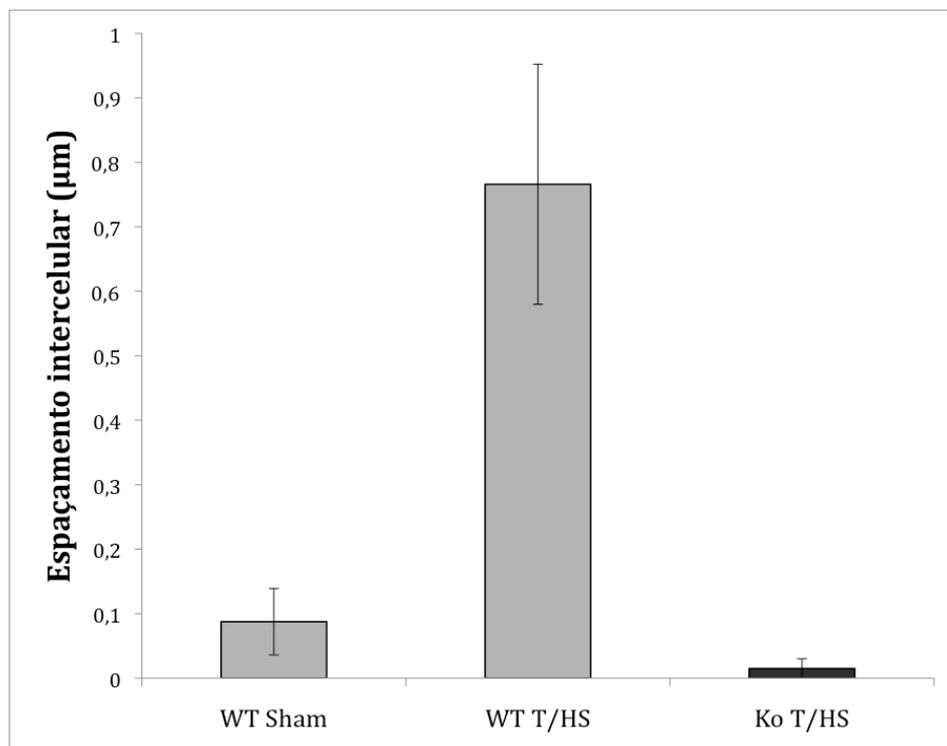


Nota: WT SHAM (grupo controle de animais $TLR4^{+/+}$ do tipo selvagem submetidos à operação simulada); WT T/HS (animais $TLR4^{+/+}$ do tipo selvagem[WT] submetidos a T/HS); K0 T/HS (animais $TLR4^{-/-}$ knockout [K0] submetidos a T/HS). Imagens das vilosidades intestinais em aumento de 60x. Diminuição significativa na expressão da ocludina intestinal, evidenciada por atenuação no sinal fluorescente nas vilosidades intestinais dos animais WT T/HS quando comparados com os animais WT Sham. Não foram observadas diferenças significantes na expressão da ocludina intestinal entre os grupos WT Sham e o grupo K0/HS.

Figura 18. Imagens de microscopia confocal demonstrativas da expressão da ocludina intestinal analisada por microscopia confocal, entre os diversos grupos.

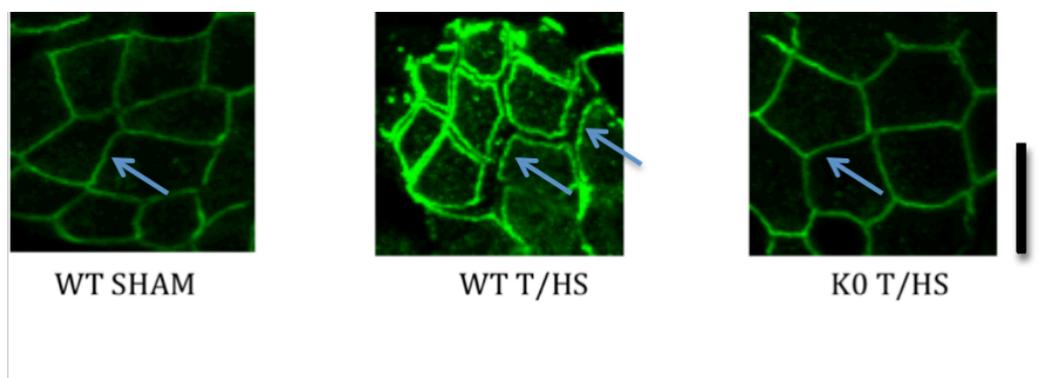
Expressão da proteína ZO-1 e alterações no espaçamento dos complexos juncionais analisadas por microscopia confocal

Alterações nas junções intercelulares do epitélio tem sido associadas com aumento na permeabilidade da barreira intestinal. As células epiteliais do intestino foram coradas por imunohistoquímica visando a análise da proteína ZO-1 e as alterações na morfometria dos espaços intercelulares por microscopia confocal nos diversos grupos. As imagens foram capturadas por microscópio confocal à laser, Olympus FluoView™, e analisadas em configurações de exposição fixas pelo programa de análise computacional “Advanced Software v6.1, Olympus” em aumento de 60x. A proteína ZO-1 encontrava-se normalmente distribuída na periferia das células do epitélio intestinal, nas áreas de junção intercelular, nos animais do grupo controle [Fig. 19]. Este padrão de distribuição normal encontrava-se alterado nos animais WT-HS com aumento do espaçamento intercelular quando comparados ao grupo WT-Sham ($0,77 \pm 0,19 \mu\text{m}$ vs $0,09 \pm 0,05 \mu\text{m}$, respectivamente; $p < 0,01$). O padrão morfométrico dos espaços intercelulares no epitélio intestinal dos animais WT-Sham foi similar aos encontrados nos animais K0-HS, com padrão de ordenamento contínuo e regular nas bordas celulares e no espaçamento intercelular ($0,09 \pm 0,05 \mu\text{m}$ vs $0,02 \pm 0,02 \mu\text{m}$, respectivamente; $p > 0,05$).



(*) $p < 0,005$; (#) $p < 0,001$.

WT SHAM (grupo controle de animais $TLR4^{+/+}$ do tipo selvagem submetidos à operação simulada); WT T/HS (animais $TLR4^{+/+}$ do tipo selvagem [WT] submetidos a T/HS); KO T/HS (animais $TLR4^{-/-}$ knockout [K0] submetidos a T/HS).



Nota: Imagens dos espaços intercelulares das vilosidades intestinais em aumento de 600x (barra 5µm). Setas demonstrando o espaçamento intercelular mais acentuado no grupo WT T/HS do que os grupos WT SHAM e KO T/HS que apresentam espaçamentos normais.

Figura 19. Gráfico e imagens da imunohistoquímica para ZO-1 com análise do espaçamento das junções intercelulares por microscopia confocal, entre os diversos grupos.

DISCUSSÃO

As lesões por trauma representam a principal causa de morte nas primeiras quatro décadas de vida e a terceira causa de morte na população em geral nos EUA [81]. Os indivíduos que sobrevivem à lesão traumática inicial poderão vir a desenvolver complicações, como a SRIS, sepse e SDMO, as principais causas de mortalidade tardia [82]. Estudos experimentais em animais submetidos a lesão por queimadura demonstraram uma estreita relação entre a disfunção da barreira epitelial do trato intestinal e as síndromes inflamatória sistêmica e de disfunção de múltiplos órgãos [83, 84].

Relaciona-se à resposta imune inata, a capacidade de reconhecimento de estruturas moleculares patogênicas, diferenciá-las do “*self*” do hospedeiro, ativação rápida e efetiva de mecanismos da defesa imune natural, além da orientação da resposta imune adaptativa através da ativação e expansão de clones linfocitários antígenos-específicos aos germes. A investigação dos variados processos envolvidos pode conduzir ao desenvolvimento de estratégias terapêuticas eficazes.

Os TLR dos mamíferos são homólogos dos receptores Toll da mosca *Drosophila*. São proteínas transmembrana com domínios extracelulares compostos por regiões predominantes em leucina que interagem com ligantes (PAMPs e DAMPs). Os domínios intracelulares dos TLR, homólogos ao domínio do receptor de interleucina-1 (IL-1R), são denominados receptores de domínio Toll/Interleucina-1 (TIR). A ativação por um padrão molecular específico converge ao nível do domínio TIR sinalizando e induzindo o desacoplamento de seu inibidor (ikB) que se desloca do citoplasma ao núcleo celular em sua forma ativada (NF- κ B) e induz a expressão de genes pró-inflamatórios. São descritas cinco moléculas adaptadoras relacionadas ao domínio TIR: MyD88, MAL (adaptador MyD88-simiar)/TIRAP (proteína adaptadora contendo o domínio TIR), Trif (adaptador contendo o domínio TIR induzindo interferon-beta) e SARM (proteína contendo SAM e ARM).

No presente estudo foi demonstrado que o receptor Toll-símile 4 (TLR4) tem uma função crítica na disfunção da barreira intestinal após a lesão por trauma/choque hemorrágico (T/HS). Os camundongos TLR4 “*knockout*” (K0) mantiveram a morfologia ileal normal após a lesão por T/HS, sem alterações histopatológicas

significativas, assim como no ensaio *"in vivo"* da permeabilidade intestinal ao FITC-Dextran e na expressão das proteínas ocludina e ZO-1 à microscopia confocal.

Esta linhagem de camundongos tem sido estudada e utilizada em uma ampla variedade de pesquisas sobre mecanismos imunológicos e inflamação [85-90].

Para determinar os fundamentos envolvidos na disfunção da barreira intestinal e nas doenças inflamatórias variados modelos animais tem sido utilizados de acordo com sua complexidade e o alvo da pesquisa. Estes sistemas experimentais incluem nematódeos invertebrados (*Caenorhabditis elegans*), organismos invertebrados mais complexos (*Drosophila melanogaster*), e vertebrados (ratos, camundongos e outros mamíferos). Entre os animais vertebrados citados, os roedores são os mais utilizados. Os benefícios de utilização de roedores nos modelos experimentais incluem os fatos de que o epitélio intestinal possui os mesmos tipos celulares que os humanos (células caliciformes, enterócitos, células de Paneth e enteroendócrinas), e reproduz, relativamente, modelos de inflamação intestinal que podem ser induzidas e mimetizam as doenças humanas, especialmente no caso dos camundongos, nos quais linhagens transgênicas podem ser desenvolvidas para examinar estruturas moleculares específicas ou vias que regulam a homeostasia epitelial intestinal [91].

As alterações histológicas intestinais após queimaduras estão bem documentadas em vários estudos, demonstrando perda do padrão estrutural normal das vilosidades intestinais e necrose focal da mucosa [92, 93, 94]. Não foram encontrados porém estudos que demonstrassem o mecanismo de modulação do TLR4 nas proteínas da junção apertada (TJ, *"tight junction"*) e sua correlação com a disfunção da barreira intestinal após lesão por trauma e choque hemorrágico.

As junções apertadas ou *"tight junctions"* (TJ) [Fig. 20] constituem uma complexa barreira à passagem de íons e moléculas através dos espaços intercelulares e ao movimento de lipídeos e proteínas entre os domínios apical e basolateral das células epiteliais [95]. O reconhecimento de que a isquemia intestinal pode contribuir para o desenvolvimento de sepse e falência de órgãos levou a novas hipóteses e experimentos sobre a disfunção intestinal em lesões graves por queimadura e trauma [96]. Dentro deste conceito, estudos experimentais realizados em camundongos demonstraram que a lesão grave por queimadura epidérmica

aumentou a permeabilidade intestinal e estava associada com a diminuição de proteínas das junções intercelulares [97, 98].

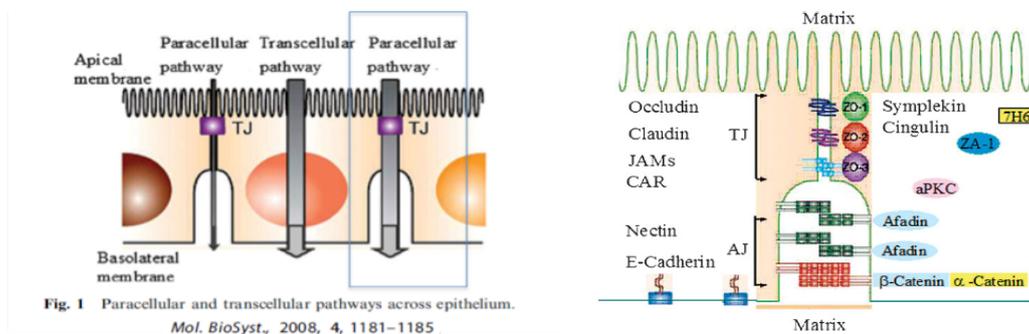


Figura 20: Representação gráfica das estruturas das junções intercelulares intestinais e proteínas do citoesqueleto. (Reproduzido de *Mol. BioSyst.*, 2008; 4: 1181-1185)

Os resultados do presente estudo demonstraram que os camundongos TLR4[KO] foram protegidos das alterações intestinais induzidas pelo experimento, e que a ativação do receptor TLR4 após a lesão por T/HS está associada a diminuição na expressão da ocludina intestinal e aumento no espaçamento paracelular (ZO-1; microscopia confocal), levando a disfunção do epitélio do íleo terminal. Não foram encontrados estudos anteriores que demonstrassem a importância do TLR4 na mediação da ruptura da barreira intestinal após a lesão por trauma seguido de choque hemorrágico. As proteínas da junção intercelular ocludina e ZO-1 foram escolhidas em função da importância e expressão nas junções apertadas do endotélio intestinal observadas em estudos anteriores realizados no laboratório da UCSD e menor custo operacional.

As proteínas das junções intercelulares mantêm a arquitetura tecidual normal e regulam a adesão celular, modulando a permeabilidade paracelular do epitélio intestinal. Ocludina e claudina estão conectadas ao citoesqueleto de actina através de proteínas adaptadoras, tais como a ZO-1 [99, 100]. Estudos anteriores demonstraram que quinase da cadeia leve da miosina (MLCK) altera a localização da F-actina e a estrutura protéica da junção apertada [95]. Outros trabalhos demonstraram que a adição de TNF-alfa (TNF- α) em culturas de células epiteliais aumenta a expressão da MLCK através da ativação do fator nuclear (NF)-kappaBeta (NF- $\kappa\beta$), resultando em aumento da permeabilidade epitelial [101, 102]. Posteriormente, foi observado que a queimadura grave aumenta os níveis de TNF- α ,

com ativação do fator NF- κ B e aumento da expressão da MLCK intestinal, resultando em diminuição e redistribuição das proteínas juncionais [103, 104].

A família de receptores Toll-símile foi descrita inicialmente com a função de reconhecimento de padrões moleculares (DNA bacteriano, lipopolissacarídeos, peptoglicanos, ácido lipoteicóico, flagelina, RNA viral e zimozan fúngico) associados a patógenos exógenos (PAMPs) e relacionados à imunidade inata, sendo que cada classe de receptor possui uma diferente especificidade ligante [7, 9]. Mas, foi observado que a ativação do receptor TLR4 também induz a resposta inflamatória à partir de moléculas e proteínas endógenas (HMGB-1, proteínas “heat shock”, ácido hialurônico, fibrinogênio e conteúdos de células necróticas) demonstrando que o receptor pode estar envolvido na expressão gênica de citocinas e de moléculas co-estimulatórias [8, 22, 105, 106]. Os TLR4 sinalizam por um mecanismo evolucionariamente conservado nos organismos multicelulares, levando a ativação da via NF- κ B, que induz a expressão de quimocinas e citocinas pró-inflamatórias. Os TLR4 também estão envolvidos na produção de B7.1, molécula co-estimulatória, que tem participação na função de apresentação de antígenos aos linfócitos T, promovendo a sua ativação.

Ativação dos TLR induzem a sinalização e secreção de várias citocinas e quimocinas, com desenvolvimento de respostas imunes específicas. Foi descrita uma via comum a todos os TLR, mediada pela proteína adaptadora MyD88, e uma segunda via específica aos TLR2 e TLR4 mediada pela proteína Mal/TIRAP, relacionadas com a sinalização e ativação de citocinas. Contudo, já foram descritas outras vias independentes, como a envolvida na secreção de IFN- β induzida pela ativação de TLR3 e TLR4.

O NF- κ B desempenha um papel importante na modulação das respostas imunes inata e adaptativa por regular a transcrição e expressão genética de mediadores celulares. Em humanos, a família NF- κ B compreende subunidades denominadas: p50, p52, p65(RelA), c-Rel e RelB. No citoplasma das células não-ativadas o NF- κ B apresenta-se em sua forma inativa, associado à proteínas inibitórias denominadas proteínas inibidoras do κ B (I κ B). Após a ativação o NF- κ B, por desacoplamento de seu inibidor, se transloca ao núcleo celular onde passa a regular a expressão de vários genes relacionados à resposta imune (produção de citocinas, moléculas de adesão, quimocinas, proteínas relacionadas com a apresentação de antígenos e a

apoptose, ciclooxigenase-2, sintase do óxido nítrico, além de enzimas relacionadas a manutenção e inibição do processo inflamatório). O desbalanceamento ou descontrole da via do fator nuclear kB pode desencadear uma resposta sistêmica prolongada e inapropriada.

No presente estudo foi demonstrado que a ativação do TLR4 é essencial na mediação da ruptura da barreira intestinal após a lesão por trauma/choque hemorrágico. O receptor pode ser ativado por ligantes liberados após o insulto inicial, levando a indução da resposta inflamatória local e sistêmica e alterações nas proteínas da junção intercelular, com conseqüente disfunção da barreira intestinal. Estes resultados ajudam a elucidar os mecanismos da ruptura da barreira intestinal após a lesão por trauma seguida de choque hemorrágico, demonstrando o papel essencial que os receptores Toll-símile 4 desempenham na modulação da inflamação e na lesão do epitélio intestinal.

Várias hipóteses foram formuladas procurando explicar os mecanismos envolvidos na ativação dos TLR4 e na resposta resultante [107-110]. Estes experimentos indicaram que os TLR4 são necessários para a resposta inflamatória e imune em vários tecidos e órgãos.

O presente estudo procurou avaliar especificamente a disfunção da barreira intestinal, e os resultados encontrados demonstram que o receptor TLR4 funcional é necessário à modulação das alterações intestinais observadas após trauma/choque hemorrágico.

O sistema gastrointestinal é continuamente exposto a potenciais indutores da resposta inflamatória. Estudos publicados demonstraram que as células do epitélio intestinal possuem mecanismos endógenos que modulam a tolerância e a sensibilidade dos receptores TLR4 aos ligantes potenciais do lúmen intestinal [111, 112].

Não foi avaliado qual o ligante específico que ativa o TLR4 na lesão por trauma/choque hemorrágico. Ainda não está claro qual tipo de ligante, ou de célula, seja crucial na sinalização da inflamação por mediação do TLR4. Tem sido muito difícil a demonstração experimental da ligação física direta entre os ligantes e os TLR4 e, em alguns casos, a sinalização requer a presença de moléculas acessórias (CD14 e MD2). A ativação dos receptores TLR é transmitida ao núcleo por meio de

uma cascata de sinalização molecular resultando em uma resposta inflamatória [111, 112].

A identificação dos TLR4 desvendou um importante etapa relacionada à resposta imune. Deste modo, experimentos adicionais serão necessários para delinear o papel do TLR4 em cada linhagem celular (epitelial, macrófagos, dendríticas) assim como quais os ligantes específicos necessários para sua ativação e a resposta inflamatória à lesão.

PERSPECTIVAS

Em virtude de nossos conhecimentos incompletos sobre os mecanismos exatos que levam a disfunção da resposta inflamatória nos traumatismos múltiplos e no choque hemorrágico, as estratégias de tratamento permanecem parcialmente efetivas em muitos pacientes.

Embora existam vários estudos sobre as alterações produzidas pelo TLR4 na modulação da inflamação e na disfunção da barreira intestinal, permanecem muitas questões importantes sem resposta. Qual seria o papel exato do TLR4 nas células do epitélio intestinal durante estados basais de normalidade, e quais são os fatores determinantes de sua transição de aparente repouso para estados claramente deletérios e disfuncionais durante condições de estresse fisiológico? Qual seria a contribuição relativa de cada receptor TLR4 das linhagens enterocitária e leucocitária, e se sua ativação individual ou conjunta resultariam em respostas semelhantes em ambos os tipos de células? Quais seriam os espectros de mutações dos TLRs em seres humanos, e como estas modulariam a inflamação intestinal? Como o genoma do hospedeiro regula a suscetibilidade à doença? Como as interações entre o microbioma intestinal e o sistema imunológico contribuem para a indução da doença? Como os eventos celulares e moleculares da barreira intestinal interagem com o sistema imunitário inato do hospedeiro no epitélio intestinal e nos leucócitos regulando a gravidade da doença e sua progressão? As respostas a estas perguntas podem ser dirimidas pelo menos em parte, através da aplicação cuidadosa de vários modelos experimentais.

Com auxílio dos novos conhecimentos oriundos da biologia molecular, da genética e da epigenética [113], futuras pesquisas deverão focar nestes questionamentos, e das respostas produzidas surgirão modernas abordagens terapêuticas, novos *"insights"* sobre a patogênese de doenças disfuncionais inflamatórias e mais importante, proporcionarão conforto e tratamentos eficazes aos pacientes.

CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo sugerem que o aumento da permeabilidade intestinal e a disfunção da barreira intestinal após o trauma e choque hemorrágico é um processo dependente do receptor TLR4.

REFERÊNCIAS

- ¹ Hassoun HT, Kone BC, Mercer DW, et al: Post-injury multiple organ failure: The role of the gut. *Shock* 2001; 15:1-10.
- ² Keel M, Trentz O: Pathophysiology of polytrauma. *Injury* 2005; 36:691-709.
- ³ Hashimoto C., Hudson KL, Anderson KV. The Toll gene of *Drosophila*, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell* 1988; 52(2): 269-279.
- ⁴ Yongqing Li, Alam HB. Modulation of Acetylation: Creating a Pro-survival and Anti-Inflammatory Phenotype in Lethal Hemorrhagic and Septic Shock. *J Biomed Biotechnol.* 2011; 2011: 1-15.
- ⁵ Gribar SC, Anand RJ, Sodhi CP, Hackam DJ. The role of epithelial Toll-like receptor signaling in the pathogenesis of intestinal inflammation. *J Leukoc Biol* 2008; (83): 493-498
- ⁶ Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 1997; 388(6640): 394-397.
- ⁷ Delves PJ, Roitt IM. The immune system. First of two parts. *N Engl J Med* 2000;343:37- 49.
- ⁸ Medzhitov R, Janeway C.Jr. Innate immunity. *N Engl J Med* 2000;343:338-44.
- ⁹ Lim KH, Staudt LM. Toll-Like Receptor Signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2013;5:1-3.
- ¹⁰ Tada H, Aiba S, Shibata K, Ohteki T, Takada H. Synergistic effect of Nod1 and Nod2 agonists with toll-like receptor agonists on human dendritic cells to generate interleukin-12 and T helper type 1 cells. *Infect Immun* 2005;73:7967-76.
- ¹¹ Zedler S, Faist E. The impact of endogenous triggers on trauma-associated inflammation. *Curr Opin Crit Care* 2006;12:595-601.
- ¹² Lien E, Ingalls RR. Toll-like receptors. *Crit Care Med* 2002, 30(1)Suppl: 1-11.
- ¹³ Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol* 2003; 21: 335-376.

- ¹⁴ Medzhitov R. Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol* 2001; 1:135–145.
- ¹⁵ Beutler B. Central component of the sole mammalian LPS sensor. *Curr Opin Immunol* 2004;12:20–26
- ¹⁶ Atkinson TJ. Toll-like receptors, transduction-effector pathways, and disease diversity: Evidence of an immunobiological paradigm explaining all human illness? *Int Rev Immunol* 2008; 27:255–281
- ¹⁷ Mollen KP, Anand RJ, Tsung A, et al. Emerging paradigm: Toll-like receptor 4-sentinel for the detection of tissue damage. *Shock* 2006; 26:430–437
- ¹⁸ Gribar SC, Richardson WM, Sodhi CP, Hackam DJ. No longer an innocent bystander: Epithelial Toll-like receptor signaling in the development of mucosal inflammation. *Mol Med* 2008; 14:645–659
- ¹⁹ Flohe SB, Flohe S, Schade FU. Invited review: Deterioration of the immune system after trauma: Signals and cellular mechanisms. *Innate Immun* 2008; 14:333–344
- ²⁰ Bruns B, Maass D, Barber R, et al. Alterations in the cardiac inflammatory response to burn trauma in mice lacking a functional Toll-like receptor 4 gene. *Shock* 2008; 30:740–746
- ²¹ Shimamoto A, Chong AJ, Yada M, et al. Inhibition of Toll-like receptor 4 with eritoran attenuates myocardial ischemia–reperfusion injury. *Circulation* 2006; 114:270–274
- ²² Chen C, Wang YL, Wang CY, Zhang ZZ. Effect of TLR4 and HO-1 on acute lung injury induced by hemorrhagic shock in mice. *Chin J Traumatol* 2008; 11:78–83
- ²³ Hoth JJ, Wells JD, Brownlee NA, et al. Toll-like receptor 4 dependent responses to lung injury in a murine model of pulmonary contusion. *Shock* 2009; 31:376–381.
- ²⁴ Prince JM, Levy RM, Yang R, et al. Toll-like receptor-4 signaling mediates hepatic injury and systemic inflammation in hemorrhagic shock. *J Am Coll Surg* 2006; 202:407–417
- ²⁵ Levy RM, Mollen KP, Prince JM, et al. Systemic inflammation and remote organ injury following trauma require HMGB1. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2007; 293: R1538–1544

- ²⁶ Krzyzaniak M, Ortiz-Pomales Y, Lopez N, Reys LG, Cheadle G, Wolf P, Eliceiri B, Bansal V, Baird A, Coimbra R. J Trauma Acute Care Surg. CPSI-121 pharmacologically prevents intestinal barrier dysfunction after cutaneous burn through a vagus nerve-dependent mechanism. 2012 Feb;72(2):355-61
- ²⁷ Reys LG, Ortiz-Pomales YT, Lopez N, Cheadle G, de Oliveira PG, Eliceiri B, Bansal V, Costantini TW, Coimbra R. Uncovering the neuroenteric–pulmonary axis: Vagal nerve stimulation prevents acute lung injury following hemorrhagic shock. Life Sci. 2013 Apr 19;92(13):783-92.
- ²⁸ Reino DC, Palange D, Feketeova E, Bonitz RP, Xu da Z, Lu Q, Sheth SU, Peña G, Ulloa L, De Maio A, Feinman R, Deitch EA. Activation of Toll-like receptor 4 is necessary for trauma hemorrhagic shock-induced gut injury and polymorphonuclear neutrophil priming. Shock. 2012 Jul;38(1):107-14.
- ²⁹ Wright SD, Ramos RA, Tobias PS, Ulevitch RJ, Mathison JC. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. Science 1990;249:1431-3.
- ³⁰ Beutler, B. Toll-like receptors: how they work and what they do. Curr Opin Hematol 2002;9:2-10.
- ³¹ Anderson KV, Bokla L, Nusslein-Volhard C. Establishment of dorsal-ventral polarity in the Drosophila embryo: the induction of polarity by the Toll gene product. Cell 1985;42:791- 8.
- ³² Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffmann JA. The dorsoventral regulatory gene cassette spätzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in Drosophila adults. Cell;1996:86, 973-83.
- ³³ O'Neill LAJ, Golenbock D, Bowie AG. Nature Reviews Immunology; 2013, 453–460.
- ³⁴ Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, Van Huffel C, Du X, Birdwell D, Alejos E, Silva M, Galanos C, Freudenberg M, Ricciardi-Castagnoli P, Layton B, Beutler B. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. Science 1998; 282:2085-8.

- ³⁵ Wells JM, Rossi O, Meijerink M, van Baarlen P. Epithelial crosstalk at the microbiota-mucosal interface. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011; 108 (Suppl 1):4607-14.
- ³⁶ Visintin A, Latz E, Monks BG, Espevik T, Golenbock DT. Lysines 128 and 132 enable lipopolysaccharide binding to MD-2, leading to Toll-like receptor-4 aggregation and signal transduction. *J Biol Chem* 2003;278:48313-20.
- ³⁷ Nishitani C, Mitsuzawa H, Sano H, Shimizu T, Matsushima N, Kuroki Y. Toll-like receptor 4 region Glu24-Lys47 is a site for MD-2 binding: importance of CYS29 and CYS40. *J Biol Chem* 2006;281:38322-9.
- ³⁸ Beutler B. Inferences, questions and possibilities in Toll-like receptor signalling. *Nature* 2004;430:257-63.
- ³⁹ Anderson KV. Toll signaling pathways in the innate immune response. *Curr Opin Immunol* 2000;12:13-9.
- ⁴⁰ Fukata M, Abreu MT. TLR4 signalling in the intestine in health and disease. *Biochem Soc Trans* 2007;35(Pt 6):1473-8. Review.
- ⁴¹ Taguchi T, Mitcham JL, Dower SK, Sims JE, Testa JR. Chromosomal localization of TIL, a gene encoding a protein related to the *Drosophila* transmembrane receptor Toll, to human chromosome 4p14. *Genomics* 1996;32:486-8.
- ⁴² Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA Jr. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 1997;388:394-397.
- ⁴³ Rock FL, Hardiman G, Timans JC, Kastelein RA, Bazan JF. A family of human receptors structurally related to *Drosophila* Toll. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:588-93.
- ⁴⁴ Akira S. Toll-like receptor signaling. *J Biol Chem* 2003;278:38105-8.
- ⁴⁵ Takeuchi O, Takeda, K., Hoshino, K., Adachi, O., Ogawa, T, Akira, S. Cellular responses to bacterial cell wall components are mediated through MyD88-dependent signaling cascades. *Int. Immunol* 2000; 12:113-7.
- ⁴⁶ Kawai, T., Adachi O, Ogawa T, Takeda K, Akira S. Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. *Immunity* 1999;11:115-22.
- ⁴⁷ Schnare M, Holt AC, Takeda K, Akira S, Medzhitov R. Recognition of CpG DNA is

mediated by signaling pathways dependent on the adaptor protein MyD88. *Curr Biol* 2000;10:1139-42.

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

⁴⁹ Toshchakov V, Jones BW, Perera PY, Thomas K, Cody MJ, Zhang S, Williams BR, Major J, Hamilton TA, Fenton MJ, Vogel SN. TLR4, but not TLR2, mediates IFN-beta-induced ST A T1alpha/beta-dependent gene expression in macrophages. *Nat Immunol* 2002;3:392-8.

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

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

⁵² Takeda K, Akira S. Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol* 2005;17:1-14.

⁵³ Horng T, Barton GM, Medzhitov R. TIRAP: an adapter molecule in the Toll signaling pathway. *Nat Immunol* 2001;2:835-41.

⁵⁴ Fitzgerald KA, Palsson-McDermott EM, Bowie AG, Jefferies CA, Mansell AS, Brady G, Brint E, Dunne A, Gray P, Harte MT, McMurray D, Smith DE, Sims JE, Bird TA, and O'Neill, L.A. Mal (MyD88-adaptor-like) is required for Toll-like receptor-4 signal transduction. *Nature* 2001;413:78-83.

⁵⁵ Horng T, Barton GM, Flavell RA, Medzhitov R. The adaptor molecule TIRAP provides signalling specificity for Toll-like receptors. *Nature* 2002;420:329-33.

⁵⁶ Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Sanjo H, Uematsu S, Kaisho T, Hoshino K, Takeuchi O, Kobayashi M, Fujita T, Takeda K, Akira S. Essential role for TIRAP in activation of the signalling cascade shared by TLR2 and TLR4. *Nature* 2002;420:324-9.

- ⁵⁷ Kawai, T., Adachi O, Ogawa T, Takeda K, Akira S. Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. *Immunity* 1999;11:115-22.
- ⁵⁸ Kawai T, Takeuchi O, Fujita T, Inoue J, Muhlradt PF, Sato S, Hoshino K, Akira S. Lipopolysaccharide stimulates the MyD88-independent pathway and results in activation of IFN-regulatory factor 3 and the expression of a subset of lipopolysaccharide-inducible genes. *J Immunol* 2001;167:5887-94.
- ⁵⁹ Yoneyama M, Suhara W, Fukuhara Y, Fukuda M, Nishida E, Fujita T. Direct triggering of the type I interferon system by virus infection: activation of a transcription factor complex containing IRF-3 and CBP/p300. *EMBO J* 1998;17:1087-95.
- ⁶⁰ Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Uematsu S, Hoshino K, Kaisho T, Takeuchi O, Takeda K, Akira S. TRAM is specifically involved in the Toll-like receptor 4-mediated MyD88-independent signaling pathway. *Nat Immunol* 2003;4:1144-50.
- ⁶¹ Oshiumi H, Sasai M, Shida K, Fujita T, Matsumoto M, Seya T. TIR-containing adapter molecule (TICAM)-2, a bridging adapter recruiting to toll-like receptor 4 TICAM-1 that induces interferon-beta. *J Biol Chem* 2003;278:49751-62.
- ⁶² Bin LH, Xu LG, Shu HB. TIRP, a novel Toll/interleukin-1 receptor (TIR) domain-containing adapter protein involved in TIR signaling. *J Biol Chem* 2003;278:24526-32.
- ⁶³ Lien E, Sellati TJ, Yoshimura A, Flo TH, Rawadi G, Finberg RW, Carroll JD, Espevik T, Ingalls RR, Radolf JD, Golenbock DT. Toll-like receptor 2 functions as a pattern recognition receptor for diverse bacterial products. *J Biol Chem* 1999;274:33419-25.
- ⁶⁴ Ozinsky A, Underhill DM, Fontenot JD, Hajjar AM, Smith KD, Wilson CB, Schroeder L, Aderem A. The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:13766-71.
- ⁶⁵ Takeuchi O, Kawai T, Muhlradt PF, Morr M, Radolf JD, Zychlinsky A, Takeda K, Akira S. Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6. *Int Immunol* 2001;13(7):933-40.

- ⁶⁶Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* 2001;413(6857):732-8.
- ⁶⁷ Hayashi F, Smith KD, Ozinsky A, Hawn TR, Yi EC, Goodlett DR, Eng JK, Akira S, Underhill DM, Aderem A. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* 2001;410(6832):1099-103.
- ⁶⁸ Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sato S, Sanjo H, Matsumoto M, Hoshino K, Wagner H, Takeda K, Akira S. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 2000;408(6813):740-5.
- ⁶⁹ Heil F, Hemmi H, Hochrein H, Ampenberger F, Kirschning C, Akira S, Lipford G, Wagner H, Bauer S. Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science* 2004;303:1526-9.
- ⁷⁰ Diebold SS, Kaisho T, Hemmi H, Akira S, Reis e Sousa C. Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science* 2004;303:1529-31.
- ⁷¹ Lund JM, Alexopoulou L, Sato A, Karow M, Adams NC, Gale NW, Iwasaki A, Flavell RA. Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:5598-603.
- ⁷² Erlandsson-Harris H, Andersson U. Mini-review: The nuclear protein HMGB1 as a proinflammatory mediator. *Eur. J Immunol* 2004;34:1503-12.
- ⁷³ Wang H, Bloom O, Zhang M, Vishnubhakat JM, Ombrellino M, Che J, Frazier A, Yang H, Ivanova S, Borovikova L, Manogue KR, Faist E, Abraham E, Andersson J, Andersson U, Molina PE, Abumrad NN, Sama A, Tracey KJ. HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice. *Science* 1999;285:248-51.
- ⁷⁴ Ombrellino M, Wang H, Ajemian MS, Talhouk A, Scher LA, Friedman SG, Tracey KJ. Increased serum concentrations of high-mobility-group protein 1 in haemorrhagic shock. *Lancet* 1999;354:1446-7.
- ⁷⁵ Tsung A, Sahai R, Tanaka H, Nakao A, Fink MP, Lotze MT, Yang H, Li J, Tracey KJ, Geller DA, Billiar T.R. The nuclear factor HMGB1 mediates hepatic injury after murine liver ischemia-reperfusion. *J Exp Med* 2005;201:1135-43.

- ⁷⁶ Meng G, Rutz M, Schiemann M, Metzger J, Grabiec A, Schwandner R, Lippa PB, Ebel F, Busch DH, Bauer S, Wagner H, Kirschning CJ. Antagonistic antibody prevents toll-like receptor 2-driven lethal shock-like syndromes. *J Clin Invest* 2004;113:1473-81.
- ⁷⁷ Poltorak A, He X, Smirnova I, et al. Defective LPS signaling in C3H=HeJ and C57BL=10ScCr mice: Mutations in TLR4 gene. *Science* 1998; 282:2085–2088.
- ⁷⁸ Poltorak A, Smirnova I, Clisch R, Beutler B. Limits of a deletion spanning TLR4 in C57BL=10ScCr mice. *J Endotoxin Res* 2000; 6:51–56
- ⁷⁹ Cuzzocrea, S et al. Role of induced nitric oxid in the initiation of inflammatory response after postischemic injury. *Shock* 2002; 18(2): 169-176.
- ⁸⁰ Costantini TW, Loomis WH, Putnam JG, et al. Pentoxifylline modulates intestinal tight junction signaling after burn injury: Effects on myosin light chain kinase. *J Trauma* 2009; 66:17–24
- ⁸¹ Kung HC, Hoyert DL, Xu J, Murphy SL. Deaths: Final data for 2005. *Natl Vital Stat Rep* 2008; 56:1–120.
- ⁸² Acosta J, Yang J, Winchell X. Lethal injuries and time to death in a Level 1 trauma center. *J Am Coll Surg* 1998; 186: 528–533.
- ⁸³ Yuan ZQ, Peng YZ, Li XL, et al. Induction of heat shock protein 70 by sodium arsenite attenuates burn-induced intestinal injury in severely, burned rats. *Burns* 2008; 34: 247–253.
- ⁸⁴ Peterson CY, Constantini TW, Loomis WL et al. Toll-like receptor-4 mediates intestinal barrier breakdown after thermal injury. *Surg Infect* 2010; 11(2):137-144.
- ⁸⁵ Thomas JA, Tsen MF, White DJ, Horton JW. TLR4 inactivation and rBPI(21) block burn-induced myocardial contractile dysfunction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002; 283:H1645–1655.
- ⁸⁶ Schulthess FT, Paroni F, Sauter NS, et al. CXCL10 impairs beta cell function and viability in diabetes through TLR4 signaling. *Cell Metab* 2009; 9:125–139
- ⁸⁷ Lorne E, Zmijewski JW, Zhao X, et al. Role of extracellular superoxide in neutrophil activation: Interactions between xanthine oxidase and TLR4 induce proinflammatory cytokine production. *Am J Physiol Cell Physiol* 2008; 294:C985– 993
- ⁸⁸ Desai MS, Mariscalco MM, Tawil A, et al. Atherogenic diet induced hepatitis is partially dependent on murine TLR4. *J Leukoc Biol* 2008; 83:1336–1344.

- ⁸⁹ Ha T, Li Y, Hua F, et al. Reduced cardiac hypertrophy in Toll-like receptor 4-deficient mice following pressure overload. *Cardiovasc Res*. 2005; 68:224–234.
- ⁹⁰ Caso JR, Pradillo JM, Hurtado O, et al. Toll-like receptor 4 is involved in brain damage and inflammation after experimental stroke. *Circulation* 2007; 115:1599–1608.
- ⁹¹ Lin J, Hackam DJ. Worms, flies and four-legged friends: the applicability of biological models to the understanding of intestinal inflammatory diseases. *Disease Models & Mechanisms* 2011; 4:447-456.
- ⁹² Krzyaniak M, Cheadle G, Peterson C, Loomis W, et al. Vagal nerve stimulation protects against burn-induced intestinal injury through activation of enteric glia cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2010; 27(12): 2255-60.
- ⁹³ Neudeck BL, Foster DR, Li LY, et al. The effects of T/HS injury on transcellular permeability and intestinal P-glycoprotein in rats. *Burns* 2003; 29:803–809.
- ⁹⁴ Yuan ZQ, Peng YZ, Li XL, et al. Induction of heat shock protein 70 by sodium arsenite attenuates burn-induced intestinal injury in severe burned rats. *Burns* 2008; 34(2):247–253.
- ⁹⁵ Gonzalez-Mariscal L, Betanzos A, Nava P, Jaramillo BE. Tight junction proteins. *Prog Biophys Mol Biol* 2003; 81: 1-44
- ⁹⁶ Magnotti LJ, Deitch EA. Burns, bacterial translocation, gut barrier function, and failure. *J Burn Care Rehabil* 2005; 26: 383–391
- ⁹⁷ Costantini TW, Loomis WH, Putnam JG, et al. Burn-induced gut barrier injury is attenuated by phosphodiesterase inhibition: Effects on tight junction structural proteins. *Shock* 2009; 31: 416–422
- ⁹⁸ Costantini TW, Bansal V, Peterson CY, et al. Efferent Vagal Nerve Stimulation Attenuates Gut Barrier Injury After Burn: Modulation of Intestinal Occludin Expression. *J Trauma*. 2010;68: 1349–1356
- ⁹⁹ Niessen CM. Tight junctions/adherens junctions: Basic structure and function. *J Invest Dermatol* 2007; 127:2525–2532.
- ¹⁰⁰ Paris L, Tonutti L, Vannini C, Bazzoni G. Structural organization of the tight junctions. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1778:646–659.
- ¹⁰¹ Shen L, Black ED, Witkowski ED, et al. Myosin light chain phosphorylation regulates barrier function by remodeling tight junction structure. *J Cell Sci* 2006; 119:2095–2106.

- ¹⁰² Ma TY, Boivin MA, Ye D, et al. Mechanism of TNF- α modulation of Caco-2 intestinal epithelial tight junction barrier: Role of myosin light-chain kinase protein expression. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005; 288:G422–430.
- ¹⁰³ Graham WV, Wang F, Clayburgh DR, et al. Tumor necrosis factor-induced long myosin light chain kinase transcription is regulated by differentiation-dependent signaling events: Characterization of the human long myosin light chain kinase promoter. *J Biol Chem* 2006; 281:26205–26215.
- ¹⁰⁴ Costantini TW, Loomis WH, Putnam JG, et al. Burn-induced gut barrier injury is attenuated by phosphodiesterase inhibition: Effects on tight junction structural proteins. *Shock* 2009; 31(4): 416–422
- ¹⁰⁵ Costantini TW, Loomis WH, Putnam JG, et al. Pentoxifylline modulates intestinal tight junction signaling after burn injury: Effects on myosin light chain kinase. *J Trauma* 2009; 66(1):17–24.
- ¹⁰⁶ DeMaria EJ, Pellicane JV, Lee RB. Hemorrhagic shock in endotoxin-resistant mice: Improved survival unrelated to deficient production of tumor necrosis factor. *J Trauma* 1993; 35:720–725.
- ¹⁰⁷ Neher MD, Weckbach S, Flierl MA, Huber-Lang MS, Stahel PF. Molecular mechanisms of inflammation and tissue injury after major trauma – is complement the “bad guy”? *J Biomed Sci* 2011, 18:1-16.
- ¹⁰⁸ Wang H, Liu JS, Peng SH, Deng XY, Zhu DM, Javidiparsijani S, Wang GR, Li DQ, Li LX, Wang YC, Luo JM. Gut-lung crosstalk in pulmonary involvement with inflammatory bowel diseases. *World J Gastroenterol*. 2013 Oct 28;19(40):6794-804.
- ¹⁰⁹ Xiang M, Shi X, Li Y, Xu J, Yin L, Xiao G, Scott MJ, Billiar TR, Wilson MA, Fan J. Hemorrhagic shock activation of NLRP3 inflammasome in lung endothelial cells. *J Immunol*. 2011 Nov 1;187(9):4809-17.
- ¹¹⁰ Anand RJ, Kohler JW, Cavallo JA, Li J, Dubowski T, Hackam DJ. Toll-like receptor 4 plays a role in macrophage phagocytosis during peritoneal sepsis. *J Pediatr Surg*. 2007 Jun;42(6):927-32; discussion 933.
- ¹¹¹ O'Neill LA, Golenbock D, Bowie AG. The history of Toll-like receptors - redefining innate immunity. *Nat Rev Immunol*. 2013 Jun;13(6):453-60. doi: 10.1038/nri3446. Epub 2013 May 17.
- ¹¹² Hagar JA, Powell DA, Aachoui Y, Ernst RK, Miao EA. Cytoplasmic LPS activates caspase-11: implications in TLR4-independent endotoxic shock. *Science*. 2013 Sep 13;341(6151):1250-3.

¹¹³ Peri F, Piazza M. Therapeutic targeting of innate immunity with Toll-like receptor 4 (TLR4) antagonists. *Biotechnol Adv.* 2012 Jan-Feb;30(1):251-60.

ANEXO**• PROTOCOLO APROVADO:**

UNIVERSITY OF CALIFORNIA, SAN DIEGO

BERKELEY • DAVIS • IRVINE • LOS ANGELES • RIVERSIDE • SAN DIEGO • SAN FRANCISCO



SANTA BAR

INSTITUTIONAL ANIMAL CARE AND USE COMMITTEE
9500 GILMAN DRIVE
LA JOLLA, CALIFORNIA 92093-0071
TEL: (858) 534-6069
FAX: (858) 534-3478
EMAIL: IACUC@UCSD.EDU

12/21/2009

APPROVAL LETTER

Principal Investigator: Raul S.M. Coimbra
Protocol Number: S09384
Title: Effects of vagal nerve stimulation and laparotomy on distant organ injury and the inflammatory response following hemorrhagic shock.
Species: Mouse - Laboratory
Date Approved: 12/21/2009
Date Expires: 12/21/2012

The UCSD Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) has approved your Animal Use Protocol.

This is your official approval letter from the IACUC; please print and maintain a copy with your protocol. You may use this approval letter for funding proposal documentation.

It is your responsibility as Principal Investigator to ensure that all members of your laboratory staff have a copy of the protocol and that they understand their individual responsibilities. Your electronic signature on the protocol application indicates that you understand and will comply with all 12 points of the Investigator Assurance below. Please review these assurances now.

Thank you for your cooperation in complying with federal regulations regarding the care and use of laboratory animals: Public Law 99-158, the Health Research Extension Act, and Public Law 99-198, the Animal Welfare Act which is regulated by USDA, APHIS, CFR, Title 9, Parts 1, 2, and 3.