ANDREA BORREGO

ESTUDO DO ENVOLVIMENTO DOS LOCI REGULADORES DA REAÇÃO INFLAMATÓRIA AGUDA NA DETERMINAÇÃO DA SENSIBILIDADE OU RESISTÊNCIA AO CHOQUE ENDOTÓXICO INDUZIDO POR LIPOPOLISSACARÍDEO

Tese apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutor em Ciências (Imunologia).

Área de Concentração: Imunologia

Orientador: Dr. Marcelo De Franco

Co-Orientadora: Dra. Wafa Hanna Koury Cabrera

SÃO PAULO
2009

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Borrego, Andrea.
Estudo do envolvimento dos loci reguladores da reação inflamatória aguda na determinação da sensibilidade ou resistência ao choque endotóxico induzido por lipopolissacarídeo / Andrea Borrego. -- São Paulo, 2009.

Orientador: Marcelo De Franco.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Imunologia. Área de concentração: Imunologia. Linha de pesquisa: Imunogenética.

Versão do título para o inglês: Study of the involvement of acute inflammatory reaction loci in the determination of sensitivity or resistance to endotoxic shock induzed by LPS.

Descritores: 1. Camundongos selecionados geneticamente 2. Gene *Nramp1* 3. Lipopolissacarideo 4. Inflamação 5. Choque endotóxico I. Franco, Marcelo de II. Universidade de São Paulo. Programa de Pós-Graduação em Imunologia III. Título.

ICB/SBIB42/2009

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Andrea Borrego.

Título da Tese: Estudo do envolvimento dos loci reguladores da reação inflamatória aguda na determinação da sensibilidade ou resistência ao choque endotóxico induzido por lipopolissacarídeo .

Orientador(a): Marcelo De Franco.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou

( ) Aprovado(a) **( ) Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Este trabalho foi desenvolvido no

Laboratório de Imunogenética do

Instituto Butantan

com apoio financeiro da FAPESP

Processo nº 03/11773-9

Dedico esta tese aos meus amados pais Dora e Antonio

O muito obrigado seria insuficiente para expressar tudo o que sinto neste momento,

Mais uma vez vocês acreditaram neste meu sonho e possibilitaram a sua realização.

Hoje sou o que sou graças ao que vocês me ensinaram. Aprendi com vocês que mesmo frente aos dolorosos obstáculos enfrentados, nunca devemos desistir e que acima de tudo devemos sempre acreditar no amanhã.

A vocês, a minha eterna gratidão!

AGRADECIMENTOS

- Ao meu querido orientador e amigo Dr. Marcelo De Franco, mais uma vez agradeço a sua imensa paciência ao longo destes 9 anos. Tentando relembrar de tudo (ou quase tudo), vejo o quanto aprendi e o quanto você contribuiu para o meu crescimento profissional, acredito que a conclusão deste trabalho é a maior prova disso. Tenho em você o exemplo de um exímio profissional, competente, dedicado e sempre disposto a ouvir, aconselhar, ensinar...
A você minha eterna admiração.
Boss, Muito Obrigada!

- A minha querida co-orientadora Dra. Wafa Cabrera, a quem eu considero uma grande amiga, por estar sempre presente, disposta a me ajudar, por compartilhar comigo os seus conhecimentos científicos e de vida. Obrigada pela sua amizade e carinho.

- A Dra. Olga Ibañez, que durante todos estes anos de laboratório sempre com muita dedicação e competência atendeu às minhas solicitações, por gentilmente revisar este trabalho e dar valiosas sugestões.

- Aos pesquisadores do Laboratório de Imunogenética, Dr. Orlando Garcia R. Filho, Dra. Milene Tino De Franco, Dra. Nancy Starobinas, Dra. Solange Carbonare, Dra. Solange Massa, por todos estes anos de amizade e convívio que foram fundamentais para a realização deste trabalho.

- Aos amigos pós-graduandos do Laboratório de Imunogenética, companheiros de todas as horas, Francisca, Vinícius, Zé Ricardo (hoje já doutores), Luciana, Patrícia, Tatiane, Ludmila, Layra, Iana, Alessandra, Débora, Cristiano, Andréa Arruda, Simone, Thalita, Amanda, Jussara; sem dúvida vocês foram muito importantes para a realização deste trabalho, agradeço muito pela amizade, ajuda e companheirismo de todos vocês e pelos inúmeros momentos de alegria e descontração que passamos juntos por todo este tempo.

- Aos funcionários do Laboratório de Imunogenética: Sandra Regina Ottoboni pela sua amizade, Marinalva de Jesus Lima, Neusa Maria Coração Miranda, Ronaldo Antonio Mateus, Tânia Maria

Braga Vieira e Rosa Maria da Silva pelo convívio e a grande ajuda na preparação dos materiais utilizados.

- Aos funcionários do Biotério: Marinalva Fagundes, Joel Faustino de Camargo, Celso dos Santos, Luis Carlos Hilário e Sérgio Branco de Miranda, pelo cuidado com os animais sem os quais este trabalho não seria realizado.

- Aos funcionários do departamento de Imunologia do ICB IV: Jotelma Leite Ribeiro, Maria Eni do Sacramento Santos e Amarildo Utiama

- As Sras Maria José Jesus Carvalho e Eva Aparecida de Oliveira, funcionárias da Biblioteca do ICB IV da USP, por gentilmente corrigirem as referências e auxiliarem-me na adequação deste trabalho às normas pertinentes.

- Aos meus pais que não mediram esforços para que eu pudesse realizar mais esta conquista.

- A todas as pessoas que contribuíram de alguma maneira para a realização desta tese.

Sonhe com aquilo que você quiser.
Seja o que você quer ser,
porque você possui apenas uma vida e nela só
se tem uma chance de fazer aquilo que se quer.

Tenha felicidade bastante para fazê-la doce.
Dificuldades para fazê-la forte.
Tristeza para fazê-la humana.
E esperança suficiente para fazê-la feliz.

As pessoas mais felizes não têm as melhores coisas.
Elas sabem fazer o melhor das oportunidades
que aparecem em seus caminhos.

A felicidade aparece para aqueles que choram.
Para aqueles que se machucam.
Para aqueles que buscam e tentam sempre.
E para aqueles que reconhecem a importância
das pessoas que passam por suas vidas.

Clarice Lispector

RESUMO

BORREGO, A. **Estudo do envolvimento dos loci reguladores da reação inflamatória aguda na determinação da sensibilidade ou resistência ao choque endotóxico induzido por lipopolissacarídeo.** 2009. 145f. Tese (Doutorado em Ciências/Imunologia) Instituto de Ciências Biomédicas, Departamento de Imunologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Linhagens de camundongos selecionadas para a máxima (AIRmax) ou mínima (AIRmin) resposta inflamatória aguda diferem tanto na susceptibilidade a infecção por *Salmonella* entérica sorotipo Typhimurium (*S*. Typhimurium) e ao LPS. Diferentes frequências dos alelos do gene *Nramp1,* envolvido na resistência inata a infecção por *S*. Typhimurium, foram encontradas nas linhagens AIRmax e AIRmin. Para o estudo da interação do gene *Nramp1* com os loci da inflamação, sublinhagens homozigotas para os alelos *R* e *S* deste gene foram produzidas, AIRmax^{RR}, AIRmax^{SS}, AIRmin^{RR} e AIRmin^{SS}. Os animais AIRmax^{RR} foram sensíveis ao LPS, enquanto que os AIRmin^{SS} foram os mais resistentes a endotoxina. Quando desafiados com LPS, os animais AIRmax^{RR} apresentaram maior nível sérico de citocinas inflamatórias e maior expressão gênica de *Tnf, Il6 e Il1b* em células de fígado e medula óssea. Os AIRmin^{RR} expressaram e produziram maiores níveis de *Il10*. Através da análise da expressão gênica global em células de medula óssea, os AIRmin^{SS} mostraram um número maior de genes envolvidos na resposta ao LPS.

Palavras-chave: Camundongos selecionados geneticamente, gene *Nramp1*, Lipopolissacarídeo, Inflamação, Choque endotóxico.

ABSTRACT

BORREGO, A. **Study of the involvement of acute inflammatory reaction loci in the determination of sensitivity or resistance to endotoxic shock induced by LPS.** 2009. 145f. PhD Thesis (Immunology) - Instituto de Ciências Biomédicas , Departamento de Imunologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Lines of mice genetically selected for maximal (AIRmax) and minimal (AIRmin) acute inflammatory reaction differ in susceptibility to infection with *Salmonella* enterica serotype Typhimurium (*S*. Typhimurium) and to LPS sensitivity. Different frequencies of *Nramp1* alleles, involved in innate resistance to *S*. Typhimurium infection, were found in AIRmax and AIRmin mouse lines. To study the *Nramp1* gene interaction with acute inflammatory QTL, AIRmax^{RR}, AIRmax^{SS}, AIRmin^{RR} and AIRmin^{SS} sublines were produced. AIRmax^{RR} were found to be extremely sensitive to LPS, while the AIRmin^{SS} were the most resistant line to endotoxin. After LPS challenged, AIRmax^{RR} animals showed higher levels of inflammatory cytokine sera and as well as *Tnf*, *Il6* and *IL1b* gene expression intensities in liver and bone marrow cells. *Il10* expression was higher in AIRmin^{RR} mice. The global gene expression analysis in bone marrow cells after LPS stimulus showed higher number of differently expressed genes in AIRmin^{SS} mice.

Key words: Genetically selected mice, *Nramp1* gene, Lipopolysaccharide , Inflammation, Endotoxic shock

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1: Divergência fenotípica da reação inflamatória aguda medida pela migração celular e extravasamento protéico nas diferentes gerações de acasalamento seletivo bidirecional das linhagens AIRmax e AIRmin.....35

FIGURA 2: Gráficos das curvas padrão e fatores de correlação das citocinas recombinantes utilizadas como controle dos ensaios de ELISA.....51

FIGURA 3: Distribuição esquemática dos marcadores genéticos avaliados no rastreamento do cromossomo 1 das linhagens da Seleção AIR.....59

FIGURA 4: Quantificação da expressão gênica para *Ilb*, *Il6*, *Tnf* e *Il10* em células do fígado de animais AIRmax^{RR}, AIRmax^{SS}, AIRmin^{RR} e AIRmin^{SS} estimulados com 20 e 80 µg de LPS e em seus respectivos controles.....66

FIGURA 5: Quantificação da expressão gênica para *Ifng*, *Il12b*, *Lbp* e *Cd14* em células do fígado de animais AIRmax^{RR}, AIRmax^{SS}, AIRmin^{RR} e AIRmin^{SS} estimulados com 20 e 80 µg de LPS e em seus respectivos controles.....67

FIGURA 6: Quantificação da expressão gênica para *Il1b*, *Il6*, *Tnf* e *Il10* em células de medula óssea de animais AIRmax^{RR}, AIRmax^{SS}, AIRmin^{RR} e AIRmin^{SS} estimulados com 20 e 80 µg de LPS e em seus respectivos controles.....70

FIGURA 7: Quantificação da expressão gênica para **(A)** *Ifng*, **(B)** *Il12b*, **(C)** *Lbp* e **(D)** *Cd14* em células de medula óssea de animais AIRmax^{RR}, AIRmax^{SS}, AIRmin^{RR} e AIRmin^{SS} estimulados com 20 e 80 µg de LPS e em seus respectivos controles.....71

FIGURA 8: Quantificação da expressão gênica para *Casp 8* e *Il8rb* em células de medula óssea de animais AIRmax^{RR}, AIRmax^{SS}, AIRmin^{RR} e AIRmin^{SS} estimulados com 20 e 80 µg de LPS e em seus respectivos controles.....72

FIGURA 9: Quantificação da expressão sérica para IL-6, TNF-α, IL-10, IL-12p40 no soro de animais AIRmax^{RR}, AIRmax^{SS}, AIRmin^{RR} e AIRmin^{SS} estimulados com 20 e 80 µg de LPS e em seus respectivos controles.....74

FIGURA 10: Número de genes ativados e reprimidos em células de medula óssea de animais AIRmax^{RR}, AIRmax^{SS}, AIRmin^{RR} e AIRmin^{SS} estimulados com LPS.....76

FIGURA 11: Análise da expressão gênica global de: *Tnf, Il1b, Il6, Il10, Lbp, Cd14, Ly96* e *Myd88* em células de medula óssea de animais AIRmax^{RR}, AIRmax^{SS}, AIRmin^{RR} e AIRmin^{SS} estimulados com LPS.....77

FIGURA 12: Análise da expressão gênica global de: *Tlr1, Tlr2, Tlr4, Cxcl1, Cxcl2, Cxcl10, Saa3, Traf1, Tnfsf9, Idh1, Ifi205* e *Marco* em células de medula óssea de animais AIRmax^{RR}, AIRmax^{SS}, AIRmin^{RR} e AIRmin^{SS} estimulados com LPS.....79

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIR	Reação inflamatória aguda (*Acute inflammatory reaction*)
AIRmax	Linhagem de camundongos selecionados para a máxima resposta inflamatória aguda
AIRmin	Linhagem de camundongos selecionados para a mínima resposta inflamatória aguda
C1 a C9	Componentes do sistema complemento
C3a, 5a	Fragmentos de ativação do sistema complemento, Anafilotoxinas
CD	Grupos de diferenciação (*Cluster of differentiation*)
CSF	Fator estimulador de colônia
DL_{50}	Dose letal 50%
DNA	Ácido desoxirribonucléico
F1	Híbridos ($AIRmax^{SS}$ x $AIRmin^{SS}$)
Fe^{+2}	Ferro
GM-CSF	Fator estimulador de colônias do tipo granulócito e monócito
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
IFN	Intérferon
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
IL-1R	Receptor de Interleucina 1
IRAKs	Quinase associada ao receptor da IL-1
kDa	quilodálton
LBP	Proteína ligadora de LPS (*LPS binding protein*)
LFA1	*Lymphocite function associated antigen-1*
LPS	Lipopolissacarídeo
LRR	Repetições ricas em leucina
LTA	Ácido lipoteicóico
LTB4	Leucotrieno B4
MAC	Complexo de ataque à membrana
mCD-14	CD14 fixado à membrana plasmática
MD-2	Proteína de diferenciação mielóide 2
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade (major histocompatibily complex)
Mn^{2+}	Manganês
MyD88	Gene de resposta primária de diferenciação mielóide 88 (*Myeloid differentiation primary response gene 88*)
NF-κB	Fator de transcrição nuclear κ B (*Nuclear factor κ B*)
NO	Óxido nítrico
Nos2	Oxido nítrico sintase
Nramp1	*Natural resistance-associated macrophage protein-1*
PAF	Fator de ativação de plaquetas
PAMPs	Padrão Molecular Associado ao Patógeno - *Pathogen-Associated Molecular Patterns*
pH	Potencial hidrogeniônico

PMN	Células polimorfonucleares
PRRs	Receptores de Reconhecimento de Padrão - *Pattern Recognition Receptors*
QTL	Loci de traço quantitativo (*Quantitative Trait Loci*)
RNA	Ácido ribonucléico
***S.* Typhimurium**	*Salmonella* entérica sorotipo Typhimurium
sCD-14	CD14 solúvel
SIRS	Síndrome da resposta inflamatória sistêmica
Slc11a1	*Solute carrier family 11 (proton-coupled divalent metal ion transporters), member 1*
TIRAP	Proteína adaptadora contendo domínio TIR
TLR	Receptor semelhante ao Toll (*Toll-like receptor*)
TNF	Fator de necrose tumoral
TRIF	Domínio adaptador contendo TIR indutor de IFN-β
Zn^{2+}	Zinco

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....21
1.1 A história da endotoxina.....21
1.2 A estrutura do Lipopolissacarídeo (LPS).....22
1.3 Mecanismo de ação do LPS.....24
1.4 Terminologia.....29
1.5 A resposta do hospedeiro.....30
1.6 Seleção de Genética Bidirecional de linhagens de camundongos produzidas segundo a intensidade da reação inflamatória aguda (AIR).....33
2. OBJETIVOS.....41
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....43
3.1 Animais.....43
3.2 Extração do DNA genômico.....43
3.3 Estudo de polimorfismo de microssatélites no cromossomo 1.....44
3.4 Sensibilização de animais com LPS para a avaliação da expressão de citocinas em células de fígado e de medula óssea.....45
3.5 Extração de RNA total de células de fígado e de medula óssea.....45
3.6 Obtenção de DNA complementar (cDNA).....46
3.7 Seqüências de *primers* utilizados na expressão de proteínas 46
3.8 Quantificação da expressão de citocinas em células do fígado e de medula óssea de camundongos tratados ou não com LPS por PCR em Tempo Real (qPCR).....47
3.9 Avaliação do perfil de citocinas na circulação após tratamento com LPS.....49
3.10 Análise da expressão gênica global por ensaio de *Microarray*.....51
3.10.1 Preparação dos mRNA bacterianos.....52
3.10.2 Síntese do cDNA de fita simples.....52
3.10.3 Síntese do cDNA de fita dupla.....52
3.10.4 Purificação do cDNA de fita dupla.....53
3.10.5 Síntese do cRNA por transcrição in vitro (IVT).....53
3.10.6 Purificação do cRNA.....53
3.10.7 Fragmentação do cRNA.....54

3.10.8 Hibridização.....54
3.10.9 Detecção com Cy5-Streptavidina.....55
3.10.10 Análise dos dados obtidos.....55
3.11 Análise Estatística.....56
4. RESULTADOS.....58
4.1 Estudo de polimorfismo de microssatélites no cromossomo 1 58
4.2 Quantificação da expressão de citocinas em células do fígado de camundongos tratados ou não com LPS por PCR em Tempo-Real (qPCR).....63
4.3 Quantificação da expressão de citocinas em células de medula óssea de camundongos tratados ou não com LPS por PCR em Tempo-Real (qPCR).....68
4.4 Avaliação do perfil de citocinas na circulação após tratamento com LPS.....72
4.5 Análise da expressão gênica global por ensaio de *Microarray*.....75
5. DISCUSSÃO…….....81
6. CONCLUSÕES 102
REFERÊNCIAS ……104
ANEXO A: BORREGO, A.; PETERS, L. C.; JENSEN, J. R.; RIBEIRO, O. G.; CABRERA, W. H. K.; STAROBINAS, N.; SEMAN, M.; IBAÑEZ, O. M.; DE FRANCO, M. Genetic determinants of acute inflammation regulate *Salmonella* infection and modulate *Slc11a1* gene (formerly *Nramp1*) effects in selected mouse lines. **Microbes Infect.,** v.8, p.2766-2771, 2006.

ANEXO B: PETERS, L. C.; JENSEN, J. R.; BORREGO, A.; CABRERA, W. H. K.; BAKER, N.; STAROBINAS, N.; RIBEIRO, O. G.; IBANEZ, O. M.; DE FRANCO, M. *Slc11a1* (formerly *Nramp1*) gene modulates both acute inflammatory reaction and pristane-induced arthritis in mice. **Gennes Immun.,** v. 8, p. 51-6, 2006

ANEXO C: DE FRANCO, M.; CARNEIRO, P. S.; PETERS, L. C.; VORRARO, F.; BORREGO, A.; RIBEIRO, O. G.; STAROBINAS, N.; CABRERA, W. K.; IBAÑEZ, O. M. *Slc11a1* (*Nramp1*) alleles interact with acute inflammation loci to modulate wound-healing traits in mice. **Mamm. Genome,** v. 18, p. 263-9, 2007.

1 INTRODUÇÃO

1.1 A história da endotoxina

Estudos sobre a ocorrência de febre após a administração intravenosa de certas soluções são datados antes do século XIX. Em 1894, Sanarelli e colaboradores mostraram que animais tratados com o sobrenadante da cultura de *Eberth bacillus* livre de microorganismos, apresentavam uma intoxicação acompanhada de febre, tendo algumas vezes efeito letal (PRISTA[1] *et al*., 1996 *apud* MAGALHÃES *et al*., 2007). Richard Pfeiffer, colaborador de Robert Kock no Instituto de Doenças Infecciosas de Berlim (Alemanha) descobriu que lisados de bactérias (mortas por aquecimento) causavam em cobaias reações de choque tóxico. Ele postulou que o princípio ativo tóxico resistente ao calor estava localizado dentro da parede celular bacteriana e deste modo, denominou-o de endotoxina (do Grego *endo* = dentro), para distinguí-lo das já conhecidas exotoxinas identificadas no *Vibrio cholerae* (ALEXANDER e RIETSCHEL, 2001; BEUTLER e RIETSCHEL, 2003; RIETSCHEL e CAVAILLON, 2003).

Em 1912, Hort e Penfold criaram a expressão "pirogênico", (do Grego *pyros* = fogo) para designar as "águas" que quando injetadas causavam hipertermia. A febre já conhecida há décadas como sintoma de doença, ou mesmo como uma doença, começou a ser reconhecida como uma reação benéfica para o hospedeiro (PROBEY[2] *et al*., 1945 *apud* MAGALHÃES *et al*., 2007). Nesta mesma época o físico americano William B. Coley, mostrou que a inoculação da mistura de bactérias mortas (*Serratia marcescens* e *Streptococcus pyogenes*) em humanos, não somente causava febre, mas também induzia a remissão de certos tumores malignos. Esta metodologia tornou-se conhecida como “As toxinas de Coley” (COLEY[3] *et al*., 1894 *apud* BEUTLER e RIETSCHEL, 2001).

[1] PRISTA, L. N. Preparação de medicamentos injectáveis. In: PRISTA, L. N.; ALVES, A. C.; MORGADO R. M. Ed. Fundação Calouste Gulbenkian. **Tecnologia Farmacêutica**. Lisboa: 1996. v.3, p.1807-1840.

[2] PROBEY, T. F.; PITTMAN, M. The pyrogenicity of bacterial contaminants found in biologic products. **J. Bacteriol.,** v. 50, p. 397-411, 1945.

[3] COLEY, W. B. Treatment of malignant tumors with the toxins of Erysipelas and the *Bacillus prodigiosus*. **Am. J. Méd Sci.**, 108, p.183-212, 1894.

Uma combinação similar dos efeitos tóxicos e pirogênicos, porém acompanhados de uma estimulação da resposta imune, foi observado por Hans Buchner, em suas pesquisas. Os animais experimentais que eram inoculados com extratos bacterianos reagiam com febre, alterações nas células do sistema sanguíneo (leucocitose, bem como leucopenia) e uma elevada resistência (inespecífica) a infecções bacterianas (RIETSCHEL *et al*., 1996; ALEXANDER e RIETSCHEL, 2001).

O desenvolvimento de procedimentos de extração adequados foi um grande progresso na caracterização química da endotoxina. Por volta de 1932, André Boivin e Lydia Mesrobeanu utilizaram o método baseado no ácido tricloroacético. Pouco tempo depois, Walter T. J. Morgan e Walther F. Goebel utilizaram solventes orgânicos e água para purificar as endotoxinas. Ambos os grupos descobriram que a sua composição era formada por lipídeos (complexos contendo ácidos graxos) e polissacarídeos (açúcares polimerizados) com pouca ou quase nenhuma proteína associada (HITCHCOCK *et al*., 1986; BEUTLER e RIETSCHEL, 2003). O grande êxito na purificação da endotoxina foi conquistado na década de 1950, com Otto Westphal e Otto Luderitz que através da aplicação do método aquecido fenol-água, obtiveram de algumas espécies de bactérias gram-negativas da família *Enterobacteriaceae* uma endotoxina altamente purificada e biologicamente ativa. Devido à presença de componentes lipídicos e polissacarídicos, (juntamente com o fósforo, que influenciava o comportamento dos outros dois componentes), eles denominaram a molécula de lipopolissacarídeo, termo que já havia sido adotado anteriormente. Outros estudos feitos por Westphal e Luderitz revelaram que o LPS estava presente em todas as bactérias gram-negativas patogênicas e não patogênicas (RISTSCHEL e BRADE, 1992; HITCHCOCK *et al*., 1986; BEUTLER e RIETSCHEL, 2003; BRUNN e PLATT, 2006). Com base nestes conhecimentos, a caracterização química da endotoxina obteve um rápido progresso que foi determinante para a sua completa identificação, assim como sua caracterização genética e ação biológica (BEUTLER e RIETSCHEL, 2003).

1.2 A estrutura do Lipopolissacarídeo (LPS)

A endotoxina ou lipopolissacarídeo (LPS) é uma molécula integrante da membrana celular de bactérias Gram-negativas e é responsável por sua organização e estabilidade. Embora o LPS esteja firmemente ligado na parede celular bacteriana ele é continuamente liberado ao meio

ambiente, esta liberação não ocorre somente quando a bactéria morre, mas também durante o seu crescimento e divisão (PETSCH e ANSPACH, 2000). Aproximadamente três quartos da superfície bacteriana consiste destas moléculas, uma única bactéria *Escherichia coli* contém cerca de 2 milhões de moléculas de LPS (GORBETA e SEFTON, 2005; MAGALHÃES *et al*., 2007). As únicas bactérias gram-negativas que não possuem o lipopolissacarídeo são espécies do gênero *Sphingomonas* (KAWAHARA *et al*., 1991).

O LPS é composto de um motivo polissacarídico hidrofílico que é covalentemente ligado a um motivo lipídico hidrofóbico (lipídeo A) e a região do antígeno-O.

O lipídeo A é a parte mais conservada da endotoxina e é responsável por muitas de suas atividades biológicas, como por exemplo, a toxicidade e a estimulação de células do sistema imune (WYCKOFF *et al*., 1998; MAGALHÃES *et al*., 2007). É composto de resíduos de 1,6-β D-Glucosamina. Esta parte hidrofóbica da endotoxina possui uma forma hexagonal resultando em uma estrutura mais rígida, quando comparada com o resto da molécula. Não são conhecidas cepas bacterianas ou endotoxinas que não possuam o lipídeo A (ALEXANDER e RIETSCHEL, 2001; MAGALHÃES *et al*., 2007; RAETZ *et al*., 2007).

O *core* de oligossacarídeo é uma estrutura conservada contendo em seu interior 3-desoxi-D-manose-2-ácido octulôsonico (KDO) e monossacarídeos. Nas espécies de *E. coli* são conhecidos 5 tipos diferentes de *core*, enquanto que espécies de *Salmonella* compartilham a mesma estrutura (MAGALHÃES *et al*., 2007).

O antígeno-O (também chamado de cadeia O-específica, pois representa o antígeno de superfície) é geralmente composto de uma sequência de oligossacarídeos idênticos (de 3 a 8 monossacarídeos cada), que são específicos de cada cepa bacteriana. Estas sequências são determinantes para a identificação sorológica da respectiva bactéria (PETSCH e ANSPACH, 2000; GORBETA e SEFTON, 2005; MAGALHÃES *et al*., 2007).

A massa molar do monômero da endotoxina pode ser de 10 a 20 kDa devido à variabilidade da cadeia de oligosacarídeos, podendo ser encontrados valores extremos de 2.5 (espécies deficientes de antígeno-O) a 70 kDa (espécies com cadeia longa de antígeno-O). Devido à sua estrutura anfifílica, as moléculas de endotoxina apresentam-se sob forma de agregados. Estes agregados são o resultado de interações não polares entre as cadeias lipídicas, assim como pontes geradas entre grupos fosfato de cátions divalentes. Através de vários estudos utilizando diferentes técnicas, tais como microscopia eletrônica e difração de raio-X, pode-se

caracterizar a estrutura destas moléculas. Os resultados demonstram que em solução aquosa os agregados da endotoxina podem assumir várias formas, a saber: vesicular, lamelar, cúbica, micélios e arranjos hexagonais invertidos. Como exemplo, as estruturas vesiculares apresentam diâmetro de 0,1 µm e massa de até 1000 kDa e, dependendo da característica da solução (pH, íons, surfactante) apresentam alta estabilidade (PETSCH e ANSPACH, 2000; GORBETA e SEFTON, 2005; MAGALHÃES *et al*., 2007) . De acordo com a dinâmica molecular, a estrutura tridimensional da endotoxina, especialmente a região do antígeno-O, é muito mais flexível do que a estrutura globular das proteínas (PETSCH e ANSPACH, 2000).

1.3 Mecanismo de ação do LPS

O reconhecimento de patógenos é uma das mais básicas e importantes propriedades do sistema imune. Assume-se que a capacidade dos indivíduos em reconhecer os patógenos, e distinguí-los entre o próprio e o não próprio é uma característica já observada desde o aparecimento dos primeiros metazoários (BEUTLER, 2004). Este processo requer a existência de componentes específicos, estruturalmente conservados, produzidos por um amplo grupo de microorganismos potencialmente patogênicos. Estes componentes que estão ausentes em organismos multicelulares são popularmente referidos como PAMPs (Padrão Molecular Associado ao Patógeno, do inglês: *Pathogen-Associated Molecular Patterns*) e são reconhecidos pelo hospedeiro, através de um grupo limitado de PRRs (Receptores de Reconhecimento de Padrão, do inglês: *Pattern Recognition Receptors*) (PASARE e MEDZHITOV, 2004). As principais células envolvidas neste processo são os macrófagos, neutrófilos e células dendríticas (ADEREM, 2003; KAWAI e AKIRA, 2005).

O sistema imune inato dos mamíferos utiliza vários PRRs que são expressos constitutivamente na superfície celular em compartimentos intracelulares ou secretados na corrente sanguínea e em fluidos teciduais. As principais funções destes receptores incluem a opsonização, a ativação do sistema complemento e da cascata de coagulação, fagocitose, mecanismos microbicidas como a produção de reativos do nitrogênio e oxigênio, e estímulo da produção de citocinas inflamatórias e quimiocinas, que recrutam e ativam outras células que regem o desenvolvimento da imunidade adaptativa (MEDZHITOV, 2001; UNDERHILL e OZINSKI, 2002; UNDERHILL, 2003).

Os receptores *toll-like* (TLRs) são estruturas conservadas ao longo do processo evolutivo, presentes desde no verme *Caenorhabditis elegans* até nos mamíferos (JANEWAY e MEDZHITOV, 2002; HOFFMANN, 2003; AKIRA e TAKEDA, 2004; BEUTLER, 2004) Eles foram inicialmente identificados na *Drosophila melanogaster* atuando na polaridade dorso-ventral das asas durante a embriogênese. Estudos subsequentes revelaram que estes receptores também apresentam uma importante função na resposta imune inata de insetos contra infecções causadas por fungos (LEMAITRE *et al.*, 1996; DOBROVOLSKAIA e VOGEL, 2004; BRENNAN e ANDERSON, 2004). Os TLRs são receptores transmembrânicos tipo 1, que apresentam motivos extracelulares com repetições ricas em leucina (LRR) e são altamente homólogos a membros da família de receptores de Interleucuna 1 (IL-1R), pois possuem uma região de aproximadamente 200 aminoácidos em suas caudas citoplasmáticas, que são conhecidas como domínios TIR (Toll/IL-1R). Dentro deste domínio TIR as regiões de homologia compreendem 3 partes altamente conservadas que são cruciais para a sinalização (AKIRA e TAKEDA, 2004; LEULIER e LEMAITRE, 2008).

Atualmente foram identificados 12 TLRs em mamíferos, sendo 10 em humanos e 12 em camundongos (WATTERS *et al.*, 2007)

Estes receptores Toll reconhecem um amplo espectro de ligantes incluindo lipídeos modificados (LPS e lipoproteínas de bactérias), proteínas (flagelina) e ácidos nucléicos (DNA e RNA dupla fita) (UNDERHILL, 2003; ELSON *et al.*, 2007) e ativam uma via de sinalização comum que culmina na ativação de fatores de transcrição como o fator nuclear-κβ (NF- κβ) (QURESHI e MEDZHITOV, 2003; TRINCHIERI e SHER, 2007).

Através do seu domínio TIR, os TLRs conseguem interagir com proteínas adaptadoras como o MyD88 (gene de resposta primária de diferenciação mielóide 88), TIRAP (proteína adaptadora contendo domínio TIR, também conhecida como Mal, que é semelhante ao MyD88), TRIF (domínio adaptador contendo TIR indutor de INF-β), TRAM (molécula adaptadora relacionada ao TRIF) e algumas serina/treonina quinases, as IRAKs (quinase associada ao receptor da IL-1). Estas moléculas adaptadoras são capazes de recrutar quinases e substratos para os complexos receptores induzindo a sinalização intracelular causando a ativação do fator de transcrição nuclear NF- κβ, levando a alterações na expressão gênica, tais como a regulação positiva da expressão de moléculas co-estimulatórias de superfície, e a secreção de citocinas,

como a IL-1β, IL-6, IL-8, IL-12 e TNF-α (MEDZHITOV *et al*., 1996; THOMAZ *et al*., 2006; GEROLD *et al*., 2007).

O *Tlr4*, primeiramente descrito como locus *Lps* (que apresenta duas formas alélicas: Lps^n, normal; e Lps^d, defeituoso, para a resposta ao LPS) é um importante gene que regula a resistência inata à infecção com *S*. Typhimurium e a resposta do hospedeiro ao lipopolissacarídeo. O LPS é o maior constituinte da membrana externa de bactérias Gram-negativas e é essencial para a sua estrutura e sobrevivência (RIETSCHEL *et al.,* 1994). Através da evolução, o sistema imune de eucariotos tem reconhecido o LPS como um Padrão de Moléculas de Reconhecimento Associadas ao Patógeno (PAMPs), ou seja, uma estrutura constitutiva e conservada da bactéria (MEDZHITOV, 2001). De fato, pequenas quantidades de LPS, ou mais propriamente do lipídio A (estrutura presente na endotoxina) são detectadas pelo *Tlr4* e são capazes de induzir os macrófagos a sintetizarem potentes mediadores inflamatórios como o TNF-α e a IL-1β (RAETZ *et al*., 2007). A família de receptores Toll-like é um bom exemplo de Receptores de Reconhecimento de Padrão (PRRs) e, entre eles, o *Tlr4* foi identificado como um importante componente do sinal de transdução iniciado pelo LPS.

A descoberta do *Tlr4* foi possível devido a identificação de linhagens de camundongos, como o C3H/HeJ, que são pouco responsivos aos efeitos do LPS. Estes animais quando tratados intravenosamente com o lipopolissacarídeo podem resistir a doses 20 a 38 vezes maiores do que aquelas que normalmente induziriam a morte de 50% (DL_{50}) dos animais de outras linhagens de camundongos (SULTZER, 1968). Entretanto, mesmo portadores do alelo de resistência do gene *Nramp1*,(que será descrito a seguir) quando desafiados com bactérias gram-negativas, como *Salmonella* entérica sorotipo Typhimurium (*S*. Typhimurium), os camundongos apresentam uma notável susceptibilidade a este patógeno. Estudos extensivos mostraram que os animais C3H/HeJ apresentam uma mutação missense no domínio de sinalização citoplasmático, em que uma substituição do aminoácido prolina por histidina no códon 712, é responsável pela hiporesponsividade ao LPS. Demais experimentos levaram a identificação do *Tlr4* como o gene candidato para o locus *Lps* (POLTORAK *et al.,* 1998; QUERESHI *et al.,* 1999; QUERESHI e MEDZHITOV, 2003).

Outra linhagem de camundongos, a C57BL/10ScN e a sublinhagem C57BL/10ScCr, também resistentes aos efeitos do LPS foram estudadas. Nestas foi observado a deleção do gene

Tlr4 (POLTORAK *et al.*, 1998; BEUTLER e POLTORAK, 2000; QUERESHI e MEDZHITOV, 2003).

Dentre a família de receptores Tlrs, o *Tlr4* é o único que possui uma molécula associada, a MD-2 (proteína de diferenciação mielóide 2) que é uma glicoproteína de 160 aminoácidos com 25-30 kDa, e está fisicamente associada com a região extracelular do *Tlr4* na superfície da célula (MIKAKE, 2003; VISINTIN *et al*., 2006). É estritamente necessária para o reconhecimento do LPS, uma vez que animais nocaute (tanto para o *Tlr4* quanto para o gene *MD-2*) apresentam o mesmo fenótipo de resistência ao LPS (HOSHINO *et al*., 1999; NAGAI *et al*., 2002).

Como já descrito anteriormente, uma vez liberado da bactéria o LPS apresenta-se sob forma de agregados devido à estrutura anfifílica de sua molécula. A difusão espontânea de monômeros de LPS destes agregados para o CD14 (receptor celular de alta afinidade para o LPS) ocorre em uma razão muito baixa (HAILMAN *et al*., 1994). Uma das primeiras proteínas envolvidas no reconhecimento do LPS é a LBP (proteína ligadora de lipopolissacarídeo), que é uma proteína de fase aguda presente no soro com 58 a 60 kDa, e é induzida pela IL-1 e IL-6 (DENTENER *et al*., 2000). Além do fígado, os pulmões, rins e coração estão envolvidos na sua produção. Os níveis constitutívos da proteína no soro são baixos (1 a 15 µg/ml), mas aumentam de 10 a 50 vezes durante a infecção. O mecanismo básico de reconhecimento ocorre quando a LBP liga-se com alta afinidade ao lipídeo A, facilitando o processo de monomerização do LPS e conseqüente apresentação aos receptores celulares. A LBP catalisa a transferência do LPS ao receptor CD14, aumentando assim a ativação de monócitos, macrófagos e leucócitos polimorfonucleares (PMN) (VAN AMERSFOORT *et al*., 2003; ZWEIGNER *et al*., 2006).

O receptor CD14 é uma glicoproteína de aproximadamente 55 kDa, expresso principalmente em monócitos, macrófagos e granulócitos. Encontra-se presente em duas formas: na membrana plasmática (mCD14) via uma âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI), e na forma solúvel (sCD14) no sangue e fluidos (LU *et al*., 2008). O mCD14 não apresenta domínio de sinalização intracelular, necessitando assim de moléculas co-receptoras, como o *Tlr4*, para a ativação celular induzida pelo LPS (VIVES-PI *et al*., 2003; JIANG *et al*., 2005). Duas funções opostas são atribuídas ao sCD14, ele pode reduzir a atividade induzida pela endotoxina através da competição com o LPS pelo mCD14 e também aumentar a resposta ao LPS em células que não apresentam o receptor em sua superfície, como as células endoteliais, epiteliais e da musculatura lisa (BAS *et al*., 2004; DAUPHINEE e KARSAN, 2006).

Embora reconheça o LPS e faça parte do seu complexo receptor (LPS/CD14/Tlr4/MD-2), o CD14 também funciona como receptor para peptidoglicano, o maior constituinte da parede celular de bactérias gram-positivas (PUGIN *et al*., 1994), outros produtos microbianos com características estruturais similares (HEUMANN *et al*., 1998), proteína de choque térmico 60 humana (KOL *et al*., 2000) e outros ligantes como a ceramida, fosfolípides, lipoproteínas modificadas e partículas opsonizadas (SCHMITZ *et al*., 2002). A afinidade do CD14 na ligação com fosfolípedes aniônicos como a fosfatidilserina tem a função de reconhecer e fagocitar células apoptóticas por macrófagos que o expressam em sua superfície (GREGORY *et al*., 1999; MIYAKE, 2003).

Animais deficientes na expressão do gene CD14 são hiporresponsivos ao LPS e sobrevivem aos seus efeitos letais (HAZIOT *et al*., 1996), entretanto, respondem com sinais de endotoxemia quando expostos a altas doses do LPS (HAZIOT *et al*., 1996; MIYAKE, 2004).

Há ainda um outro grupo de proteínas envolvidas no reconhecimento e sinalização intracelular do LPS, são as β2 integrinas ou antígenos CD18, estas compreendem uma família de três glicoproteínas de superfície celular com uma cadeia α CD11 variável e uma cadeia β CD18 idêntica. São elas: $\alpha_1\beta_2$-integrina CD11a/CD18 ou LFA-1, $\alpha_2\beta_2$-integrina CD11b/CD18, (CR3 ou Mac-1) e $\alpha_3\beta_2$-integrina CD11c/CD18, (p150,95 ou CR4). Os linfócitos produzem primariamente a CD11a/CD18 (LFA-1), enquanto que os eosinófilos, neutrófilos e monócitos produzem as demais 2 integrinas. A expressão de uma ou mais integrinas ocorre na superfície de qualquer célula do organismo, exceto em eritrócitos maduros (DIAMOND e SPRINGER, 1994; MEDVEDEV *et al*., 1998; FUJIHARA *et al*., 2003).

Alguns estudos demonstraram que a ativação de células mononucleares por antígenos microbianos, incluindo o LPS, é parcialmente inibida por anticorpos anti-CD18, CD11b ou CD11c, o que indica que as β_2-integrinas podem estar envolvidas na ativação celular (MEDVEDEV *et al*., 1998; CUZZOLA *et al*., 2000). Os receptores CD11/CD18, apresentam a mesma via de sinalização do CD14, ou seja, utilizam o Tlr4 para a ativação celular induzida pelo LPS (INGALLS *et al*., 1998), embora com baixa eficiência (PERERA *et al*., 2001).

1.4 Terminologia

A sepse conota uma síndrome clínica que pode ocorrer em qualquer grupo de idade e em indivíduos de diferentes populações e é dada em resposta a um grande número de patógenos microbianos presentes em múltiplas partes do organismo. É uma desordem clínica definida pela presença de infecção e inflamação sistêmica (LÓPEZ-BOJÓRQUEZ *et al*., 2004). A infecção é definida como um processo inflamatório patológico causado pela invasão de fluidos, tecidos ou regiões do organismo normalmente estéreis por microorganismos patogênicos ou potencialmente patogênicos (LÓPEZ-BOJÓRQUEZ *et al*., 2004; SILVA *et al*., 2008). Atualmente acredita-se que doenças resultantes de lesão endotelial causada por persistente estímulo inflamatório, são responsáveis pelo comprometimento de múltiplos órgãos e sistemas. Na sepse por bactérias gram-negativas, gram-positivas, vírus e fungos ou em doenças não infecciosas como a pancreatite, o trauma, doenças autoimunes, queimaduras extensas entre outras, ocorre estimulação inflamatória (SALLES *et al*., 1999). O termo síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS) foi proposto para descrever a reação inflamatória desencadeada pelo organismo frente a qualquer agressão infecciosa ou não infecciosa. O choque séptico é definido como falência circulatória aguda ou colapso vascular caracterizado por hipotensão arterial persistente, não sendo explicado por outra razão se não a sepse (LÓPEZ-BOJÓRQUEZ *et al*., 2004; SILVA *et al*., 2008).

Durante o choque séptico o organismo sofre uma série de agressões severas em diferentes níveis. Danos em múltiplos órgãos, inflamação, coagulação intravascular disseminada e bloqueio metabólico celular generalizado, resultam em falência de múltiplos órgãos e morte (ROLANDO *et al*., 2000; LÓPEZ-BOJÓRQUEZ *et al*., 2004). O congestionamento capilar, vasodilatação e o fenômeno de falência cardíaca reduzem o fluxo sangüíneo aos tecidos. A infiltração e ativação de neutrófilos e outras células danifica as membranas biológicas, especialmente a microvasculatura do endotélio. Órgãos como pulmão e fígado são particularmente susceptíveis aos danos produzidos pelo infiltrado celular. O dano pulmonar é resultado de uma síndrome de falência respiratória progressiva, em que fluidos dos tecidos escapam do sangue para o espaço alveolar, devido às lesões do endotélio causadas direta ou indiretamente pela sepse. A perda da função hepática é o resultado da dificuldade em manter níveis sangüíneos de glicose adequados (a

neoglicogênese é inibida), e nos rins o dano epitelial é devido à redução da perfusão sanguínea (OERTILI *et al*., 1998; LÓPEZ-BOJÓRQUEZ *et al*., 2004).

A superprodução de óxido nítrico (NO) pelos macrófagos e miócitos cardíacos leva a falência cardíaca e perda da perfusão geral do órgão com subsequente choque hemodinâmico como resultado da redução do fluxo sangüíneo (WORRALL *et al*., 1997; LÓPEZ-BOJÓRQUEZ *et al*., 2004).

A hipoglicemia, perda irreversível da pressão sanguínea, bloqueio metabólico e falência cardíaca são sinais clínicos do choque séptico. Todos estes sintomas geralmente têm consequências letais.

1.5 A resposta do hospedeiro

Ao entrar no organismo a bactéria se defronta com fatores de defesa humorais e celulares. Os fatores humorais compreendem o complemento, anticorpos e proteínas de fase aguda. Na resposta celular, particularmente as células mononucleares (monócitos e macrófagos) e os neutrófilos são as células de maior importância, uma vez que elas podem reconhecer direta ou indiretamente constituíntes da parede celular bacteriana após a sua ligação a fatores do complemento e anticorpos (VAN AMERSFOORT *et al*., 2003).

Estudos realizados durante a última década mostraram que as células dendríticas também respondem ao LPS. Interações entre células dendríticas e patógenos microbianos são fundamentais para a geração de uma resposta imune adaptativa. Uma vez estimuladas com bactérias ou componentes bacterianos como o LPS, as células dendríticas imaturas passam pelo processo de maturação que envolve a expressão de moléculas co-estimulatórias, moléculas de CPH (Complexo principal de histocompatibilidade) e produção de citocinas e quimiocinas que fornecem sinais para o desenvolvimento e diferenciação de linfócitos. As células dendríticas são responsáveis por direcionar diferentes tipos de respostas de células T, incluindo geração de células T efetoras e de memória (CAROFF *et al*., 2002).

Em condições fisiológicas, as células do sistema imune são constantemente expostas a pequenas quantidades de LPS provenientes das bactérias do trato gastro-intestinal. Este LPS é reconhecido pelos macrófagos e é essencial para manter o nível de ativação basal do sistema imune (VAN AMERSFOORT *et al*., 2003).

A bactéria pode ativar as duas vias do sistema complemento: componentes da superfície polissacarídica da *E. coli* (antígeno-O, cápsula e LPS) desencadeiam a via alternativa através da ligação do fator C3 do complemento (QUEZADO *et al*., 1994). O componente C1q liga-se ao lipídeo A e ativa a via clássica do sistema complemento (YING *et al*., 1993). Esta mesma via é também ativada na presença de anticorpos específicos (IgG e IgM) a constituíntes das bactérias gram-negativas. Em todos os três casos, o C3b é depositado na molécula ou superfície celular, que irá promover a fagocitose pelos macrófagos, neutrófilos e levar a inserção dos componentes C5-C9 (complexo de ataque à membrana, MAC) levando a lise da bactéria (DE BOER *et al*., 1993; HAENEY, 1998). Entretanto, longas cadeias do antígeno-O em bactérias gram-negativas ou uma espessa camada de petidoglicanos em bactérias gram-positivas, podem conferir proteção à bactéria da lise mediada pelo sistema complemento (HAENEY, 1998). Similar ao LPS o ácido lipoteicóico (LTA), presente em espécies gram-positivas, é capaz de ativar a via clássica através da interação com os componentes C1 e C1q (LOOS *et al*., 1986) Além de que, eritócitos ligados ao LTA ativam a via alternativa do complemento resultando na sua lise (HUMMELL *et al*., 1985).

O reconhecimento do LPS ou outros componentes bacterianos pelos fagócitos (monócitos, macrófagos e leucócitos polimorfonucleares [PMN]) inicia a cascata de liberação de mediadores inflamatórios, mudanças vasculares, fisiológicas e recrutamento de células do sistema imune. Os macrófagos ativados pelo LPS, tornam-se metabolicamente ativos e produzem grandes quantidades de radicais livres de oxigênio e outros agentes microbicidas tais como lisozimas, proteínas catiônicas, hidrolases ácidas e lactoferrina, além de secretarem mediadores inflamatórios (HIEMSTRA *et al*., 1993; VAN AMERSFOORT *et al*., 2003). Um dos primeiros e principais mediadores liberados é o TNF-α (BEUTLER *et al*., 1985). A liberação de TNF-α, bem como de outras citocinas por ele estimuladas como a IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, fator de ativação de plaquetas (PAF), quimiocinas e eicosanóides têm profunda ação em tecidos vizinhos (HACK *et al*., 1997). As anafilotoxinas C3a e C5a derivadas da via do complemento, juntamente com alguns destes mediadores inflamatórios atraem e ativam os PMN da circulação. Além disto, ativam os granulócitos basofílicos e mastócitos, fazendo-os liberaram os seus componentes vasoativos (como a histamina), facilitando a invasão dos fagócitos O extravasamento de PMN é possibilitado pela vasodilatação e regulação de moléculas de adesão em células endoteliais (JAESCHKE *et al*., 1997; VAN AMERSFOORT *et al*., 2003).

O endotélio secreta uma variedade de agentes parácrinos que mantem o tônus muscular (SUMPIO *et al*., 2002). As substâncias vasodilatadoras como o NO e a prostaciclina aumentam o diâmetro do espaço intravascular, através do relaxamento de células adjacentes à musculatura, e exercem função protetora contra o desenvolvimento de lesões vasculares conservando a vasodilatação, inibindo a agregação plaquetária e a adesão leucocitária, mantendo assim a homeostase da resistência vascular (DAUPHINEE e KARSAN, 2006). A ativação das células endoteliais pelo LPS é caracterizada por uma série de fatores, dentre eles o aumento da expressão da enzima óxido nítrico sintase (*Nos2*), que ocasiona um aumento na produção de NO (MORIKAWA *et al*., 2000), alterações bioquímicas e estruturais, que são iniciadas com a expressão de uma série de genes que estão envolvidos com a síntese de moléculas de adesão. Estas moléculas são essenciais para a formação do edema e do infiltrado celular massivo observado no choque séptico, elas promovem o recrutamento dos linfócitos, neutrófilos, monócitos e outras células observadas em grandes áreas da microvasculatura (HUANG *et al*., 1995; LÓPEZ-BOJÓRQUEZ *et al*., 2004). Os PMN reagem a este estímulo através da agregação intravascular, aderência ao endotélio, diapedese e produção de mediadores inflamatórios como o TNF-α, o leucotrieno B4 (LTB4) e o PAF. Os PMN ativados expressam CD14, CD11/CD18 e alguns receptores para a fração Fc das Imunoglobulinas (Igs), e são capazes de reconhecer e fagocitar o LPS, fragmentos ou a toda bactéria (MULLIGAN *et al*., 1993), e também produzem substâncias microbicidas (VAN AMERSFOORT *et al*., 2003). As células endoteliais respondem ao LPS através do sCD14 e a liberação de IL-1, IL-6, eicosanóides, agentes vasoativos derivados do fator de relaxamento do endotélio 1, quimiocinas e fator estimulador de colônia (CSF) (MAHALINGAM e KARUPIAH, 1999). O resultado da expressão das moléculas de adesão endotelial é o de aumentar a migração e manutenção da atividade celular no tecido lesionado, por conseguinte levando à perda da capacidade homeostática do endotélio e passagem de líquido, células e proteínas para o espaço intersticial, formando o edema (SALLES *et al*., 1999).

Durante a infecção, as células parenquimais do fígado são estimuladas pelo TNF-α, IL-1 e IL-6 a produzirem proteínas de fase aguda. Estas compreendem a proteína C reativa, a proteína amilóide do soro A, LBP, proteína amilóide do soro P, hemopexina, haptoglobulina, fatores C3 e C9 do sistema complemento, α_2-macroglobulina, algumas inibidoras de protease e proteínas da cascata de coagulação (DERFALVI *et al*., 2000; ALEXANDER e RIETSCHEL, 2001; JEAN-BAPTISTE, 2007). Algumas destas proteínas de fase aguda, como a LBP modulam reações de

resposta imune através da ativação de fagócitos e células apresentadoras de antígeno, mas basicamente a resposta de fase aguda é considerada uma moderadora dos danos causados durante a infecção (RAMADORI *et al*., 1990).

Os mediadores inflamatórios secretados por diferentes tipos de populações celulares atraem e ativam linfócitos T e B, seguido pela liberação tardia de mediadores como IL-2 e IFN-γ, e GM-CSF (BONE, 1991). A IL-2 e o GM-CSF estão envolvidos na proliferação e ativação de PMN e células mononucleares, enquanto que o IFN-γ aumenta o efeito do LPS nas células mononucleares (BONE, 1991; YOUNG *et al*., 1993; HEINZEL *et al*., 1994;). As ações das células imunes ativadas, combinadas com os efeitos dos mediadores inflamatórios causam sintomas como febre, danos endoteliais, dilatação vascular periférica, desordens do sistema de coagulação, microtrombos e depressão miocárdica. Estes fenômenos resultam na disfunção de múltiplos órgãos, choque e morte (BONE, 1991; VAN AMERSFOORT *et al*., 2003; TSIOTOU *et al*., 2005).

1.6 Seleção de Genética Bidirecional de linhagens de camundongos produzidas segundo a intensidade da reação inflamatória aguda (AIR)

Os mecanismos genéticos que controlam a intensidade da resposta inflamatória aguda e a resposta imune específica, bem como as reações biológicas desencadeadas por estes processos, são alvos de grande interesse e foram estudados em modelos murinos (STIFFEL *et al.*, 1990; IBAÑEZ *et al.*, 1992; SANT'ANNA *et al.*, 1994). Em colaboração com o Instituto Curie de Paris, o Laboratório de Imunogenética do Instituto Butantan produziu, por Seleção Genética Bidirecional, linhagens de camundongos, que diferem na capacidade de produção de anticorpos contra antígenos complexos (SANT'ANNA *et al.*, 1994) e na Intensidade de Reação inflamatória Aguda (AIR – acute inflammatory reaction) a microesferas de poliacrilamida (BIOGEL P-100), substância insolúvel, não biodegradável e não imunogênica (IBAÑEZ *et al.*, 1992).

O processo de seleção das linhagens de máxima (AIRmax) e mínima (AIRmin) resposta inflamatória aguda teve início a partir de uma população heterogênea de camundongos, resultante do acasalamento equilibrado de oito linhagens isogênicas de camundongos de origens diferentes, cujo esquema de hibridização está representado abaixo:

Isogênicas	**A x DBA/2**	**P x SWR**	**SJL x CBA**	**BALB/c x C57BL/6**
Híbridos	**F1**	**F1**	**F1**	**F1**
Segregantes	**F2**		**F2**	
Segregantes		**F3**		
		(População Inicial F0)		

Como resultado destes cruzamentos, foi produzida uma população com alta heterogeneidade genética, em que cada indivíduo continha a combinação de 12,5% do *pool* gênico de cada uma dos oito linhagens isogênicas parentais.

Os animais foram submetidos à injeção do agente flogístico Biogel, no tecido subcutâneo. A intensidade da reação inflamatória aguda foi avaliada 24 horas após o tratamento, considerando o número e a morfologia das células infiltradas além da determinação do conteúdo protéico no exsudato inflamatório (FONTAN e FAUVE, 1983; FAUVE *et al*., 1983). A população F0 analisada apresentou grande variação fenotípica, obedecendo a uma Distribuição Normal de freqüências para o caráter selecionado, intensidade de resposta infamatória aguda (STIFFEL *et al.*, 1990).

Os acasalamentos de todas as gerações do processo de seleção foram realizados escolhendo animais portadores de resposta inflamatória mais alta ou mais baixa, situados nos extremos da curva de distribuição normal da população de camundongos resultantes em cada geração. Para manter o fundo genético heterogêneo, foram sempre evitados os acasalamentos consangüíneos.

A partir da 20ª geração de seleção, admitiu-se que as duas linhagens atingiram o limite de Seleção, em que os alelos que apresentam efeitos opostos na resposta inflamatória, naqueles loci que eram polimórficos na F0, estariam fixados em homozigose em cada linhagem. A análise do processo de seleção, empregando métodos de genética clássica, demonstrou a regulação poligênica da intensidade da AIR, com o envolvimento de 7 a 12 loci gênicos com efeito aditivo (BIOZZI *et al.*, 1998; IBAÑEZ *et al*., 1992).

A diferença fenotípica estabelecida entre as linhagens AIRmax e AIRmin é, sobretudo referente ao número de leucócitos migrantes no sítio inflamatório em resposta ao Biogel, sendo

que os neutrófilos representam as principais células deste infiltrado, correspondendo a 85%, enquanto que os demais 15% são essencialmente fagócitos mononucleares (RIBEIRO *et al.*, 2003). Esta diferença se acentuou ao longo do processo seletivo e na atual geração F48 atingiu diferenças interlinhagens em torno de 20 vezes no número de células infiltradas e de 2,5 vezes na concentração protéica do exsudato, conforme a **figura 1:**

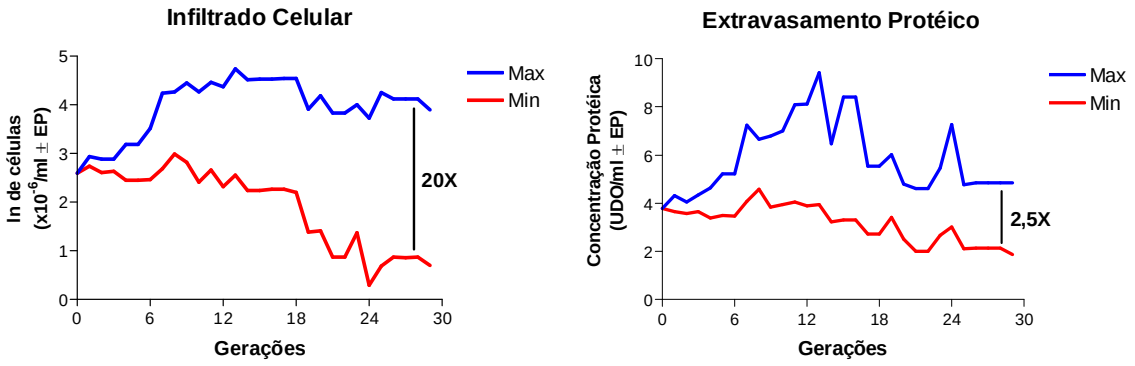

Figura 1: Divergência fenotípica da reação inflamatória aguda medida pela migração celular e extravasamento protéico nas diferentes gerações de acasalamento seletivo bidirecional das linhagens AIRmax e AIRmin.

Fonte: Modificado de BIOZZI *et al*,. 1998, com permissão.

A diferença fenotípica interlinhagens não está limitada à resposta inflamatória ocasionada pelo Biogel, mas é um fenômeno geral, que se estende a outros agentes flogísticos como a carragenina e o zymozan (VASQUEZ-BRAVO, 1996) e ao veneno de *Bothrops jararaca* (CARNEIRO *et al*., 2002).

Este modelo animal também tem demonstrado ser muito adequado para o estudo dos mecanismos de resposta inflamatória aguda e suas interações com a resposta imune específica em doenças autoimunes (VIGAR *et al.*, 2000; PETERS *et al*., 2007), tumorais (BIOZZI *et al.*, 1998; MARIA *et al.*, 2003) e infecciosas (ARAUJO *et al.*, 1998; VORRARO, 2001). Além de apresentarem um perfil distinto de resposta na cicatrização e reparo tecidual (DE FRANCO *et al.*, 2007).

Camundongos da linhagem AIRmax mostraram-se extremamente resistentes à infecção por patógenos intracelulares como *S.* Typhimurium e *Listeria monocytogenes*, suportando inóculos superiores a 2 x 10^7 e 2 x 10^{11} bactérias respectivamente, enquanto que a DL_{50} dos animais AIRmin foi cerca de 1000 e 100 vezes menor para os dois patógenos. Esta diferente

sensibilidade das linhagens foi relacionada à sua capacidade de controlar o crescimento bacteriano no baço (ARAUJO *et al.*, 1998). Apesar da grande diferença na sensibilidade a bactérias, ambas as linhagens mostraram-se resistentes a altas doses de sua endotoxina (LPS). As DL_{50} foram de 154,3 e 358,6 µg, para os animais AIRmax e AIRmin, respectivamente, demonstrando que o comportamento diferenciado das linhagens frente à infecção por *S*. Typhimurium é independente da sensibilidade aos efeitos de sua endotoxina (ARAUJO *et al.*, 1998). Estudos recentes mostraram que houve um aumento da sensibilidade dos animais ao LPS de *S*. Typhimurium, sendo observadas DL_{50} de 70,0 µg para os animais AIRmax e valores maiores que 400 µg para os AIRmin (Comunicação Pessoal)[1].

Em camundongos, a resistência à infecção por patógenos como *S*. Typhimurium, *Leishamania donovani* e *Mycobacterium bovis* depende da expressão de um gene denominado "*natural resistance-associated macrophage protein-1*" (*Nramp1*). Duas formas alélicas foram descritas para este gene, o alelo da resistência $Nramp1^R$ e o alelo da susceptibilidade $Nramp1^S$. A análise da sequência da proteína do gene *Nramp1* entre as duas formas alélicas (R e S) revelou que uma única mutação, ou seja, uma substituição não conservada do aminoáocido glicina por ácido aspártico na posição 169 do códon, dentro do quarto domínio transmembrânico da proteína, resulta na sua completa falta de função em camundongos susceptíveis (VIDAL *et al*., 1996).

O estudo da proteína codificada pelo gene *Nramp1* identificou um polipeptídeo hidrofóbico de 60 kDa, com 12 domínios transmembrânicos e uma alça extracitoplasmática glicosilada, com vários sítios de fosforilação. É expresso exclusivamente nos compartimentos endossomal/lisossomal de monócitos/macrófagos, células dendríticas e leucócitos polimorfonucleares, sendo que durante a fagocitose a proteína é rapidamente recrutada para a membrana do fagolisossomo (FORBES *et al*., 2001; WYLLIE *et al*., 2002; VALDEZ *et al.*, 2008).

O gene *Nramp1* faz parte de uma família de genes que são transportadores de íons essenciais, devido a isto, este gene foi nomeado como *Slc11a1 "Solute carrier family 11 (proton-coupled divalent metal ion transporters), member 1*", conforme descrito no *Mouse Genome Informatics*. No entanto, grande parte da literatura publicada ainda utiliza a denominação *Nramp1*, assim sendo, neste trabalho manteremos a nomenclatura antiga.

---

[1] Notícia fornecida por Ribeiro, O.G. (2006).

Diversos estudos evidenciam a participação do gene no transporte de Fe^{+2}, prótons e outros cátions divalentes, alterando o ambiente intravacuolar do fagolisossomo, entretanto a direção deste transporte e a sua função bioquímica ainda são controversas (FRITSCHEA *et al*., 2008). A primeira teoria é de que a proteína normal do gene *Nramp1* transportaria o Fe^{+2} para o interior do fagolisossomo, favorecendo a reação de Harber / Fenton-Weiss, que gera radicais hidroxila altamente tóxicos para a atividade da bactéria. Por outro lado, há uma outra proposta de que o animal portador do alelo de resistência do gene tende a privar a disponibilidade de Fe^{+2} e outros cátions divalentes, como Zn^{2+}, Mn^{2+}, que são fundamentais para o crescimento da bactéria, prejudicando a sua multiplicação no interior do fagolisossomo (WYLLIE *et al*., 2002; FORTIER *et al*., 2005; FRITSCHEA *et al*., 2008).

Portanto, o *Nramp1* é um gene pleiotrópico, atua na regulação da fase inicial da atividade microbicida dos macrófagos e sua expressão defeituosa interfere na ativação macrofágica refletindo no *burst* oxidativo, na produção de óxido nítrico e TNF-α (BARTON *et al.*, 1995). Além disso, interage na produção de IFN-γ e IL-1 (KITA *et al.*, 1992; RAMARATHINAM *et al.*, 1993), e na expressão de moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (LANG *et al.*, 1997; WOJCIECHOWSKI *et al.*, 1999; STOBER *et al.*, 2007).

Com relação à freqüência dos alelos do gene *Nramp1*, o alelo *S* ($Nramp1^{S}$) encontra-se presente em 60% dos AIRmin e 9% dos AIRmax, sugerindo que este desvio de freqüência tenha sido devido ao processo de seleção e que este gene ou algum outro gene muito próximo a este, esteja participando do controle da intensidade da reação inflamatória aguda (ARAUJO *et al.*, 1998).

Devido a diferença de resistência entre as linhagens AIRmax e AIRmin para a infecção com *S*. Typhimurium e o desequilíbrio de freqüência dos alelos *R* e *S* do gene *Nramp1* nestas linhagens, foram produzidas através de cruzamentos assistidos por genotipagem sublinhagens homozigotas para estes alelos, denominadas $AIRmax^{RR}$, $AIRmax^{SS}$, $AIRmin^{RR}$ e $AIRmin^{SS}$. Estudos recentes mostraram que os animais portadores dos alelos *R* do gene *Nramp1* são muito resistentes à infecção por *S*. Typhimurium (As DL_{50} foram de $2x10^{7}$ e $2x10^{5,9}$, para os animais AIRmax e AIRmin, respectivamente). Os animais $Nramp1^{S}$ foram os mais susceptíveis à infecção, porém observamos uma significante modulação da susceptibilidade na sublinhagem $AIRmax^{SS}$, que apresentou DL_{50} de $2x10^{4,6}$ bactérias, 800 vezes maior que os animais $AIRmin^{SS}$, com DL_{50} de 10^{2} bactérias (BORREGO *et al.*, 2006).

A sensibilidade ao LPS também foi estudada nestes animais e as sublinhagens mais resistentes à infecção por *S*. Typhimurium foram as mais sensíveis ao choque endotóxico DL_{50} de 22,8 µg para AIRmax^{RR} (BORREGO *et al.*, 2006) conforme apresentado na **Tabela 1**.

TABELA 1: Sensibilidade dos animais das sublinhagens AIRmax^{RR} AIRmax^{SS} AIRmin^{RR} e AIRmin^{SS} e F1(S) ao lipopolissacarídeo de *S*. Typhimurium.

Animais	**(N)**	**DL_{50} e Desvio Padrão**
AIRmax^{RR}	19	22,8 ± 3,42 µg*
AIRmax^{SS}	27	45,8 ± 10,67 µg
AIRmin^{RR}	18	200,0 ± 49,80 µg*
AIRmin^{SS}	19	326,0 ± 35,20 µg
F1(S)	19	234,7 ± 45,80µg

- Os animais foram injetados com 0,2 ml de suspensões de 40 µg, 100 µg ou 200 µg de LPS (SIGMA) diluído em salina.
- A mortalidade foi registrada após 48 hs de observação

* Diferenças significantes entre linhagens *RR* e *SS* ($p<0,0001$)

Regiões cromossômicas associadas a caracteres quantitativos são denominadas QTL (do inglês *Quantitative Trait Loci*). Estas regiões podem ser detectadas por marcadores genéticos dispersos pelo genoma e a sua associação com fenótipos estudados pode ser analisada por programas de mapeamento de QTL. Isto tem possibilitado a dissecação dos caracteres complexos em fatores mendelianos simples. O mapeamento de QTL possibilita estimar a localização de genes que controlam a variação fenotípica de um caráter, a magnitude de seus efeitos e as interações com outros QTL (PATERSON *et al*., 1996).

Em nossos estudos, além do gene *Nramp1*, localizado no cromossomo 1, detectamos 3 regiões polimórficas nos cromossomos 6, 11 e 13 envolvidas na regulação da inflamação aguda (BORREGO *et al*., 2006). Estas regiões são coincidentes com as regiões envolvidas na resistência à infecção por *S*. Typhimurium (SEBASTIANI *et al*,. 1998), das quais duas (cromossomos 6 e 11) estariam também envolvidas na produção de anticorpos contra antígenos flagelares de *S*. Typhimurium (TREZENA *et al*., 2002).

Estes QTL reguladores da resposta inflamatória aguda parecem estar envolvidos na modulação da sensibilidade à infecção por *S*. Typhimurium, atuando como modificadores da expressão do gene *Nramp1*. Além disso, a interação dos alelos do gene *Nramp1* com os QTL de inflamação modulam a sensibilidade aos efeitos tóxicos do LPS e a resposta inflamatória aguda, indicando o gene *Nramp1* como forte candidato a ser um dos genes reguladores destes fenótipos complexos e multifatoriais.

O principal objetivo deste trabalho é estudar a interação do gene *Nramp1* com os QTL reguladores da intensidade da resposta inflamatória aguda na determinação da sensibilidade ou resistência ao choque endotóxico induzido pelo LPS.

2 OBJETIVOS

O principal objetivo deste trabalho é estudarmos a interação do gene *Nramp1* e QTL reguladores da intensidade da resposta inflamatória aguda na determinação da sensibilidade ou resistência ao choque endotóxico induzido pelo LPS. Desse modo investigamos mecanismos genéticos e celulares envolvidos na sensibilidade ao choque endotóxico induzido pelo LPS de *S*. Typhimurium, nas sublinhagens AIRmax e AIRmin homozigotas para os alelos *R* e *S* do gene *Nramp1* através dos seguintes procedimentos:

1- Análise de polimorfismos genéticos presentes nos animais da seleção de inflamação AIRmax e AIRmin e nos animais AIRmax^{RR}, AIRmax^{SS}, AIRmin^{RR}, e AIRmin^{SS} para verificar se após a obtenção das sublinhagens, ocorreram mudanças no fundo genético destes animais no cromossomo 1, além do gene *Nramp1*.

2- Análise da expressão gênica, através do RNA mensageiro, de citocinas pró e anti inflamatórias e de moléculas envolvidas no choque endotóxico, em populações celulares de fígado e medula óssea.

3- Análise da produção sérica de citocinas pró e anti inflamatórias liberadas após o estímulo com LPS.

4- Estudo das diferenças na expressão gênica global em células da medula óssea dos animais submetidos ao estímulo de LPS.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados camundongos de ambos os sexos das linhagens AIRmax e AIRmin (geração F40 e F42); e sublinhagens AIRmax^{RR}, AIRmax^{SS}, AIRmin^{RR}, e AIRmin^{SS} (geração F14) com idade de 2 a 4 meses. Estes animais são produzidos e mantidos no biotério do Laboratório de Imunogenética do Instituto Butantan. Os procedimentos experimentais realizados estão de acordo com os princípios da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) do Instituto de Ciências Biomédicas da USP.

3.2 Extração do DNA genômico

O DNA genômico dos camundongos foi extraído de um pequeno segmento de cauda (1 cm) congelado em nitrogênio líqüido, utilizando o Kit E.Z.N.A. da Omega Bio-Tek. Resumidamente: Cada fragmento de calda foi adicionado a 200 µl de tampão TL suplementado com 20 mg/ml de Proteinase K. As amostras foram mantidas em banho Maria a 55ºC overnight. Após centrifugação por 15 minutos a 10.000 x g, o sobrenadante foi transferido para um tubo contendo 200 µl de tampão BL suplementados com 200 µl de isopropanol, misturando vigorosamente em vórtex. As amostras foram transferidas para a coluna HiBind®, e em seguida centrifugadas a 8.000 x g por 2 minutos. As colunas foram então lavadas 2 vezes com 650 ml de tampão de lavagem centrifugando a 8.000 x g por 2 minutos a cada lavagem. O DNA foi recuperado utilizando 200 µl de tampão de eluição, previamente aquecido a 70ºC, centrifugando as amostras a 8.000 x g centrifugação por 5 minutos.

A concentração de DNA total resultante foi determinada por espectrofotometria (260/280 nm) e a integridade das preparações foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 1,0% em tampão TBE 1 x concentrado (Tris-base 0,1M, ácido Bórico 0,1 M e EDTA 2 nM), contendo 0,5 µg/ml de brometo de etídio (BET) (Pharmacia). A corrida eletroforética foi realizada em tampão TBE aplicando uma corrente elétrica de 80 volts por cerca de 30 minutos. As bandas foram visualizadas utilizando o aparelho Image Master VDS- Pharmacia Biotech.

3.3 Estudo de polimorfismo de microssatélites no cromossomo 1

O rastreamento do cromossomo 1 foi realizado utilizando DNA genômico dos animais AIRmax e AIRmin e das sublinhagens AIRmax^{RR}, AIRmax^{SS}, AIRmin^{RR} e AIRmin^{SS}, utilizando marcadores do tipo SSLP (single sequence leng polimorfism) distribuídos ao longo do cromossomo (entre 5 e 110 cM) e também de genes localizados na região compreendida entre 30 e 40 cM**.**

Na avaliação do polimorfismo dos alelos dos marcadores considerados, utilizamos a técnica de PCR, utilizando "primers" sintetizados pela Gibco BRL, a saber: D1Mit64 (5,0 cM); D1Mit316 (7,9 cM); D1Mit211 (15,0 cM); D1Mit236 (25,7 cM); D1Mit214 (32,1 cM); D1Mit303 (34,8 cM); D1Mit132 (132 cM); D1Mit49 (54,5 cM); D1Mit10 (56,6 cM); D1Mit36 (92,3 cM), D1Mit291 (101,5 cM), *Caspase 8* (30,1 cM) e *Nramp1* (39,2 cM).

Para as reações de amplificação foram usados 100 ng de DNA, em uma mistura de tampão específico para PCR 1 x concentrado; dNTP, 250 µM de dNTPs (Invitrogen); 1,5 mM de $MgCl_2$ (Invitrogen); 2 mM de cada um dos "primers" (Forward e Reverse, Gibco BRL), e 1U de Platinun Taq DNA polimerase (Invitrogen) em um volume final de 25 µl com H_2O deionizada estéril. A amplificação foi realizada sob as seguintes condições 1 etapa a 95 °C durante 3 minutos, seguida de 35 ciclos da seguinte sequência: 94 ^oC por 30 segundos (desnaturação); 57 ^oC por 35 segundos (anelamento) e 72 ^oC por 45 segundos (extensão) em cada ciclo, e finalmente uma etapa a 72 ^oC por 10 minutos, nos aparelhos termociclador Eppendorf – Mastercycler Gradient ou MJ Research PTC 200.

Os produtos de amplificação dos microssatélites e dos genes foram submetidos à análise em gel de agarose 4% High e low melting v/v (Invitrogen), em TBE 1x concetrado (Tris-base 1M, ácido bórico 1M e EDTA 20nM) contendo 0,5 µg/ml de brometo de etídio (BET) (Pharmacia). O gel contendo as amostras foi colocado em uma cuba eletroforética e recoberto com TBE, sendo em seguida submetido a uma corrente elétrica de 100 V por 1 hora. O gel foi então analisado no "Pharmacia Biotech – Image Master VDS", e a avaliação do tamanho das bandas presentes foi realizada à partir da comparação das mesmas com um padrão de peso molecular formado por fragmentos ϕX174 RF DNA/*Hae* III (72pb a 1353pb), aplicado em cada corrida de gel.

3.4 Sensibilização de animais com LPS para a avaliação da expressão de citocinas em células de fígado e de medula óssea

Camundongos das sublinhagens AIR ($AIRmax^{RR}$, $AIRmax^{SS}$, $AIRmin^{RR}$, e $AIRmin^{SS}$) (4 animais por grupo); foram injetados, por via intravenosa, com 200 µl de suspensões de LPS (SIGMA) diluído em salina nas concentrações de 20 ou 80 µg. Após 40 minutos do tratamento, os animais foram sacrificados e fragmentos de fígado bem como células da medula óssea foram retirados, para a extração de RNA Total. A medula óssea foi extraída de dois fêmures por perfusão com 2 ml de meio RPMI 1640 (SIGMA) e isolada do lavado por centrifugação a 250 x g, durante 10 minutos a 4 ºC.

3.5 Extração de RNA total de células de fígado e de medula óssea

O RNA total de células de medula óssea e de fígado foi extraído segundo protocolo estabelecido pela empresa química Invitrogen na utilização do Reagente TRIzol®. Brevemente: fragmentos de fígado (100 mg) ou a medula óssea de 2 fêmures de cada animal tratado ou não com LPS foram colocados em tubos tipo *Eppendorf* e adicionado 1 ml TRIzol® gelado, sendo então as amostras mantidas em banho de gelo, ou congeladas a -20 °C até o momento do uso. Na continuação do processo de extração do RNA, as amostras foram picotadas dentro do próprio tubo com auxílio de tesouras cirúrgicas estéreis. Em seguida foram agitadas vigorosamente em vórtex, durante 15 segundos e então centrifugadas a 13.000 x g por 15 minutos a 4 °C. O sobrenadante (SN) foi transferido para um novo tubo e acrescentados 200 µl de clorofórmio (MERCK) em cada amostra. Após mistura vigorosa em vórtex, as amostras foram incubadas durante 10 minutos em banho de gelo seguindo-se então uma centrifugação a 13.000 x g, por 15 minutos a 4 °C. O SN transparente e incolor (correspondente ao RNA) foi transferido para um novo tubo e então acrescentados 500 µl de Álcool Isopropílico (MERCK) para induzir a precipitação do RNA. A solução foi homogeneizada e incubada em banho de gelo por 10 minutos, seguindo-se então uma centrifugação por 10 minutos a 4 °C, a 13.000 x g. O SN foi desprezado e o pellet de RNA foi lavado com 1 ml de etanol a 75%. As amostras foram agitadas no vórtex por 15 segundos, centrifugadas a 10.000 x g por 5 minutos a 4 °C, e em seguida o SN foi desprezado. Para secar as amostras, os tubos foram mantidos abertos à temperatura ambiente.

O pellet de RNA foi solubilizado com 50 µl de água estéril livre de RNAse, aquecendo-o em banho Maria a 55 °C por 10 minutos. A concentração de RNA total foi determinada por espectrofotometria, utilizando o aparelho U-3000 Hitachi (260/280 nm). A integridade do RNA das preparações foi avaliada por eletroforese em gel de agarose a 1,0 % preparado com tampão TBE (Tris-base 100 mM, Ácido Bórico 100 mM e EDTA 2mM), suplementado com 0,5 µg/ml de Brometo de Etídio (BET) (Pharmacia). A corrida eletroforética foi realizada com a mesma concentração de tampão TBE, aplicando uma corrente elétrica de 80 volts por cerca de 30 minutos. As bandas foram visualizadas com luz UV utilizando o aparelho Image Master VDS-Pharmacia Biotech.

3.6 Obtenção de DNA complementar (cDNA)

Para avaliar a expressão de mRNA o cDNA foi transcrito a partir do RNA total extraído conforme descrito anteriormente. A 1µg/10µl de RNA foram adicionados 1µl de Oligo$(dT)_{12-18}$ (50µM), 2µl de água livre de RNase e 1µl de oligonucleotídeos dNTP (10 µM); a mistura foi homogeneizada e aquecida a 65 ºC durante 5 minutos. Após este período, as amostras foram resfriadas por 1 minuto em banho de gelo para então serem adicionados 1µl da enzima SuperScript III RNase H^- Reverse Transcriptase – Invitrogen (200 U/ml); 1µl de DTT (100 mM), 4µl de tampão 5 x concentrado, específico para a enzima (250 mM Tris-HCL pH 8,3, 375 mM KCL e 15 mM $MgCl_2$). Em seguida as amostras foram aquecidas a 50 ºC por 50 minutos e posteriormente inativadas a 70 ºC por 15 minutos. As reações foram incubadas em aparelhos Termociclador Eppendorf – Mastercycler Gradient ou MJ Research PTC 200.

3.7 Sequências de *primers* utilizados na expressão de proteínas

Para a amplificação dos cDNAs dos genes *Il1b, Il6, Tnf, Ifng, Il12b, Il10, Casp 8, Il8rb* e também das moléculas *Cd14* e *Lbp*, (Conforme descrito no *Mouse Genome Informatics*), utilizamos as sequências sintéticas (*primers*) abaixo listadas (**Tabela 2**). Estes *primers* foram desenhados para *éxons* que flanqueiam *íntrons* de grande tamanho (~1000 pb) evitando assim a amplificação de possível DNA genômico contaminante presente nas amostras. Como controle positivo da expressão dessas moléculas, determinamos paralelamente em todas as amostras a

expressão das proteínas *B2m* (β2 microglobulina) ou *Ppia* (Ciclofilina), que são proteínas constitutivamente expressas por células de mamíferos.

TABELA 2: Sequência de *primers* utilizados na síntese de mRNA.

Primer	Sense	anti-sense	pb
B2m	TGACCGGCTTGTATGCTATC	CAGTGTGAGCCAGGATATAG	223 pb
Ppia	AGCGTTTTGGGTCCAGGAAT	AAATGCCCGCAAGTCAAAAG	91 pb
Il1b	TTGACGGACCCCAAAAGATG	AGAAGGTGCTCATGTCCTCA	205 pb
Il6	GTTCTCTGGGAAATCGTGGA	TGTACTCCAGGTAGCTATGG	209 pb
Il10	ATGCAGGACTTTAAGGGTTACTTG	TAGACACCTTGGTCTTGGAGCTTA	254 pb
Il12b	CAGTACACCTGCCACAAAGGA	GTGTGACCTTCTCTGCAGACA	277 pb
Tnf	TCTCATCAGTTCTATGGCCC	GGGAGTAGACAAGGTACAAC	213 pb
Ifng	GCTCTGAGACAATGAACGCT	AAAGAGATAATCTGGCTCTGC	227 pb
Lbp	TCGCCATCTCTGACTCTTCC	GGAGGTCCACTGAAATGGTG	120 bp
Cd14	AAGGGTACAGCTGCAAGGAC	TCAGCCCAGTGAAAGACAGA	119 bp
Casp 8	GGTGATCTGAGTTTGATCTCTGGAACACAT	CCCGTGACTCACTGTCTTGTTCTCTT	146 pb
Il8rb	GACTGTTCACCTAAACGGTG	CATACCAAGATGGAAGGGAGC	189 pb

3.8 Quantificação da expressão de citocinas em células do fígado e de medula óssea de camundongos tratados ou não com LPS por PCR em Tempo-Real (qPCR)

Para avaliar a expressão de *Il1b*, *Il6*, *Tnf*, *Ifng*, *Il12b*, *Il10*, *Cd14*, *Lbp*, *Casp 8* e *Il8rb* pelos camundongos das sublinhagens AIRmax^{RR} e AIRmax^{SS} e AIRmin^{RR} e AIRmin^{SS}, estimulados ou não com 20 e 80 µg de LPS, o cDNA de mRNA de células do fígado e da medula óssea foi amplificado pela reação de qPCR.

A cada amostra de cDNA (1 µl) foi adicionada uma mistura contendo as sequências sense e anti-sense dos *primers* (5µM); 6,25 µl da enzima Platinum SYBR Green qPCR Supermix-UDG (Invitrogen), e água suficiente para ajustar o volume final de reação para 12,5 µl/ tubo.

As reações foram incubadas no aparelho Chromo 4 (MJ Research), e submetidas a uma fase inicial de incubação a 50°C por 2 minutos, seguido da fase de ativação da enzima ("hot start") 95 ºC a 5 minutos. As sequências alvo foram então amplificadas durante 40 ciclos constituídos de etapas sucessivas de desnaturação (95 °C por 20 segundos), e de anelamento (60 °C por 35 segundos). A aquisição da fluorescência incorporada à sequência de dupla fita

amplificada em cada ciclo foi realizada na etapa final de extensão pelo aparelho Chromo 4. A cada amostra foi atribuído um valor de Ct (*Cycle Threshold*) referente ao número de ciclos necessários para que a fluorescência incorporada às duplas fitas amplificadas comece a se elevar acima da fluorescência de fundo, ou seja, no início da fase log de amplificação. Esta fase depende diretamente da quantidade de cópias das sequências alvo, que ocorrem inicialmente em cada amostra.

Após a amplificação, o produto da reação foi submetido a uma fase de dissociação (ou *Melting)* onde a temperatura se elevou dos 55 °C até os 90 °C, e a fluorescência da reação foi adquirida a cada 1 °C incrementado registrando-se a temperatura de dissociação, ou desnaturação da dupla fita do material amplificado. Esse processo está associado ao tamanho e, portanto da especificidade do produto amplificado em cada reação.

Os dados foram adquiridos e analisados pelo programa *Opticon Monitor Analysis Software 2.03*. A quantidade de citocinas em cada amostra foi expressa através dos valores do *Cycle Threshold* (Ct). Para quantificar os resultados obtidos pelo qPCR utilizamos o Método do Thereshold Comparativo (GIULIETTI *et al.,* 2001 e LIVAK *et al.,* 2001). Neste método fórmulas aritméticas são usadas para calcular níveis de expressão relativos a um calibrador, que pode ser uma amostra controle (ou amostra não tratada). A quantidade do gene alvo, normalizado por um gene endógeno (gene constitutivo) e relativa à amostra calibradora é dada pela fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$, em que $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$ (amostra) – ΔCt (calibrador), e o ΔCt é o Ct do gene alvo subtraído do Ct do gene constitutívo. Assim, a equação representa a expressão normalizada da amostra calibradora. Em nossos experimentos utilizamos como amostra calibradora o valor da média do ΔCt de quatro animais $AIRmin^{RR}$ não estimulados com LPS.

A normalização para um gene constitutivo é comumente o método mais aceitável para a correção de pequenas variações, devido à diferença na quantidade de RNA total. Um gene constitutivo ideal deve ser expresso em níveis constantes em diferentes tecidos do organismo, em todos os estágios do desenvolvimento, e não deve ser afetado pelo tratamento experimental (GIULIETTI *et al.,* 2001).

Foram testados alguns genes para serem utilizados como constitutívos e obtivemos os melhores resultados com a *B2m* para as amostras de fígado e a *Ppia* para as amostras de medula.

Para validar o cálculo do $2^{-\Delta\Delta Ct}$ é necessário demonstrar que a eficiência de amplificação do gene alvo e do gene constitutivo são aproximadamente iguais. Para isso, foi feita uma curva de diluição do cDNA utilizado e calculado o ΔCt. Para todos os *primers* utilizados, obtiveram-se eficiências de amplificação semelhantes entre os genes alvos e os constitutivos *B2m* ou *Ppia*.

3.9 Avaliação do perfil de citocinas na circulação após tratamento com LPS

Camundongos das sublinhagens AIR ($AIRmax^{RR}$, $AIRmax^{SS}$, $AIRmin^{RR}$, e $AIRmin^{SS}$) (4 animais em cada grupo); foram injetados, por via intravenosa, com 200 µl de suspensões de LPS (SIGMA) diluído em salina nas concentrações de 20 ou 80 µg. Após 90 minutos do tratamento, os animais foram sangrados pelo plexo retro-orbital e os soros foram armazenados à -20 ^{o}C, até a dosagem por ensaios de reação imuno enzimática (ELISA) utilizando os reagentes da BD Biosciences.

Na reação de ELISA foram utilizadas placas de poliestireno de 96 poços (NUNC - Maxisorp) que foram sensibilizadas com anticorpos de captura específicos para cada citocina analisada nas concentrações previamente estabelecidas, a saber: para a diluição do anticorpo anti-IL-1β (diluição 1:125); para os anticorpos anti-IL6 ou anti-IFN-γ (diluição1:250) foi utilizado o tampão Carbonato de Sódio (0,1M - pH=9,5). Para os anticorpos anti-TNF-α, anti-IL-10 e anti-IL-12p40 (diluição 1:250) foi utilizado o tampão Fosfato de Sódio (0,2M – pH=6,5).

As placas foram incubadas *overnight* a 4°C seguida do bloqueio, por 2 horas a 37 °C, com PBS contendo 10% de Soro Fetal Bovino (PBS-SFB 10%). Após sucessivas lavagens com PBS contendo 0,05% de Tween (PBS-T), as amostras de soro foram aplicadas e diluídas na placa na relação 1:2 e, dependendo da citocina avaliada, a diluição foi iniciada partindo do soro total (citocinas IL-1β, IFN-γ, IL-10 e IL-12p40) ou das amostras de soro diluídas previamente na relação 1:8 (citocinas TNF-α, IL-6). As amostras foram então incubadas durante 2 horas a 37 °C. Após este período, as placas foram lavadas com PBS-T e em seguida foram adicionados os anticorpos biotinilados. O anticorpo anti-IL-1β foi utilizado na diluição de 1:250 em PBS-SFB 10%. As placas foram incubadas durante 1 hora à temperatura ambiente, e após subsequentes lavagens foi adicionada a avidina-peroxidase, diluída na proporção de 1/250, em PBS-SFB 10% e em seguida incubadas durante 30 minutos à temperatura ambiente.

Para os anticorpos das demais citocinas como, TNF-α, IL6, IFN-γ, IL-10 e IL-12p40 foi preparada uma solução de trabalho (*Working Detector solution)* especifica do kit BD, na qual o anticorpo específico biotinilado foi misturado à avidina-HRP (*Avidin-horseradish peroxidase conjugate*) v/v, estando ambos previamente diluídos a 1:250 em PBS-SFB 10%. As placas foram incubadas durante 1 hora a temperatura ambiente e, após sucessivas lavagens, as reações de todas as citocinas analisadas foram reveladas com a adição do substrato Tetrametilbenzidina (TMB) e Peróxido de hidrogênio. Nesta fase, o período de incubação foi de aproximadamente 30 minutos quando as reações foram interrompidas pela adição de ácido sulfúrico 2N.

A medida da intensidade das reações foi determinada por densidade ótica (D.O) utilizando o leitor de ELISA (Labsystem Multiskan MS) sendo as leituras realizadas utilizando os filtros de 450 nm e de 570 nm (sendo este último utilizado como correção). Os valores D.O. obtidos foram transformados em concentração de proteína (pg/ml), pela associação destes valores com aqueles encontrados na determinação da curva padrão da citocina recombinante correspondente, dosados juntamente com as amostras. A dosagem de todas as citocinas recombinantes obedeceu o mesmo padrão de diluição seriada utilizado para as amostras, partindo de uma concentração inicial de 80.000 pg/ml, para TNF-α, IL-6 e IL-1β sendo que para o TNF-α e IL-6 até a diluição de 312,5 pg/ml, e para a IL-1β até a diluição de 78,125 pg/ml. Os recombinantes de IFN-γ e IL-10 partiram de uma concentração inicial de 40.000 pg/ml, sendo que para o IFNγ até a diluição de 1.250 pg/ml e para a IL-10 até 312,50 pg/ml. O recombinante da IL-12p40 partiu de uma concentração inicial de 50.000 pg/ml até a diluição de 97,65 pg/ml. As curvas das concentrações dos recombinantes foram estabelecidas por regressão linear dos mínimos quadrados dos valores de DO obtidos.

Na **figura 2** estão representadas as curvas padrão de todas as citocinas recombinantes testadas e seus respectivos coeficientes de correlação linear (r^2).

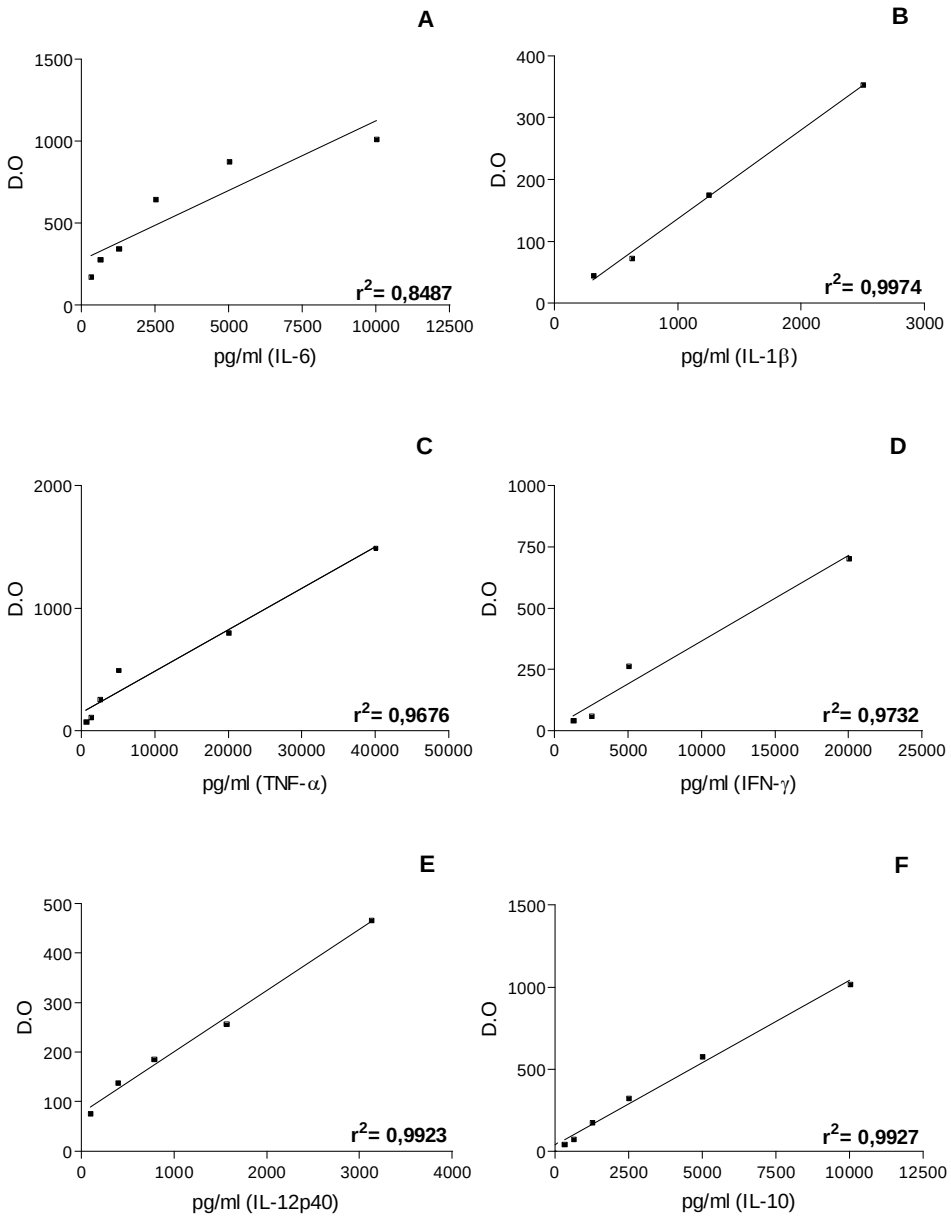

Figura 2: Gráficos das curvas padrão e fatores de correlação das citocinas recombinantes utilizadas como controle dos ensaios de ELISA. **(A)** IL-6, **(B)** IL-1β, **(C)** TNF-α, **(D)** IFN-γ, **(E)** IL-12p40 e **(F)** IL-10.

3.10 Análise da expressão gênica global por ensaio de *Microarray*

Os reagentes utilizados na preparação dos *microarrays* fazem parte da plataforma do "CodeLink Gene Expression System", GE Healthcare. Dividido nas principais etapas descritas

abaixo: **1)** Preparação do alvo; **2)** Hibridização do alvo; **3)** Lavagem e marcação dos *arrays*; **4)** Escaneamento do *array* e **5)** Análise dos dados.

3.10.1 Preparação dos mRNAs bacterianos

Uma solução de mRNAs bacterianos foi utilizada como controle interno da lâmina, que possui sequências que se hibridizarão a esses controles. Para o preparo da "solução estoque 1" de mRNAs (16,7 ng/µl) foi combinada uma série de mRNAs bacterianos (*araB, entF, fixB, gnd, hisB* e leu*B*) na concentração de 0,1 µg/µl, no volume de 2,5 µl cada, em um volume total de 15 µl. Essa solução foi dividida em 5 tubos (3 µl) e armazenada em freezer -70 °C. Uma nova diluição foi realizada (solução estoque 2) de 50,2 pg/µl, através da adição de 3 µl da "solução estoque 1" somado a 997 µl de água livre de nuclease. A partir desta solução foi realizada a solução de trabalho, onde 2 µl da solução estoque 2 foi adicionada a 998 µl de água livre de nuclease.

3.10.2 Síntese do cDNA de fita simples

Para cada amostra de RNA total (2 µg em 9 µl) foi adicionado 1 µl (concentração de 0,1 pg/µl) da solução de trabalho de mRNAs bacterianos controles (1µl para cada 1 µg de RNA total), 1 µl de T7 oligo(dT). Essa solução foi incubada por 10 minutos a 70°C no termociclador (Eppendorf – Mastercycler Gradient ou MJ Research PTC 200) e colocada imediatamente no gelo durante 3 minutos. Em seguida, foram adicionados 2 µl do tampão fita simples 10X, 4 µl de dNTP (5 mM), 1 µl de inibidor de RNase e 1 µl de transcriptase reversa. Essa solução de volume final de 20 µl foi incubada durante 2 horas a 42 °C no aparelho termociclador (Eppendorf – Mastercycler Gradient ou MJ Research PTC 200).

3.10.3 Síntese do cDNA de fita dupla

Os tubos da reação anterior foram mantidos em gelo, e receberam 63 µl de água livre de nuclease, 10 µl do tampão fita dupla 10X, 4 µl de dNTP (5mM), 2 µl de DNA polimerase e 1 µl

de RNase H. Essa solução de volume final de 80 µl foi incubada durante 2 horas a 16 °C no termociclador (Eppendorf – Mastercycler Gradient ou MJ Research PTC 200), porém sem aquecimento da tampa.

3.10.4 Purificação do cDNA de dupla fita

A purificação do cDNA foi feita através da utilização do kit CodeLink™ iExpress iPurify cDNA/cRNA Purification (GE Healthcare). Foram adicionados 250 µl do tampão de ligação ao cDNA fita dupla da etapa anterior, a solução foi misturada gentilmente, colocada na coluna de purificação e centrifugada a 9000 rpm por 1 minuto. Em seguida a coluna foi lavada com adição de 500 µl de tampão de lavagem e centrifugada a 9000 rpm por 1 minuto. Após este procedimento a coluna foi seca com uma nova centrifugação a 9000 rpm durante 1 minuto. Para a eluição do cDNA foram adicionados 12 µl de água livre de nuclease pré-aquecida (58°C) diretamente sobre a membrana. Após o período de incubação de 2 minutos a coluna foi centrifugada a 9000 rpm por 1,5 minutos. Esse passo foi repetido para gerar pelo menos 20 µl de eluato final.

3.10.5 Síntese do cRNA por transcrição in vitro (IVT)

Ao tubo da reação anterior foram adicionados 4 µl de tampão de reação T7 10X, 4 µl do mix de enzima T7 10X e 12 µl do mix NTP-Biotina. A reação foi protegida da luz e incubada por 18 horas em estufa de 37 °C.

3.10.6 Purificação do cRNA

A purificação do cRNA foi feita através da utilização do kit CodeLink™ iExpress iPurify cDNA/cRNA Purification (GE Healthcare). Os volumes dos tubos foram ajustados para 100 µl, através da adição de 60 µl de água livre de nuclease. Foram adicionados 350 µl de tampão de ligação para cRNA e em seguida, foram adicionados 250 µl de etanol 100% e as amostras foram colocadas imediatamente na coluna e centrifugadas por 1 minuto a 8000 rpm. Este passo foi

realizado mais uma vez para completa secagem da membrana. Para a eluição do cRNA foram adicionados diretamente sobre a membrana 100 µl de água livre de nuclease pré-aquecida (50-60 °C) diretamente sobre a membrana. Após o período de incubação de 2 minutos a coluna foi centrifugada a 9000 rpm por 1,5 minutos.

O cRNA purificado foi submetido à análise de pureza e integridade. A concentração e pureza foram determinadas através de espectrofotômetro no comprimento de onda de 260 nm e expresso em densidade óptica (D.O.), nesta etapa de quantificação do RNA para a obtenção da pureza das amostras foi observada a relação em torno de 2,0 para a razão RNA/proteína (260/280 nm). A integridade do RNA foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1% com tampão TBE (Tris-base 1M, ácido bórico 1M e EDTA 20nM) contendo 0,5 µg/ml de brometo de etídio (BET) (Pharmacia). O gel contendo as amostras foi colocado em uma cuba de eletroforese e recoberto com TBE, sendo em seguida submetido a uma corrente elétrica de 80 V por 30 minutos. O gel foi então analisado no "Pharmacia Biotech – Image Master VDS", e a avaliação da integridade do cRNA foi verificada pela presença de um "*smear*" abaixo da banda 18s do RNA íntegro (controle).

3.10.7 Fragmentação do cRNA

À alíquota de 10 µg em 20 µl foi adicionado 5 µl de tampão de fragmentação 5X e a amostra foi incubada em um termociclador (Eppendorf – Mastercycler Gradient ou MJ Research PTC 200) a 94 °C, durante 20 minutos, utilizando tampa aquecida. Em seguida os tubos foram colocados a 0 °C por 5 minutos.

3.10.8 Hibridização

Após transferir as amostras para um tubo de 1,5 ml foram adicionados 78 µl de tampão de hibridização A, 130 µl de tampão de hibridização B e 27 µl de água livre de nuclease e a solução foi incubada a 90 °C por 5 minutos para desnaturar o cRNA. Logo após os tubos foram colocados no gelo e cada lâmina foi preenchida com 250 µl da solução, sendo em seguida colocadas no agitador a 300 rpm e a 37 °C, onde permaneceram por 18 horas.

3.10.9 Detecção com Cy5-Streptavidina

A seguir as lâminas foram lavadas com tampão TNT 0,75X (Tris-HCl pH 7,6, NaCl 5M e 0,05% Tween 20) e colocadas em outro recipiente de tampão TNT 0,75X pré-aquecido a 46 °C por exatamente 1 hora. A seguir as lâminas foram colocadas em um recipiente com Cy5-streptavidina (1:500) em tampão TNB (Tris-HCl pH 7,6, NaCl 5M e 0,5% de NEN blocking – PerkinElmer) e incubadas (protegidas da luz) por 30 minutos. Em seguida as lâminas foram lavadas em tampão TNT 1X durante 5 minutos por três vezes. Como última lavagem, as lâminas foram colocadas em um recipiente com tampão SSC 0,1X / 0,05% Tween 20 e movimentadas durante 30 segundos, sendo em seguida secas em centrífuga a 664 xg por 3 minutos.

3.10.10 Análise dos dados obtidos

As lâminas foram analisadas com o *GenePix Array Scanner*. O estudo de expressão gênica foi realizado com a plataforma *CodeLink Gene Expression System* (GE Healthcare), que é compostas por lâminas contendo oligonucleotídeos representando cerca de 36.000 genes distintos, com sequências catalogadas em banco de dados (NCBI). Esta plataforma utiliza um sistema de detecção de cor única, baseado na incorporação indireta de apenas um fluorocromo para a marcação das amostras. Este sistema elimina resultados falsos decorrentes de parâmetros enzimáticos, que afetam a freqüência de incorporação de fluorocromos distintos, ou relativos à sobreposição espectral de duas fluorescências. Os dados de expressão extraídos de cada *microarray* foram normalizados de acordo com os valores de fluorescência dos genes de expressão constitutíva, presentes nos chips como controles internos. Genes expressos diferencialmente foram identificados pelas razões dos valores de intensidade fluorescente obtidos a partir de amostras controle e experimentais entre as linhagens, pelo programa *CodeLink Expression* v.2.3 (GE Healthcare). Critérios para definição de valores de *cut-off* para identificar genes diferencialmente expressos foram baseados em parâmetros biológicos (ex. razões ≥ 2 ou ≤ 0.5).

3.11 Análise estatística

As diferenças entre as médias das sublinhagens nos experimentos de ELISA e qPCR foram determinadas pelo teste t de *Student*, sendo estabelecido como nível mínimo de significância $p < 0,05$.

As correlações estabelecidas foram calculadas pela regressão linear dos quadrados mínimos dos valores e a significância destas correlações foi determinada pelo método de Fisher e Yates.

O desequilíbrio de freqüência dos alelos dos marcadores polimórficos foi calculado pelo teste de Qui-quadrado corrigido por Yates, tendo como valores significantes $p<0,001$ ($-\log p=3$).

4 RESULTADOS

4.1 Estudo de polimorfismo de microssatélites no cromossomo 1

A análise de polimorfismos foi realizada com o objetivo de comparar a freqüência dos alelos para cada microssatélite nos animais da Seleção de Inflamação AIRmax e AIRmin com a dos animais AIRmax^{RR}, AIRmax^{SS}, AIRmin^{RR} e AIRmin^{SS} e verificar se após a obtenção das sublinhagens, através dos acasalamentos assistidos por genotipagem, ocorreram mudanças no fundo genético do cromossomo 1destes animais, além do gene *Nramp1*.

Nesse rastreamento avaliamos o polimorfismo de 10 microssatélites distribuídos ao longo do cromossomo 1 em uma distância média de 10,0 cM, além dos genes *Casp* 8 e *Nramp1* localizados a 30,1 e 39,2 cM respectivamente (**Figura 3**).

Lembrando que a população fundadora da Seleção AIR (F0) foi obtida a partir da mistura genética equilibrada entre 8 linhagens isogênicas de camundongos (A/J, BALB/cJ, C57BL/6J, CBA/J, DBA/2J, P/J, SJL/J e SWR/J), rastreamos em paralelo o cromossomo 1 destas linhagens, utilizando os mesmos marcadores com o intuito de definir o padrão de migração dos alelos presente em cada linhagem. A ausência ou presença de polimorfismo dos marcadores foi definida considerando a diferença ou não na migração dos fragmentos amplificados por PCR.

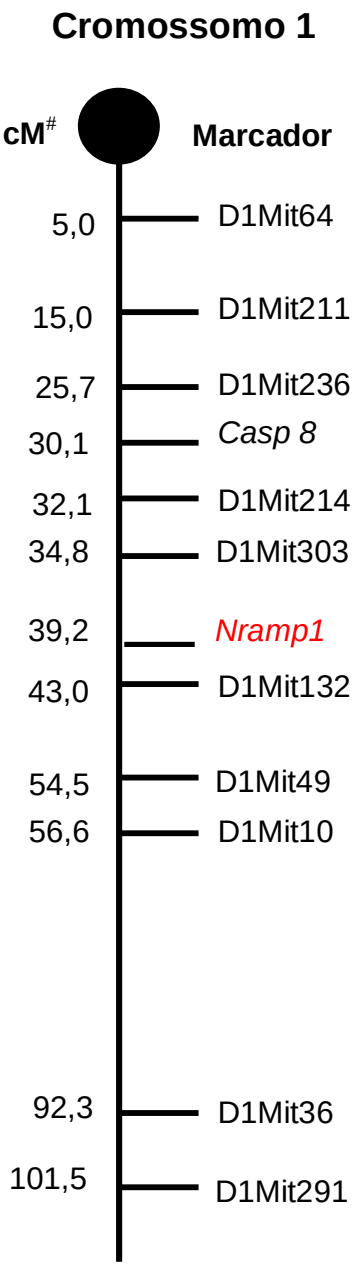

Figura 3: Distribuição esquemática dos marcadores genéticos avaliados no rastreamento do cromossomo 1 das linhagens da Seleção AIR.
[#] cM - distância do centrômero - *Mouse Genome Database*.

Embora o perfil dos alelos dos marcadores genéticos que estamos estudando já foi descrito no *Mouse Genome Data Base* para as linhagens isogênicas A/J, BALB/cJ, C57BL/6J, DBA/2J, em nosso estudo repetimos estas dosagens juntamente com a análise das demais linhagens isogênicas CBA/J, P/J, SJL/J e SWR/J. O tamanho dos alelos foi classificado de acordo com o peso molecular de cada um deles (considerado em pares de base – bp), atribuindo ao fragmento mais pesado a letra "**a**", ao imediatamente menor a letra "**b**" e assim sucessivamente (**Tabela 3**).

TABELA 3: Distribuição de alelos de marcadores genéticos (genes e microssatélites) ao longo do Cromossomo 1 no DNA genônico das 8 linhagens isogênicas que compuseram a F0 da seleção AIR.

Marcadores	**cM[#]**	**A**	**BALB**	**CBA**	**C57BL**	**DBA**	**P**	**SJL**	**SWR**
D1Mit64	5,0	a	a	b	a	a	a	a	a
D1Mit211	15,0	b	a	b	c	b	a	c	c
D1Mit236	25,7	b	a	b	a	b	b	b	b
Casp 8	30,1	a	b	a	a	a	a	b	b
D1Mit214	32,1	b	c	b	b	c	b	b	a
D1Mit303	34,8	b	a	b	a	b	a	b	a
Nramp1	39,2	*R*	*S*	*R*	*S*	*S*	*R*	*R*	*R*
D1Mit132	43,1	a	a	d	c	c	b	c	c
D1Mit49	54,5	b	a	a	a	b	a	b	b
D1Mit10	56,6	b	b	a	b	b	b	c	c
D1Mit36	92,3	a	b	b	b	a	a	-	a
D1Mit291	101,5	b	b	c	a	c	b	b	b

- Alelos de microssatélites definidos segundo o tamanho dos produtos das amplificações por PCR.
- Alelos do gene *Nramp1* definidos por PCR alelo especifico.
[#] centiMorgan (cM): distância do centrômero (*Mouse Genome Database*).

TABELA 4: Distribuição de alelos de marcadores genéticos (genes e microssatélites) ao longo do Cromossomo 1 no DNA genônico das linhagens AIRmax e AIRmin.

Marcadores	cM[#]	AIRmax	AIRmin	$\chi 2$	-Log p
D1Mit64	5,0	11aa	5aa / 6ab / 1bb	9,22	2,02
D1Mit211	15,0	8bb / 3bc	12cc	23,00	4,99*
D1Mit236	25,7	12aa	12bb	20,17	5,15*
Casp 8	30,1	9aa / 3ab	11bb / 1ab	21,00	4,56*
D1Mit303	34,8	2aa / 7ab / 1bb	12aa	15,09	3,28*
D1Mit132	43,1	1ac / 11cc	1aa / 1cc / 1ad / 2cd / 4dd	17,26	3,40*
D1Mit49	54,5	5aa / 6ab	9aa / 3ab	2,10	0,83
D1Mit10	56,6	1aa / 2ab / 7bb / 1bc	5aa / 4ab / 2ac / 1bb	10,82	1,54
D1Mit36	92,3	1ab / 10bb	1aa / 8ab / 3bb	10,19	2,22
D1Mit291	101,5	1ac / 6bb / 3bc / 2cc	4bb / 5bc / 3cc	2,10	0,26

- Alelos de microssatélites definidos segundo o tamanho dos produtos das amplificações por PCR no DNA genômico.
- Alelos do gene *Nramp1* definidos por PCR alelo especifico.
- O grau de desequilíbrio foi calculado pelo teste de Qui-Quadrado ($\chi 2$) corrigido por Yates.

* Valores considerados significantes $p<0,001$ (-log p=3).

[#] centiMorgan (cM): distância do centrômero (*Mouse Genome Database*).

TABELA 5: Determinação do grau de significância da distribuição de frequência de alelos de marcadores genéticos (genes e microssatélites) localizados ao longo do cromossomo 1 nas sublinhagens homozigotas para os alelos *R* e *S* do gene *Nramp1*.

Marcadores	cM#	Max^{RR}	Max^{SS}	Min^{RR}	Min^{SS}	Max^{RR} vs Max^{SS}		Min^{RR} vs Min^{SS}	
						χ2	-Log p	χ2	-Log p
D1Mit64	5,0	16aa	19aa	19aa	1aa 9ab	0	np	24,75	6,19*
D1Mit211	15,0	16bb	19cc	6bb 8bc 3cc	8bb 1bc 1cc	35,00	8,48*	5,27	1,66
D1Mit236	25,7	2aa 8ab 6bb	19aa	19bb	10bb	27,70	6,01*	0	np
Casp 8	30,1	11aa 5ab	19aa	19bb	10aa	6,29	2,07	29,00	7,14*
D1Mit214	32,1	16bb	19bb	19aa	10aa	0	np	0	np
D1Mit303	34,8	5ab 11bb	19bb	19aa	10aa	6,92	2,07	0	np
Nramp1	39,2	16*RR*	19*SS*	17*RR*	10*SS*	35,00	8,48*	27,00	6,69*
D1Mit132	43,1	1aa 8ac 6cc	19cc	19dd	6aa 4ad	15,50	3,37*	29,00	6,30*
D1Mit49	54,5	16aa	19bb	19aa	7aa 3ab	35,00	8,48*	6,36	1,93
D1Mit10	56,6	16aa	19cc	19aa	4ab 6bb	35,00	8,48*	29,00	6,30*
D1Mit36	92,3	16bb	19bb	19bb	10aa	0	np	29,00	7,14*
D1Mit291	101,5	4aa 10ac 2cc	7aa 10ac 2cc	19cc	10bb	0,56	0,12	29,00	7,14*

- Marcadores avaliados no DNA genômico de animais das sublinhagens AIRmax^{RR} (n=16), AIRmax^{SS} (n=19), AIRmin^{RR} (n=19) e AIRmin^{SS} (n=10).
- Alelos de microssatélites definidos segundo o tamanho dos produtos das amplificações por PCR.
- Alelos do gene *Nramp1* definidos por PCR alelo específico.
- O grau de desequilíbrio foi calculado pelo teste de Qui-Quadrado (χ2) corrigido por Yates (Análise estatística realizada entre animais AIRmax^{RR} vs AIRmax^{SS} e AIRmin^{RR} vs AIRmin^{SS}).

* Valores considerados significantes p<0,001 (-log p=3).

centiMorgan (cM): distância do centrômero (*Mouse Genome Database*).

np = não polimórfico

Uma vez estabelecidas as freqüências alélicas foi possível identificar quais marcadores estavam em desequilíbrio de freqüência na Seleção de Inflamação e nas sublinhagens homozigotas para os alelos *R* e *S* do gene *Nramp1*.

Na **Tabela 4** observamos que os animais AIRmax e AIRmin apresentaram desvios de freqüência para a maior parte dos marcadores analisados, resultado que já era esperado, pois estes marcadores já eram considerados informativos em análise realizada anteriormente em *pools* de DNA.

O marcador D1Mit49, localizado a 54,5 cM, não apresentou fixação preferencial de alelos entre os animais AIRmax e AIRmin. Isto permitiu a delimitação de duas regiões de aproximadamente 40 cM cada. Na primeira região, delimitada pelo D1Mit64 e o D1Mit49, existem cinco marcadores, o D1Mit211, D1Mit236, *Casp* 8, D1Mit303 e D1Mit132, com valores de p significantes (**Tabela 4**). Para a outra região, compreendida entre 54,5 cM a 101,5 cM, não foram observados polimorfismos de marcadores diferencialmente fixados nos animais AIR. Considerando que os animais AIRmax e AIRmin são heterogêneos, esta fixação diferencial de alelos sugere que estas regiões possam ter sido fixadas como resultado do processo de seleção a que os animais foram impostos, podendo assim serem candidatas a associação com o fenótipo.

Nas sublinhagens realizamos a análise entre animais com a mesma capacidade de resposta inflamatória, (**Tabela 5**) e observamos duas regiões polimórficas e comuns para AIRMax^{RR} e AIRMax^{SS} e AIRMin^{RR} e AIRMin^{SS} .A primeira região evidencia o gene *Nramp1* (39,2 cM) e o marcador D1Mit132 (43,1 cM) e a segunda é marcada pelo D1Mit10 (56,6 cM).

4.2 Quantificação da expressão de citocinas em células do fígado de camundongos tratados ou não com LPS por PCR em Tempo-Real (qPCR)

Os experimentos de qPCR foram realizados em 2 populações celulares distintas.

Inicialmente, avaliamos a expressão de citocinas e algumas moléculas envolvidas no choque endotóxico no fígado. É sabido que este é um órgão diretamente envolvido na resposta do organismo ao LPS, assim sendo, com o intuito de caracterizar possíveis diferenças na produção local de citocinas que possam auxiliar no entendimento das diferenças de sensibilidade das 2 sublinhagens, começamos nossos estudos por este órgão.

Nas **figuras 4** e **5** estão representados os experimentos que mostram a cinética de expressão das citocinas em células do fígado.

As doses de 20 e 80 µg de LPS foram escolhidas com base na DL_{50} das 4 sublinhagens e em experimentos feitos anteriormente. São as mesmas doses utilizadas nos experimentos de qPCR em células de medula óssea e nos ensaios de ELISA a fim de avaliar e comparar a produção das citocinas em níveis plasmáticos e a sua expressão transcricional em dois órgãos distintos.

A expressão de *Il1b* foi observada em todas os animais mediante os 2 estímulos de LPS utilizados. As sublinhagens $AIRmax^{RR}$ e $AIRmin^{RR}$ mostraram uma expressão aumentada em aproximadamente 26 e 170 vezes respectivamente em relação aos seus controles, quando estimuladas com 20 µg de LPS. É interessante ressaltar que nos animais controle da sublinhagem $AIRmax^{RR}$ já é detectável a expressão da citocina (**Figura 4A**).

A citocina *Il6* foi a que obteve maior expressão em todos os animais das sublinhagens, contudo, deve-se ressaltar a sublinhagem $AIRmin^{SS}$, que, em relação ao animais controle mostrou expressão aumentada em aproximadamente 600 e 730 vezes quando estimulada respectivamente com 20 µg e 80 µg de LPS, para esta última dose, os $AIRmin^{SS}$ expressaram mais *Il6* quando comparados aos $AIRmax^{RR}$, diferença significante $p<0,05$. (**Figura 4B**).

Também foi observada a expressão do *Tnf*, sendo significante, $p<0,05$ as diferenças entre os animais $AIRmax^{RR}$ e os $AIRmax^{SS}$ para a dose de 20 µg de LPS. O estímulo de 80 µg de LPS favoreceu a maior expressão gênica dos $AIRmax^{RR}$, sendo significante quando comparados aos $AIRmax^{SS}$ e aos $AIRmin^{RR}$. Os animais $AIRmin^{SS}$ também tiveram maior expressão do que os $AIRmin^{RR}$ ($p<0,05$) (**Figura 4C**).

Para a citocina *Il10*, para as duas doses de LPS utilizadas verificamos que os animais de baixa capacidade inflamatória ($AIRmin^{RR}$ e $AIRmin^{SS}$) foram os que mostraram a sua maior expressão, sendo significantes ($p<0,05$) as diferenças quando comparados os $AIRmin^{RR}$ aos $AIRmax^{RR}$ e aos $AIRmax^{SS}$, para o estímulo de 20 µg de LPS, e entre os $AIRmin^{SS}$ e $AIRmax^{RR}$, para a dose de 80 µg. (**Figura 4D**).

Os animais $AIRmax^{SS}$ quando desafiados com a dose de 20 µg mostraram cerca de 48 vezes mais *Ifng* quando comparados aos seus controles ($p<0,05$) e cerca de 2,8 vezes mais quando comparados aos animais $AIRmin^{RR}$ ($p<0,05$), nesta mesma dose os $AIRmax^{RR}$ também tiveram uma maior expressão gênica, sendo 6,6 vezes maior que os $AIRmin^{RR}$ ($p<0,05$). Quando

estimulados com 80 µg de LPS os animais AIRmax^{RR} mostraram uma expressão de *Ifng* superior, sendo 4,6 vezes maior que os AIRmin^{RR} ($p<0,05$) (**Figura 5A**).

A **Figura 5B** mostra a expressão da *Il12b* e observamos que os animais AIRmin^{RR} apresentaram maior expressão da citocina, diferenças significativas ($p<0,05$) foram observadas quando comparados aos AIRmax^{RR} quando estimulados com 20 e 80 µg de LPS.

Investigamos o perfil de expressão gênica de algumas moléculas envolvidas no choque endotóxico, como *Lbp* e *Cd14*.

A molécula *Lbp* foi pouco expressa, devido a este fato, não foram observadas diferenças significantes entre os grupos experimentais e os controles. (**Figura 5C**).

O receptor Cd14 também foi avaliado e verificamos um discreto aumento de expressão entre os animais portadores do alelo *R* do gene *Nramp1*. As diferenças foram encontradas somente entre grupos experimentais e seus respectivos controles (**Figura 5D**).

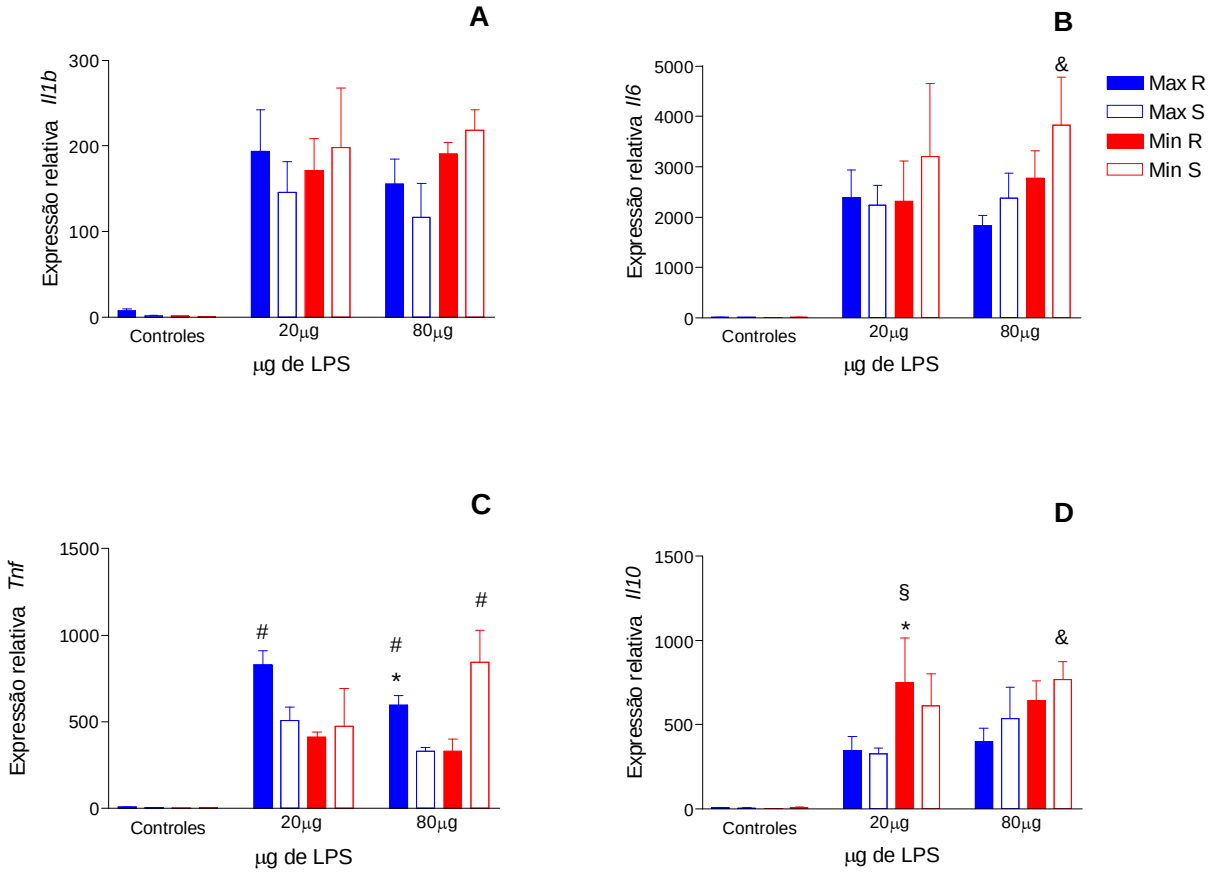

Figura 4: Quantificação da expressão gênica para **(A)** *Ilb*, **(B)** *Il6*, **(C)** *Tnf* e **(D)** *Il10* em células do fígado de animais AIRmax^{RR}, AIRmax^{SS}, AIRmin^{RR} e AIRmin^{SS} estimulados com 20 e 80 µg de LPS e em seus respectivos controles. Grupos de 4 animais de cada sublinhagem receberam as doses de LPS e foram sacrificados 40 min após o desafio, o mRNA foi extraído e transformado em cDNA, a expressão gênica foi determinada pela técnica de qPCR.

Todos os grupos experimentais apresentaram diferenças significativas ($p<0,05$) em relação aos respectivos controles.

* $p<0,05$ indica diferença significativa interlinhagens (AIRmax^{RR} vs AIRmin^{RR} e/ou AIRmax^{SS} vs AIRmin^{SS}).

\# $p<0,05$ indica diferença significativa intralinhagens (AIRmax^{RR} vs AIRmax^{SS} e/ou AIRmin^{RR} e AIRmin^{SS}).

§ $p<0,05$ indica diferença significativa entre AIRmin^{RR} vs AIRmax^{SS}.

& $p<0,05$ indica diferença significativa entre AIRmin^{SS} vs AIRmax^{RR}.

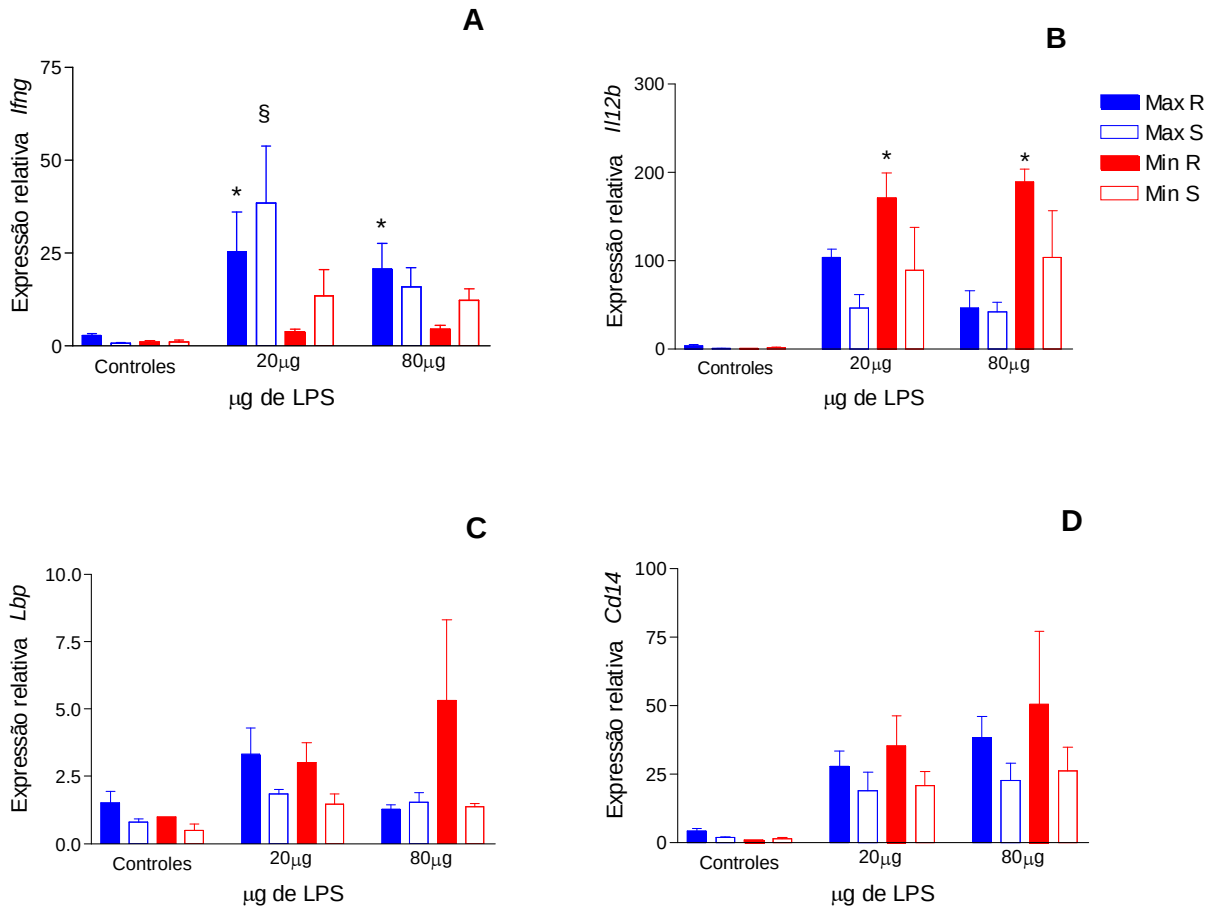

Figura 5: Quantificação da expressão gênica para **(A)** *Ifng*, **(B)** *Il12b*, **(C)** *Lbp* e **(D)** *Cd14* em células do fígado de animais AIRmax^{RR}, AIRmax^{SS}, AIRmin^{RR} e AIRmin^{SS} estimulados com 20 e 80 µg de LPS e em seus respectivos controles. Grupos de 4 animais de cada sublinhagem receberam as doses de LPS e foram sacrificados 40 min após o desafio, o mRNA foi extraído e transformado em cDNA, a expressão gênica foi determinada pela técnica de qPCR.

Todos os grupos experimentais apresentaram diferenças significativas ($p<0,05$) em relação aos respectivos controles, com excessão a **(C)** *Lbp*.

* $p<0,05$ indica diferença significativa interlinhagens (AIRmax^{RR} vs AIRmin^{RR} e/ou AIRmax^{SS} vs AIRmin^{SS}).

\# $p<0,05$ indica diferença significativa intralinhagens (AIRmax^{RR} vs AIRmax^{SS} e/ou AIRmin^{RR} e AIRmin^{SS}).

§ $p<0,05$ indica diferença significativa entre AIRmax^{SS} vs. AIRmin^{RR}

4.3 Quantificação da expressão de citocinas em células de medula óssea de camundongos tratados ou não com LPS por PCR em Tempo-Real (qPCR)

Analisamos a expressão quantitativa de genes de citocinas em células de medula óssea para avaliarmos o perfil de resposta das sublinhagens frente às duas doses de LPS utilizadas.

As citocinas *Il1b* e *Il*6 foram as que obtiveram maior expressão em todos os animais das sublinhagens estimulados tanto com 20 quanto com 80 µg de LPS. Diferenças inter ou intralinhagens não foram observadas, o que ocorreu somente quando os grupos experimentais foram comparados aos seus respectivos controles, contudo, deve-se ressaltar a sublinhagem AIRmax^{RR}, que em relação ao animais AIRmax^{SS} mostrou expressão aumentada em aproximadamente 2,0 vezes quando estimulada com 20 µg tanto para a expressão de *Il1b* quanto de *Il6*. (**Figura 6A e 6B**).

A sublinhagem AIRmax^{RR} quando inoculada com a dose de 20 µg de LPS mostrou uma expressão 2,0 vezes maior de *Tnf* do que os animais AIRmax^{SS} ($p<0,05$) e 1,4 vezes maior que os animais AIRmin^{RR} . Diferenças significantes ($p<0,05$) também foram observadas entre todos os grupos de animais experimentais e os seus controles (**Figura 6C**).

A **Figura 6D** mostra que os animais portadores do alelo *R* do gene *Nramp1* apresentam um aumento de expressão da citocina *Il10*, novamente a sublinhagem AIRmin^{RR} quando desafiada com 20 µg de LPS apresentou uma expressão cerca de 7,4 e 2,5 vezes maior do que os animais AIRmax^{SS} e os AIRmax^{RR} respectivamente ($p<0,05$). Os AIRmin^{RR}, para esta mesma dose, também expressaram cerca de 3,6 vezes mais *Il10* do que os AIRmin^{SS} ($p<0,05$) (**Figura 6D**).

A citocina *Ifng* também foi analisada, porém neste órgão, devido ao fato de ser pouco expressa, não foram vistas diferenças intra ou interlinhagens para os grupos experimentais ou mesmo quando comparados com os grupos controle (**Figura 7A**).

A **Figura 7B** mostra que o estímulo de 20 µg de LPS aumenta em cerca de 4 vezes a expressão de *Il12b* entre os animais AIRmax^{RR} quando comparados aos AIRmax^{SS} ($p<0,05$), sendo esta diferença também significante quando comparados os AIRmax^{RR} aos AIRmin^{RR}. A dose de 80 µg induz uma expressão 5 vezes maior da citocina nos AIRmax^{SS} em relação aos AIRmax^{RR}, ($p<0,05$).

A **Figura 7C** mostra a expressão da *Lbp* e semelhante ao observado nas células do fígado, não foram encontradas diferenças significantes entre os grupos experimentais e entre os controles.

O estímulo de 80 µg de LPS induziu uma tendência no aumento da expressão do receptor *Cd14* nos animais AIRmax^{RR} e AIRmin^{RR}. As diferenças foram encontradas entre os grupos experimentais e os seus respectivos controles (**Figura 7D**).

Verificamos também a expressão da *Casp 8* e do Receptor de IL-8 (*Il8rb*) que são genes presentes no cromossomo 1 e devido a sua localização (próxima ao *Nramp1*), podem ser considerados genes candidatos ao controle da intensidade da resposta inflamatória aguda e podem também estar envolvidos na sensibilidade dos animais ao LPS. A **figura 8A** mostra a expressão da *Casp 8* e que a sublinhagem AIRmax^{SS} quando inoculada com 80 µg apresentou um aumento de expressão de aproximadamente 3,7 vezes em relação aos animais AIRmin^{RR} ($p<0,05$).

Já a **figura 8B** mostra que independente do estímulo de LPS utilizado as 4 sublinhagens tiveram uma pequena expressão do *Il8rb*, sendo que os animais controles apresentaram uma expressão semelhante aos experimentais. Apenas uma diferença interlinhagens foi observada entre os animais AIRmax^{RR} que quando estimulados com 80 µg de LPS tiveram um aumento de expressão de 4 vezes quando comparados aos AIRmin^{RR} ($p<0,05$).

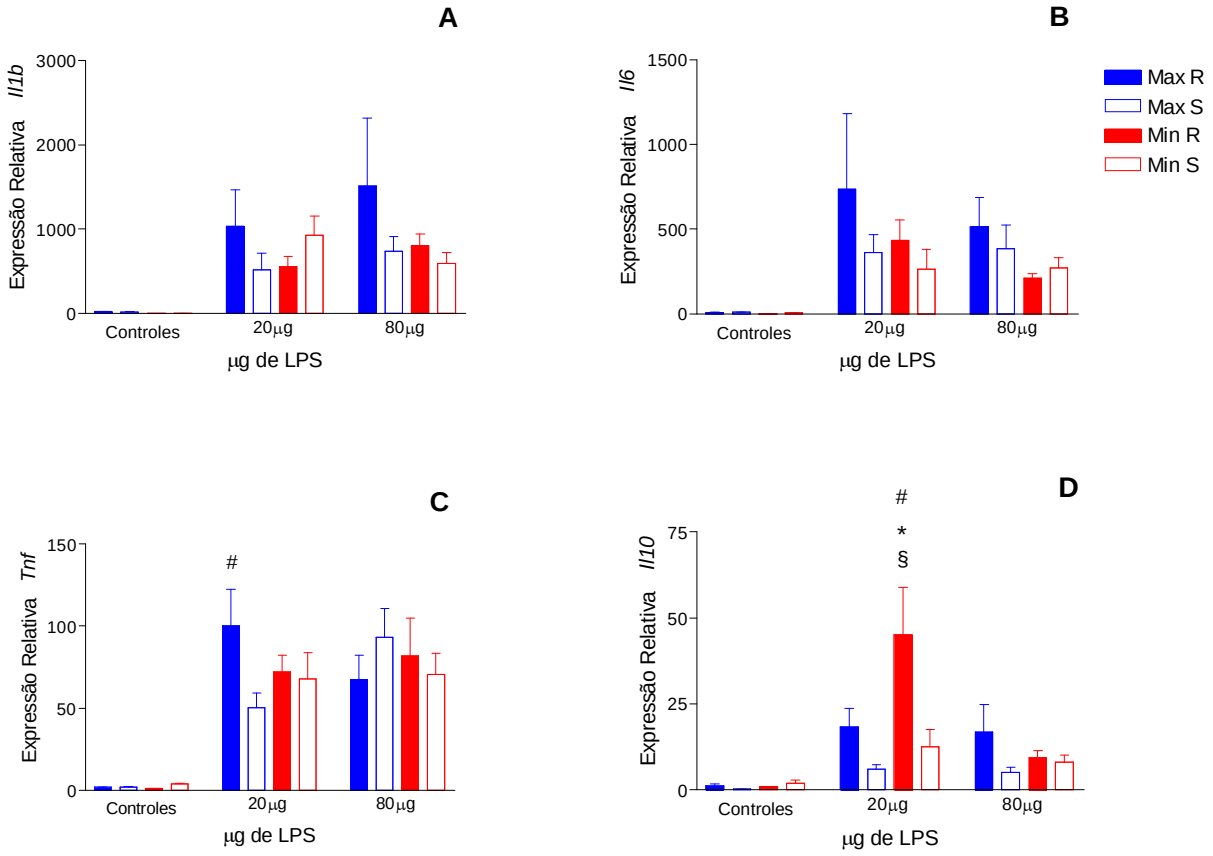

Figura 6: Quantificação da expressão gênica para **(A)** *Il1b*, **(B)** *Il6*, **(C)** *Tnf* e **(D)** *Il10* em células de medula óssea de animais AIRmax^{RR}, AIRmax^{SS}, AIRmin^{RR} e AIRmin^{SS} estimulados com 20 e 80 µg de LPS e em seus respectivos controles. Grupos de 4 animais de cada sublinhagem receberam as doses de LPS e foram sacrificados 40 min após o desafio, o mRNA foi extraído e transformado em cDNA, a expressão gênica foi determinada pela técnica de qPCR.

Todos os grupos experimentais apresentaram diferenças significativas ($p<0,05$) em relação aos respectivos controles.

* $p<0,05$ indica diferença significativa interlinhagens (AIRmax^{RR} vs AIRmin^{RR} e/ou AIRmax^{SS} vs AIRmin^{SS}).

\# $p<0,05$ indica diferença significativa intralinhagens (AIRmax^{RR} vs AIRmax^{SS} e/ou AIRmin^{RR} e AIRmin^{SS}).

§ $p<0,05$ indica diferença significativa entre AIRmin^{RR} vs AIRmax^{SS}.

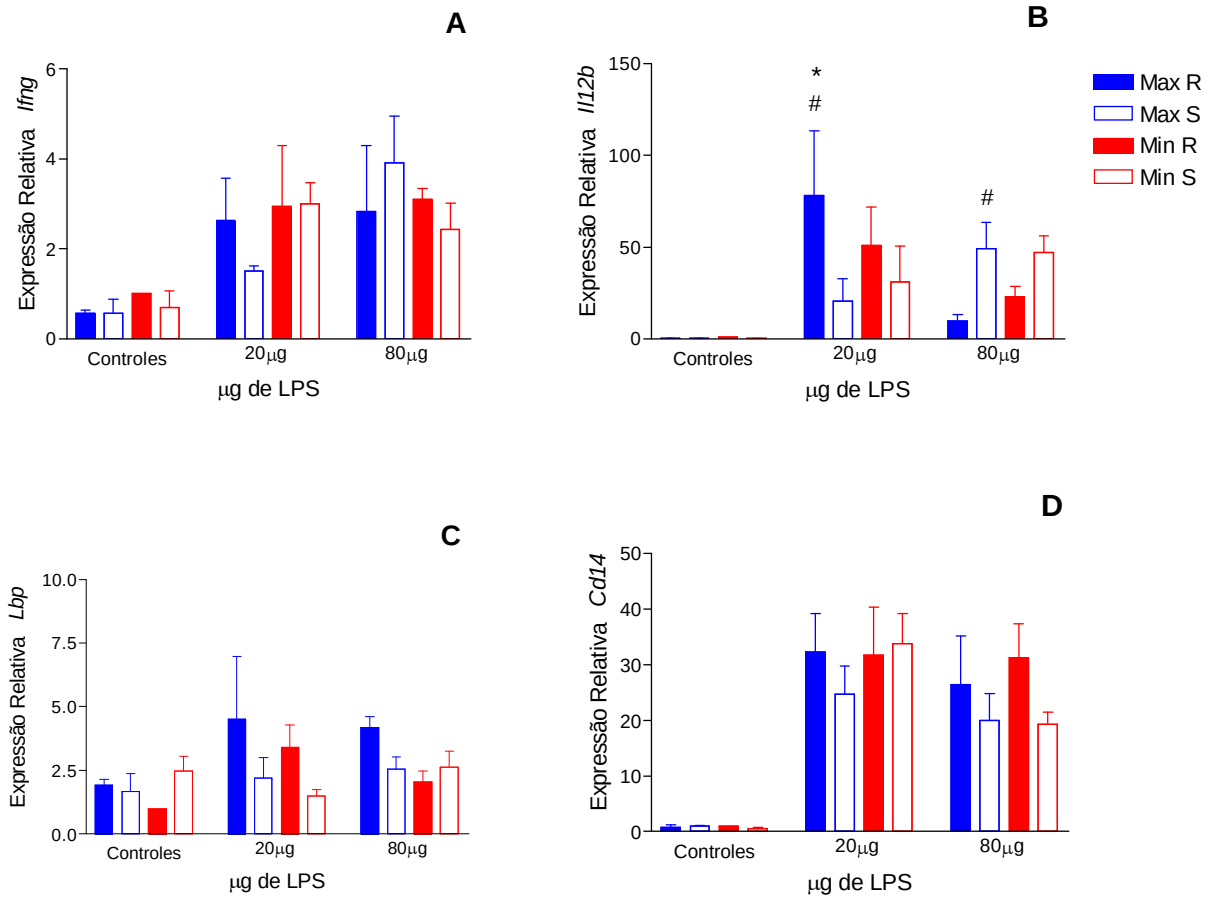

Figura 7: Quantificação da expressão gênica para **(A)** *Ifng*, **(B)** *Il12b*, **(C)** *Lbp* e **(D)** *Cd14* em células de medula óssea de animais AIRmax^{RR}, AIRmax^{SS}, AIRmin^{RR} e AIRmin^{SS} estimulados com 20 e 80 µg de LPS e em seus respectivos controles. Grupos de 4 animais de cada sublinhagem receberam as doses de LPS e foram sacrificados 40 min após o desafio, o mRNA foi extraído e transformado em cDNA, a expressão gênica foi determinada pela técnica de qPCR.

Todos os grupos experimentais apresentaram diferenças significativas ($p<0,05$) em relação aos respectivos controles, com exceção a **(A)** *Ifng* e **(C)** *Lbp*.

* $p<0,05$ indica diferença significativa interlinhagens (AIRmax^{RR} vs AIRmin^{RR} e/ou AIRmax^{SS} vs AIRmin^{SS}).

\# $p<0,05$ indica diferença significativa intralinhagens (AIRmax^{RR} vs AIRmax^{SS} e/ou AIRmin^{RR} e AIRmin^{SS}).

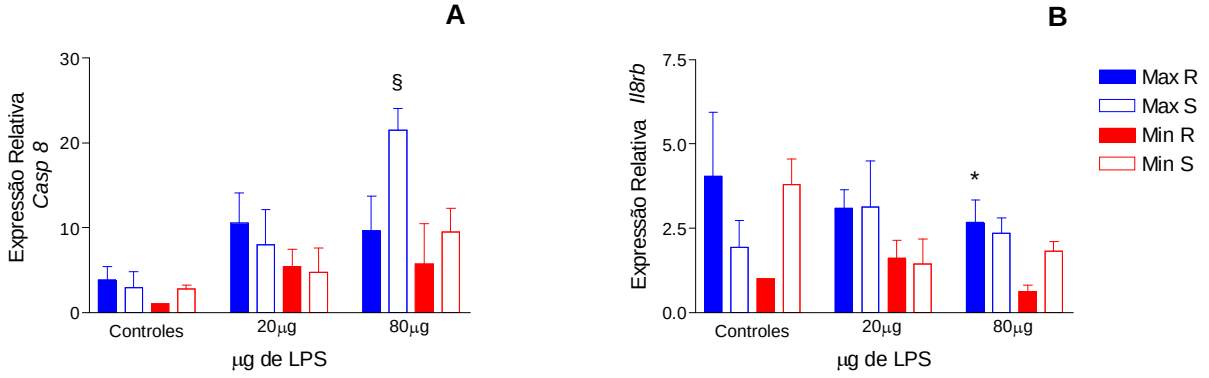

Figura 8: Quantificação da expressão gênica para **(A)** *Casp 8* e **(B)** *Il8rb* em células de medula óssea de animais AIRmax^{RR}, AIRmax^{SS}, AIRmin^{RR} e AIRmin^{SS} estimulados com 20 e 80 µg de LPS e em seus respectivos controles. Grupos de 4 animais de cada sublinhagem receberam as doses de LPS e foram sacrificados 40 min após o desafio, o mRNA foi extraído e transformado em cDNA, a expressão gênica foi determinada pela técnica de qPCR.
* $p<0,05$ indica diferença significativa interlinhagens (AIRmax^{RR} vs AIRmin^{RR} e AIRmax^{SS} vs AIRmin^{SS}).
§ $p<0,05$ indica diferença significativa entre AIRmax^{SS} vs. AIRmin^{RR}

4.4 Avaliação do perfil de citocinas na circulação após tratamento com LPS

Com o objetivo de quantificarmos algumas citocinas séricas pró e anti inflamatórias produzidas mediante o estímulo com LPS, os animais receberam duas diferentes doses da endotoxina bacteriana.

Na **Figura 9** estão representados os níveis das dosagens de IL-6, TNF-α, IL-10 e IL-12p40 encontrados nos soros dos animais AIRmax^{RR}, AIRmax^{SS}, AIRmin^{RR} e AIRmin^{SS} 90 minutos após a injeção 20 ou 80 µg de LPS e seus respectivos controles.

As curvas das concentrações dos recombinantes foram estabelecidas por regressão linear dos mínimos quadrados dos valores de DO obtidos, conforme apresentado na **Figura 1** (veja material e métodos). A sensibilidade dos ensaios foi de: 156,30 pg/ml para o TNFα, 312,50 pg/ml para a IL-1β, 312,0 pg/ml para a IL-6, 312,0 pg/ml para o IFN-γ e 97,65 para a IL-12p40. Os dados apresentados mostram os valores obtidos da média e desvio padrão de 4 animais (individuais) de cada sublinhagem estimulados ou não com cada uma das duas doses de LPS utilizadas. Deve-se ressaltar que os animais controle não apresentaram quantidades detectáveis das citocinas analisadas.

A **Figura 9A** mostra que para o estímulo de 20 μg todas as sublinhagens tiveram uma produção muito similar de IL-6 (≅ 100 ηg/ml), já a maior dose (80 μg) mostrou que os animais portadores do alelo *R* do gene *Nramp1* produzem mais IL-6, principalmente os AIRmax^{RR} sendo uma diferença significante quando comparados aos AIRmax^{SS} e aos AIRmin^{RR}. Os animais AIRmin^{RR} também produzem mais IL-6 que os AIRmin^{SS} ($p<0,05$).

A sublinhagem AIRmax^{RR} quando estimulada com a dose de 20 μg apresentou uma maior produção de TNF-α (≅ 200 ηg/ml), seguido pelos AIRmax^{SS} (com ≅ 120 ηg/ml). Diferença significante ($p<0,05$) foi encontrada quando comparados os AIRmax^{RR} aos AIRmin^{SS}. Para a dose mais alta, os animais AIRmax^{SS} produziram mais IL-6 (≅ 250 ηg/ml), sendo significante quando comparados as demais sublinhagens, AIRmax^{RR}, AIRmin^{RR} e AIRmin^{SS} (**Figura 9B**).

A **Figura 9C** mostra também a produção de IL-10, e a sublinhagem AIRmin^{SS} quando desafiada com a dose de 20 μg apresentou uma tendência à maior produção da citocina (≅ 5 ηg/ml). O estímulo de 80 μg fez com que a sublinhagem AIRmax^{RR} produzisse ≅ 6,5 ηg/ml e os animais AIRmax^{SS} e AIRmin^{RR} ≅ 4,8 ηg/ml.

A produção de IL-12p40 só pode ser observada quando os animais foram estimulados com a maior dose de LPS (80 μg), visto que para a dose inferior (20 μg) a produção foi abaixo do limite de sensibilidade do teste (97,65 pg/ml). Desta forma, os animais AIRmax^{RR} produziram maiores quantidades da citocina (≅ 20 ηg/ml), porém devido ao alto desvio padrão esta diferença não foi significante. As demais sublinhagens produziram quantidades similares da citocina (≅ de 4 a 5 ηg/ml) (**Figura 9D**).

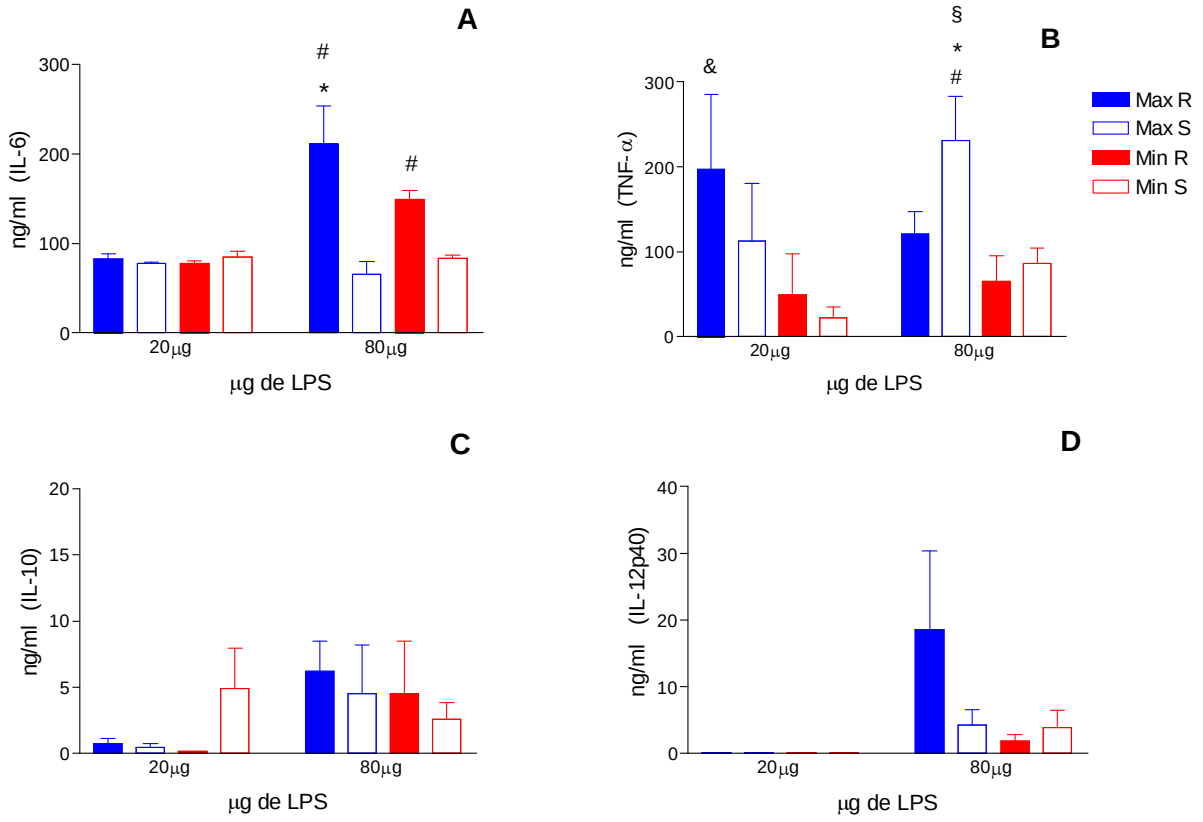

Figura 9: Quantificação da expressão sérica para **(A)** IL-6, **(B)** TNF-α, **(C)** IL-10, **(D)** IL-12p40 no soro de animais AIRmax^{RR}, AIRmax^{SS}, AIRmin^{RR} e AIRmin^{SS} estimulados com 20 e 80 μg de LPS e em seus respectivos controles. Grupos de 4 animais de cada sublinhagem receberam a injeção i.v. das doses de LPS acima citadas e após 90 minutos o soro foi coletado e quantificado pela técnica de ELISA.

Os grupos controle não apresentaram quantidades detectáveis das citocinas analisadas.

* $p<0,05$ indica diferença significativa interlinhagens (AIRmax^{RR} vs AIRmin^{RR} e AIRmax^{SS} vs AIRmin^{SS}).

# $p<0,05$ indica diferença significativa intralinhagens (AIRmax^{RR} vs AIRmax^{SS} e AIRmin^{RR} e AIRmin^{SS}).

§ $p<0,05$ indica diferença significativa entre AIRmax^{SS} vs. AIRmin^{RR}

& $p<0,05$ indica diferença significativa entre AIRmax^{RR} vs AIRmin^{SS}.

4.5 Análise da expressão gênica global por ensaio de *Microarray*

Para a análise da expressão gênica global utilizamos um pool do RNA obtido de células de medula óssea de 4 animais de cada sublinhagem AIRmax^{RR}, AIRmax^{SS}, AIRmin^{RR} e AIRmin^{SS} que foram estimulados com 20 µg de LPS e sacrificados 40 minutos após o desafio, e os seus respectivos controles.

A **Tabela 5** mostra a validação de alguns genes do *microarray* através do qPCR.. Para esta análise foram escolhidos alguns genes já utilizados em experimentos anteriores e estes foram analisados juntamente com os seus controles. A mesma **Tabela 5** mostra que os valores das correlações individuais foram muito satisfatórios, atestando a sensibilidade e eficiência da técnica utilizada.

TABELA 5: Correlações entre as expressões gênicas obtidas através das técnicas de *microarray* e qPCR em células de medula óssea de animais estimulados com LPS.

Correlação de Pearson	
Tnf	0,92
Il1b	0,85
Il6	0,98
Il12b	0,75
Il10	0,85

- Experimento realizado em pools RNA de células de medula óssea de 4 animais de cada uma das sublinhagens estimulados ou não com 20µg de LPS e seus respectivos controles.

A **figura 10** mostra o número de genes ativados e reprimidos em células da medula óssea dos animais AIRmax^{RR}, AIRmax^{SS}, AIRmin^{RR} e AIRmin^{SS} estimulados com 20 µg de LPS. Podemos observar que após o desafio, os animais AIRmax^{RR} apresentaram 161 genes ativados e 195 genes reprimidos, enquanto que os AIRmax^{SS} mostraram 138 genes ativados e apenas 48 genes reprimidos. A sublinhagem AIRmin^{RR} mostrou uma ativação de 210 genes e uma repressão de 147 genes, e por fim os AIRmin^{SS} que apresentaram um perfil de expressão gênica bastante alterado com 733 genes ativados e 955 genes reprimidos.

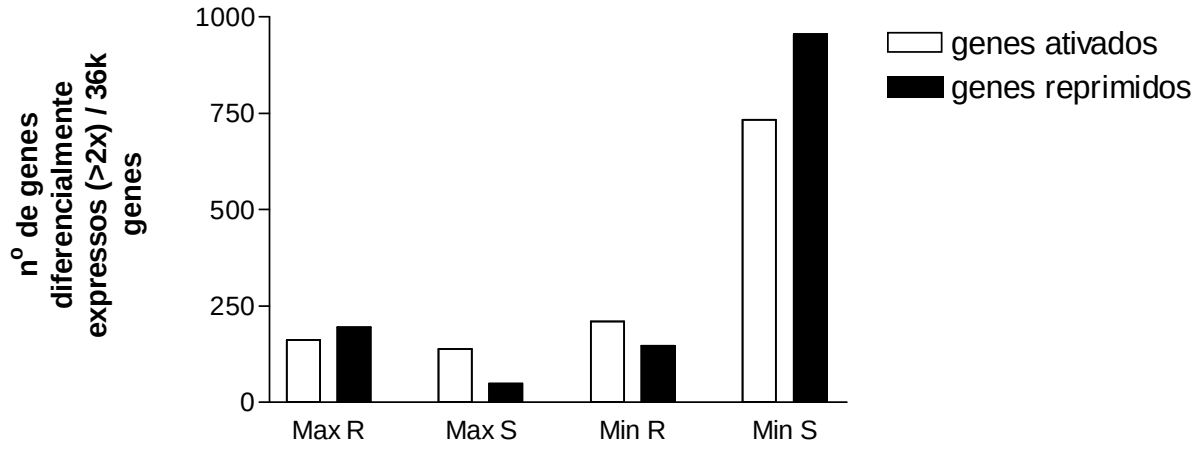

Figura 10: Número de genes ativados e reprimidos em células de medula óssea de animais AIRmax^{RR}, AIRmax^{SS}, AIRmin^{RR} e AIRmin^{SS} estimulados com LPS. O RNA foi obtido de um pool de células de 4 animais de cada sublinhagem desafiados com 20 µg de LPS e seus respectivos controles.

O próximo passo foi analisarmos a expressão gênica global de algumas citocinas pro e anti inflamatórias e também de algumas moléculas envolvidas no reconhecimento e ação do LPS nas células.

A **figura 11A** mostra a expressão do *Tnf* e *Il1b* e observamos que similar aos resultados já obtidos, os AIRmin^{SS} mostram uma expressão menor de *Tnf* do que as demais sublinhagens e a *Il1b* é expressa por todos os animais experimentais e em menor quantidade pelos animais controle, resultado este já observado nos demais experimentos de expressão gênica realizados em células do fígado e de medula óssea dos animais AIRmax^{RR} e AIRmax^{SS} que também sem estimulo já apresentam uma expressão maior desta citocina (**Figuras 4A** e **6A**).

A **figura 11B** mostra a expressão da *Il6* e também confirmando os experimentos anteriores, todos os animais das sublinhagens estimulados com LPS expressaram a citocina. Para a *Il10* também observamos que os animais portadores do alelo *R* do gene *Nramp1* expressaram mais a citocina, sendo que o para os animais AIRmin^{RR} a diferença foi de aproximadamente 2 vezes superior aos AIRmax^{RR}.

A **figura 11C** mostra a expressão da molécula ligadora do LPS, a *Lbp* e vimos os animais controle tiveram uma expressão gênica muito semelhante aos animais estimulados com o LPS, no

entanto, deve-se ressaltar que a sublinhagem AIRmin^{SS} mostrou uma repressão deste gene (de aproximadamente 8 vezes) em relação ao seu controle.

Já na **figura 11D** podemos observar a expressão do *Ly96* ou *MD-2* e que mediante o estimulo de LPS utilizado não sofreu alteração significativa nas quatro sublinhagens com relação aos seus respectivos animais controle. A mesma **figura 10D** mostra que os animais AIRmax^{RR}, AIRmax^{SS} e AIRmin^{RR} apresentaram uma ativação do gene *Myd88* e que a somente a sublinhagem AIRmin^{SS} teve uma repressão gênica.

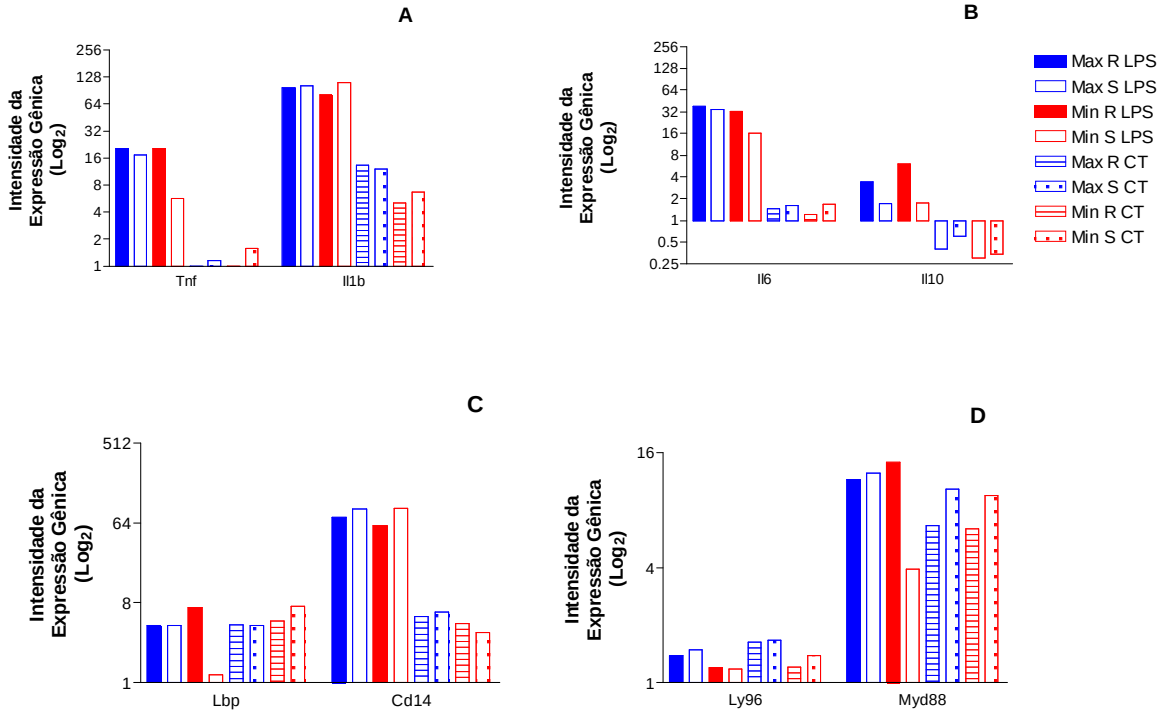

Figura 11: Análise da expressão gênica global de: **(A)** *Tnf* e *Il1b*, **(B)** *Il6* e *Il10*, **(C)** *Lbp* e *Cd14* e **(D)** *Ly96* e *Myd88* em células de medula óssea de animais AIRmax^{RR}, AIRmax^{SS}, AIRmin^{RR} e AIRmin^{SS} estimulados com. LPS. O RNA foi obtido de um pool de células de 4 animais de cada sublinhagem desafiados com 20 µg de LPS e seus respectivos controles. O mRNA das amostras passou por um processo de transcrição reversa e foi posteriormente marcado com o fluoróforo. Apos a hibridização a fluorescência foi medida e a intensidade do sinal foi normalizada e os dados avaliados pelo software de análise *CodeLink expression*.

Na tentativa de caracterizar quais genes estariam envolvidos na sensibilidade e ou resistência das sublinhagens ao LPS, estudamos alguns diferencialmente expressos entre os animais.

A **figura 12A** mostra a expressão de alguns receptores *Toll*, ao observarrmos o *Tlr4*, diretamente envolvido na resposta e sinalização do LPS, vimos que praticamente não há uma expressão significativa deste gene para todos os animais das sublinhagens, bem como os seus controles. Já a expressão do *Tlr1* é observada nas sublinhagens AIRmax^{RR} e AIRmax^{SS} e em seus respectivos controles (valores praticamente idênticos), e superiores aos dos animais AIRmin^{RR} e AIRmin^{SS}. O *Tlr2* mostra-se ativado nas quatro sublinhagens sendo aproximadamente 4 vezes superior aos animais não estimulados pelo LPS.

A **figura 12B** mostra a expressão dos genes *Cxcl*1, *Cxcl2* e o *Cxcl10*, envolvidos na migração de neutrófilos. Todos os animais mostraram uma ativação superior a 30 vezes quando comparado aos animais controle.

A proteína amiloide do soro (*Saa3*) também foi analisada e todos os animais apresentaram a ativação do gene (**Figura 12C**).

A mesma **figura 12C** mostra a expressão do receptor associado ao *Tnf*, o *Traf1* e de um ligante do *Tnf*, o *Tnfsf9*. Observamos que as sublinhagens apresentaram uma ativação do gene *Traf1*, sendo aproximadamente 4 vezes superior aos animais controle. Já a expressão do gene *Tnfsf9* também foi 4 vezes superior nos animais AIRmax^{RR} e AIRmin^{RR} em relação aos AIRmax^{SS} e AIRmin^{SS} respectivamente. Não se observou a expressão deste gene nos animais controle.

A **figura 12D** mostra a expressão de alguns genes presentes no cromossomo 1. A enzima isocitrato dehidrogenase 1 (NADP+) solúvel, *Idh1*, foi analisada e os animais controle apresentaram uma maior expressão do gene do que os animais experimentais, interessante ressaltar que a sublinhagem AIRmin^{SS} mostrou uma maior repressão gênica que os AIRmax^{RR}.e os AIRmax^{SS}.

A expressão do *Ifi205*, gene 205 ativado pelo interferon, foi observada, os animais AIRmin^{RR} e AIRmin^{SS} estimulados com LPS apresentaram uma repressão do gene, o que ocorreu também nos seus respectivos controles, a maior expressão foi observada entre os animais AIRmax^{RR} não desafiados com LPS (**Figura 12D**).

A mesma **figura 12D** mostra a expressão do *Marco*, receptor de macrófagos com estrutura de colágeno, e verificamos que os animais AIRmax^{RR} e AIRmax^{SS} apresentaram uma ativação do gene cerca de 2 vezes superior aos AIRmin^{SS}.

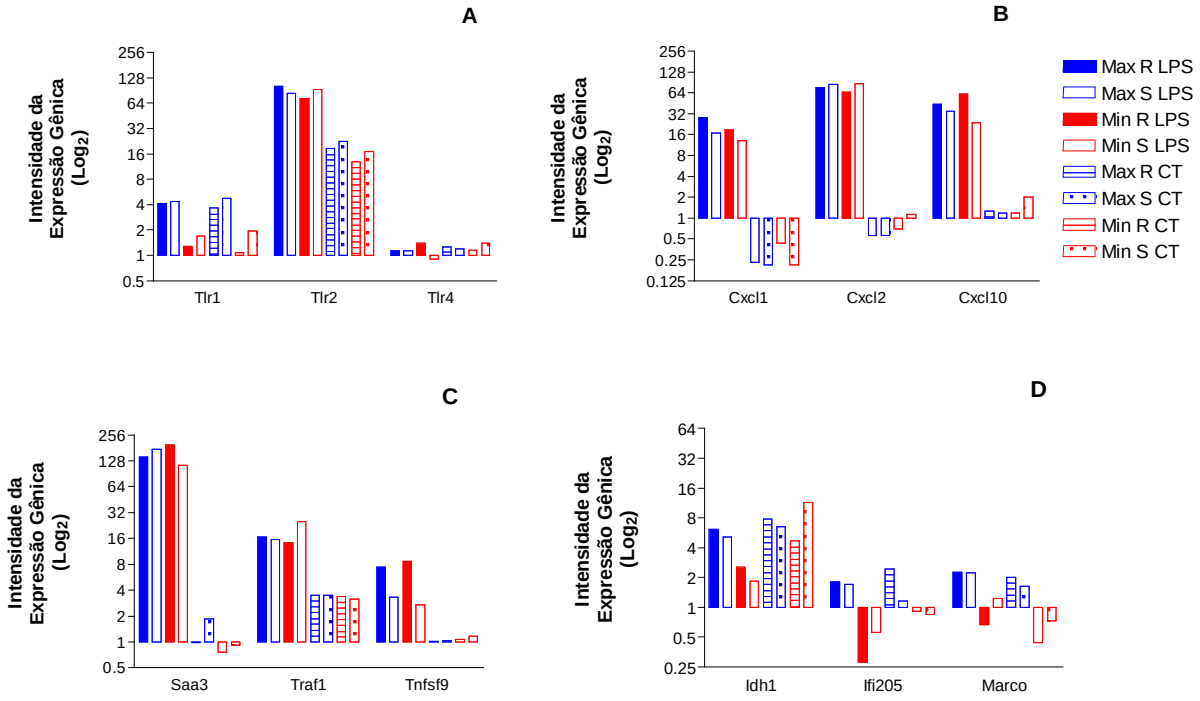

Figura 12: Análise da expressão gênica global de: **(A)** *Tlr1*, *Tlr2* e *Tlr4*, **(B)** *Cxcl1*, *Cxcl2 e Cxcl10*, **(C)** *Saa3*, *Traf1* e *Tnfsf9* e **(D)** *Idh1*, *Ifi205* e *Marco* em células de medula óssea de animais AIRmax^{RR}, AIRmax^{SS}, AIRmin^{RR} e AIRmin^{SS} estimulados com LPS. O RNA foi obtido de um pool de células de 4 animais de cada sublinhagem desafiados com 20 µg de LPS e seus respectivos controles. O mRNA das amostras passou por um processo de transcrição reversa e foi posteriormente marcado com o fluoróforo. Apos a hibridização a fluorescência foi medida e a intensidade do sinal foi normalizada e os dados avaliados pelo software de análise *CodeLink expression.*

5 DISCUSSÃO

Foi demonstrado que animais selecionados para a máxima (AIRmax) ou mínima (AIRmin) reação inflamatória aguda homozigotos para os alelos *R* e *S* do gene *Nramp1* denominados AIRmax^{RR}, AIRmax^{SS}, AIRmin^{RR}, e AIRmin^{SS} apresentam diferença de sensibilidade à infecção por S. Typhimurium e à sua endotoxina, o LPS (BORREGO *et al.*, 2006). Os animais AIRmax^{RR} embora extremamente resistentes à infecção são os mais sensíveis aos efeitos do LPS e os animais AIRmin^{SS} mais susceptíveis à infecção bacteriana são os mais resistentes ao choque endotóxico, apresentando DL_{50} de 326,0 µg.

Foi investigado também o envolvimento de QTL reguladores da resposta inflamatória aguda modulando a sensibilidade à infecção por S. Typhimurium. Estes QTL possivelmente atuariam como modificadores da expressão do gene *Nramp1*. Além disso, a interação dos alelos deste gene com os QTL envolvidos na inflamação modulam a sensibilidade aos efeitos do LPS e a resposta inflamatória aguda, indicando o gene *Nramp1* como forte canditado a ser um dos genes reguladores destes complexos fenótipos.

Nosso objetivo com o presente trabalho foi estudarmos a interação de QTL reguladores da intensidade da resposta inflamatória aguda na determinação da sensibilidade ou resistência ao choque endotóxico induzido pelo LPS.

Para isso estudamos nos animais AIRmax^{RR}, AIRmax^{SS}, AIRmin^{RR} e AIRmin^{SS} mediante o desafio com diferentes doses de LPS, a expressão de genes e a produção de algumas citocinas e moléculas envolvidas no choque séptico, para a identificação de possíveis mecanismos genéticos e celulares envolvidos na sensibilidade ou resistência ao choque endotóxico.

Iniciamos o nosso estudo com a verificação do fundo genético dos animais das sublinhagens homozigotas para os alelos *R* e *S* do gene *Nramp1*.

O rastreamento do genoma dos camundongos das linhagens AIRmax e AIRmin parentais, já realizado em nosso laboratório, mostrou diferentes microssatélites polimórficos interlinhagens informativos no cromossomo 1, muitos localizados próximos a regiões que contém genes envolvidos na susceptibilidade a infecções por *S*. Typhimurium.

A identificação de polimorfismos realizada no cromossomo 1 teve como o objetivo comparar a frequência dos alelos para cada microssatélite, nos animais parentais da Seleção de Inflamação (AIRmax e AIRmin) com os animais das sublinhagens AIRmax^{RR}, AIRmax^{SS},

AIRmin^{RR} e AIRmin^{SS} e verificar se ocorreram mudanças no fundo genético destes animais além do gene *Nramp1*.

Resultados anteriores demonstraram valores sugestivos de co-segregação dos alelos do gene *Nramp1* com o fenótipo de infiltrado celular, estimando que esta região cromossômica seria responsável por 6% da variação fenotípica total (BORREGO, 2003), e de que a presença destes alelos em homozigose modularia o influxo de neutrófilos para o local do agente inflamatório Biogel, com o alelo *R* determinando um maior infiltrado em relação ao alelo *S*. (BORREGO *et al.*, 2006).

Além disso, a interação dos alelos do gene *Nramp1* com os QTL de inflamação modulou a resistência natural à infecção por *Salmonella* Typhimurium e a sensibilidade aos efeitos tóxicos do LPS (BORREGO *et al.*, 2006), e o desenvolvimento de artrite experimental induzida por pristane (PETERS *et al.*, 2007).

As regiões em comum obtidas pela análise intra e interlinhagem permitiram que fosse estimado um intervalo de confiança (IC) para o cromossomo 1, que delimitou uma região cromossômica de aproximadamente 5 cM ao redor do gene *Nramp1*.

Na análise de polimorfismos nas sublinhagens AIRmax^{RR}, AIRmax^{SS}, AIRmin^{RR} e AIRmin^{SS} observamos poucas mudanças no fundo genético destes animais, com exceção do gene da *Casp 8*, que nos animais da Seleção de Inflamação (AIRmax e AIRmin), mostrou uma fixação preferencial do alelo "**a**" nos AIRmax e do alelo "**b**" para os AIRmin, sendo esperado nas sublinhagens uma maior freqüência do alelo "**a**" nos animais AIRmax^{RR} e AIRmax^{SS}, e do alelo "**b**" nos AIRmin^{RR} e AIRmin^{SS}.

Entretanto, os AIRmin^{SS} mostram a fixação do alelo "**a**" do gene da *Casp 8*, que poderia ser explicado pela diminuição na variabilidade genética devido ao pequeno número de famílias obtidas para a realização dos acasalamentos assistidos por genotipagem ou pela ocorrência de eventos de recombinação que estariam favorecendo a fixação de alelos que não são tão frequentes nesta população. Estudos realizados com algumas espécies de moscas demonstraram que quando o tamanho da população é reduzido em pelo menos uma geração, pode ocorrer uma diminuição da frequência de um determinado gene da mesma, efeito chamado de *botlleneck*, o que pode ocasionar, com o passar das gerações, a uma perda da variabilidade genética da espécie (BRYANT *et al.*, 1986).

Uma outra explicação seria a geração da Seleção de Inflamação avaliada, ou seja, as freqüências alélicas identificadas neste trabalho são da geração F37 de seleção, enquanto que as sublinhagens foram iniciadas a partir da geração F29, e nesta geração os animais AIRmin já poderiam ter uma freqüência maior do alelo "**a**" da *Casp 8* em relação a geração F37.

Observamos também que o gene da *Casp 8* não teve uma maior interferência no fenótipo da resposta inflamatória nos animais das sublinhagens, uma vez que os AIRmin^{RR} apresentam um maior infiltrado celular do que os AIRmin^{SS} (BORREGO *et al.*, 2006).

O sistema imune é didaticamente dividido em imunidade inata (não específica) e imunidade adaptativa (ou específica), a sua maior função é conferir resistência a vários processos patológicos, como por exemplo, as infecções bacterianas (PARKER e PICUT, 2005).

O fígado é um órgão que apresenta várias funções tanto na imunidade inata quanto na imunidade adaptativa, além de desenvolver uma importante função fisiológica na remoção do LPS do organismo (JIRILLO *et al*., 2002; PARKER e PICUT, 2005). Seu envolvimento na imunidade inata está na produção de proteínas de fase aguda, e na fagocitose. Já na imunidade adaptativa, participa da deleção de células T ativadas, indução de tolerância a antígenos próprios ou ingeridos e proliferação de células T extra-tímicas (PARKER e PICUT, 2005).

O fígado apresenta características de um órgão hematopoético e imunocompetente, pois mesmo após o nascimento ele pode produzir todas as linhagens de leucócitos de *stem cells* hematopoéticas residentes (SEKI *et al*., 1998, SEKI *et al*., 2000). Sua organização estrutural tem sérias implicações para a sua função imune. O suprimento sangüíneo do fígado depende de um sistema convencional de artérias vindas da aorta abdominal e dois outros sistemas venosos, sendo um menor do plexo arterial dentro do trato portal e um sistema maior vindo do baço (RACANELLI e REHERMANN, 2006). Cerca de 30% de todo o sangue do organismo passa pelo fígado a cada minuto (SETH e BANKEY, 2001). O sangue entra no parênquima hepático principalmente por vasos portais terminais e então passa através de uma rede de sinusóides hepáticos até alcançar a veia hepática central. Devido ao pequeno diâmetro dos sinusóides, aumentos mínimos na pressão venosa sistêmica e perturbações no fluxo sinusoidal, resultam em estase, que favorece o aumento do contato entre os linfócitos, leucócitos e as células apresentadoras de antígeno (APC), promovendo o extravazamento celular (RACANELLI e REHERMANN, 2006).

Os sinusóides hepáticos são conhecidos por conterem populações celulares residentes: as células endoteliais, os macrófagos, conhecidos como células de Kupffer, as células *natural killer* (NK) específicas do fígado, linfócitos T, as células de acúmulo de gordura e as células dendríticas (PARKER e PICUT, 2005; RACANELLI e REHERMANN, 2006).

Os antígenos bacterianos incluindo o LPS são continuamente trazidos do intestino para o fígado via veia portal, e ambos ativam e induzem a proliferação das células de Kupffer, células NK e células T $NK1^{+}$ (SEKI *et al.;* 2000).

As células de Kupffer residem dentro do lúmen do sinusóide hepático, aderentes as células endoteliais que compõem a parede dos vasos sanguíneos, constituem a primeira população de macrófagos do organismo a entrar em contato com bactérias, endotoxinas bacterianas e microorganismos derivados do trato gastrointestinal. Juntamente com as células NK, células dendríticas e componentes solúveis como fatores do sistema complemento e proteínas de fase aguda, as células de Kupffer representam um importante componente da imunidade inata e representam cerca de 80 a 90% dos macrófagos teciduais presentes no corpo, sugerindo a função central do fígado na defesa do organismo (BILZER *et al*., 2006).

Desta forma, iniciamos o nosso estudo através da avaliação do estímulo causado pelo LPS em células do fígado.

Baseamo-nos no protocolo descrito por GREWE *et al.*, 1993 e LUSTER *et al.*, 1993, em que a transcrição de mRNA de algumas citocinas é iniciada 40 minutos após o estímulo com LPS.

Nosso objetivo inicial era obter uma curva de dose-resposta, (em experimentos anteriores, utilizamos doses seriadas que variavam de 10 a 320 µg de LPS) que nos permitisse avaliar o perfil de expressão e produção das diferentes citocinas nas quatro sublinhagens. Com base nestes resultados poderíamos então definir para cada citocina a dose que melhor diferenciasse a resposta interlinhagens. Para todas as doses analisadas não encontramos uma diferença expressiva na expressão e produção das citocinas, desta forma, decidimos escolher 2 doses que pudessem ficar próximas das DL_{50} das sublinhagens e tentar traçar esta correlação.

A análise do mRNA de citocinas pró e anti inflamatórias através da técnica de qPCR mostrou que mediante o estímulo do LPS (20 ou 80 µg) ocorre uma grande variação de expressão gênica, sendo esta, significante para a maior parte das citocinas analisadas quando comparada aos animais controle (sem estímulo). Diferenças entre as sublinhagens também foram encontradas

mediante as 2 doses utilizadas para a expressão de *Tnf*, *Il12b*, *Il10*, *Il6* e *Ifng*, evidenciando a provàvel participação dos fagócitos na resistência ou sensibilidade das sublinhagens ao LPS. Para as demais citocinas, mesmo aquelas com níveis de expressão mais altos, não houve uma diferença significativa entre os animais.

A utilização desta técnica serve para evidenciar outros mecanismos (que podem ser pós-transcripcionais) envolvidos na sensibilidade ou resistência ao choque endotóxico, visto que dos genes alvo estudados, nem todas as proteínas foram detectadas pela técnica de ELISA.

Pudemos observar em nossos resultados um aumento da expressão de *Tnf* nos animais AIRmax^{RR} quando já estimulados com a dose de 20 µg de LPS, resultado muito coerente com os também encontrados em células de medula óssea e na detecção da proteína através do ELISA. Deve-se ressaltar que esta é a sublinhagem mais sensível aos efeitos do LPS (DL_{50} 22,8 µg).

Segundo LUSTER *et al.*, 1993, GREWE *et al.*, 1993 e VAN AMERSFOORT *et al.*, 2003, após a exposição ao LPS, o TNF-α é uma das primeiras e principais citocinas liberadas por macrófagos. O mRNA do *Tnf* é constitutivamente transcrito nas células de Kupffer, seguido pela sua rápida liberação após um desafio inflamatório. As citocinas *Il1* e *Il6* não são expressas constitutivamente, porém os seus mRNAs, bem como o do *Tnf*, são imediatamente transcritos após o estímulo com o LPS e níveis máximos são encontrados em macrófagos do fígado 40 minutos após o desafio.

Em resposta a uma injúria tecidual, infecção ou estímulo inflamatório a IL-6 é liberada por diferentes populações celulares, como os monócitos/macrófagos, células T, células B, células endoteliais, células da musculatura lisa e fibroblastos (KNOLLE *et al.*, 1996). A produção da citocina é importante para a indução da resposta de fase aguda no fígado. Em modelos animais de endotoxemia, as células endoteliais sinusoidais, assim como as células de Kupffer são produtoras de IL-6 (BILIAR *et al.*, 1992; KNOLLE *et al.*, 1997).

Em nossos experimentos observamos que a *Il6* foi a citocina mais expressa no fígado e que aparentemente não há uma diferença entre os animais para a dose de 20µg de LPS, porém uma maior expressão da citocina nos animais de mínima resposta inflamatória, principalmente nos AIRmin^{SS} estimulados com 80µg foi observada (**Figura 4B**). É descrito que em camundongos desafiados com LPS, a IL-1β e o TNF-α atuam simultaneamente para aumentar a produção de IL-6 (SHALABY *et al.*, 1989). Estes dados corroboram nossos resultados, pois embora nesta etapa do trabalho apenas observamos a expressão gênica das citocinas no fígado,

constatamos que tanto a *Il1* quanto o *Tnf* também foram expressos em todos os animais das sublinhagens (**Figuras 4A** e **4C**).

A IL-12 é produzida por macrófagos e outras células apresentadoras de antígenos (APCs) através da ligação ao receptor CD40 ou em resposta a bactérias, LPS ou produtos microbianos (CELIA *et al.,* 1996; SKEEN *et al.;* 1996). Devido a sua capacidade em induzir a produção de IFN-γ pelas células T, NK e macrófagos, possui uma importante função no desenvolvimento de uma resposta imune protetora mediada por células, em resposta à infecção por muitos patógenos microbianos (MURPHY *et al.,* 1994; PUDDU *et al.,* 1997). Alguns estudos mostraram que em camundongos, o LPS ativa as células NK e NK1.1 T^+ do fígado através da IL-12 produzida pelas células de Kupffer (TAKAHASHI *et al.,* 1996; SEKI *et al.;* 1998). Porém, no choque endotóxico, a produção exacerbada de IFN-γ contribui para a mortalidade dos animais, e a produção da IL-12 acaba sendo mais prejudicial do que benéfica ao organismo (OZMEN *et al.,* 1994; WYSOCKA *et al.;* 1993; SALKOWSKI *et al.;* 2000). O efeito predominante do IFN-γ nesta cascata de citocinas induzida pelo LPS, é o de aumentar a regulação da expressão do *Tnf*, que é o principal mediador de danos teciduais e letalidade (PFEFFER *et al.,* 1993; HAIMOVITZ-FRIEDMAN *et al.,* 1997).

Os animais $AIRmax^{RR}$ quando desafiados com a dose de 20 µg de LPS apresentaram uma maior expressão de *Il12b* o que muito provavelmente está relacionado ao aumento da expressão do *Ifng* e este por sua vez, contribuiu para o aumento da expressão do *Tnf*, determinando assim a maior sensibilidade destes animais. As sublinhagens $AIRmin^{RR}$ e $AIRmin^{SS}$ também apresentaram uma maior expressão da *Il12b* (mediante as duas doses de LPS), porém, esta não foi capaz de induzir uma expressão maior de *Ifng*, e ao observarmos o *Tnf* constatamos que embora o gene seja expresso por estes animais, provavelmente seus efeitos maiores são bloqueados pela ação de citocinas anti inflamatórias.

Resultados recentes obtidos em nosso laboratório mostram que macrófagos peritoneais da linhagem AIRmax apresentaram uma maior expressão de citocinas pró inflamatórias tais como *Il1*, *Il12b*, *Il6* e *Tnf* em relação a linhagem AIRmin, ressaltando que esta diferença também foi mantida quando os macrófagos foram ativados pelo LPS. Neste mesmo estudo também foi observado que as células residentes na cavidade peritoneal dos animais AIRmin produzem maiores quantidades de citocinas anti inflamatórias, tais como IL-10 e TGF-β (ARRUDA, 2008).

A IL-10 é descrita como uma citocina importante para a diminuição da letalidade na endotoxemia murina e infecção bacteriana, pois presente tanto na forma endógena quanto exógena aumenta a resistência dos animais (HOWARD *et al.*, 1993). Estudos *in vitro* realizados com células de Kupffer estimuladas com LPS mostraram que existe um aumento (dose-dependente do LPS) na produção da IL-10. Neste mesmo trabalho foi verificado também que a adição da citocina em culturas de células de Kupffer (também estimuladas com LPS) impedia a transcrição do mRNA da *Il6* (KNOOLE *et al.*, 1997).

Em contraste a outros órgãos, a adesão de leucócitos no endotélio sinusoidal do fígado não requer a expressão de selectinas, depende apenas da expressão da proteína de adesão vascular-1 (MACNAB *et al.*, 1996) e a sua interação com receptores (CD54-CD11a e CD106-CD49d). Células de Kupffer, *in vitro*, estimuladas com LPS produzem IL-10, que promove a diminuição da adesão dos leucócitos nas células endoteliais através da diminuição dos seus receptores de superfície (CD54 e CD106), impedindo assim o contato entre as células e a conseqüente formação de microtrombos, o que mais tardiamente pode ocasionar maiores danos ao órgão. O microambiente hepático é caracterizado pela constante presença, mesmo que em pequenas quantidades, de antígenos e constituintes bacterianos, como o LPS, assim como pelos mediadores inflamatórios liberados em resposta a estes antígenos, este conjunto de fatores auxilia na manutenção da ativação (basal) celular (KNOLLE e GERKEN, 2000).

Nossos resultados mostram que os animais AIRmin^{RR} e AIRmin^{SS} quando desafiados com a dose de 20 µg de LPS (cerca de aproximadamente 10 e 16 vezes, respectivamente, inferior a sua DL_{50}) já expressam uma maior quantidade da citocina *Il10* em relação ao animais AIRmax^{RR}. e AIRmax^{SS} Isto evidencia um interessante perfil de resposta, em que estes animais conseguem controlar os efeitos nocivos da expressão/produção exacerbada de citocinas pró inflamatórias, principalmente o *Tnf*. Deve-se ressaltar que, mesmo quando desafiados com a maior dose de LPS, os AIRmin^{RR} e AIRmin^{SS} continuam a expressar a *Il10*, sendo que é sempre superior aos animais AIRmax^{RR}.e AIRmax^{SS} (**Figura 4D**).

A expressão da molécula de ligação do LPS a *Lbp* foi observada em nossos experimentos, embora seja uma proteína de fase aguda, sintetizada pelos hepatócitos, foi pouco expressa entre as sublinhagens, que mediante os dois estímulos de LPS utilizados mostraram valores pouco maiores do que os seus controles.

O receptor CD14 é extensivamente expresso na superfície de macrófagos, neutrófilos e outras células da linhagem mielóide. As células de Kupffer, residentes do sinusóide hepático, apresentam uma expressão relativamente baixa do CD14, porém esta pode ser aumentada após o estímulo com o LPS (MATSURA *et al.*, 1994). Nossos resultados mostraram que a expressão do *Cd14* foi muito semelhante entre as sublinhagens, evidenciando um discreto aumento entre os animais portadores do alelo *R* do gene *Nramp1*.

Podemos observar que a *Lbp*, mesmo sendo expressa em pequena quantidade, bem como o receptor *Cd14*, parecem não serem fatores determinantes para a expressão/produção das demais citocinas pró inflamatórias, como o *Tnf*. Alguns estudos demonstraram que o LPS é capaz de induzir uma ativação celular na ausência de LBP ou CD14 (GODOWSKI, 2005).

Nesta etapa do trabalho, estudamos a sensibilidade ao LPS em células de medula óssea, visto que, após o processo seletivo para a obtenção das linhagens selecionadas para a máxima (AIRmax) ou mínima (AIRmin) reatividade inflamatória aguda, foi verificado que estes animais apresentam diferenças na formação e diferenciação de células na medula óssea, produção de fatores quimiotáticos no sítio inflamatório e na circulação de PMN (RIBEIRO *et al.*, 2003). Assim sendo, decidimos estudar nas sublinhagens AIRmax^{RR}, AIRmax^{SS}, AIRmin^{RR} e AIRmin^{SS} a influência do gene *Nramp1* juntamente com os QTL reguladores da AIR na resposta deste órgão ao LPS.

Utilizamos o mesmo protocolo realizado para a análise da expressão gênica em células do fígado, em que os transcritos são observados 40 minutos após o desafio com o LPS.

Tal qual o resultado obtido em células do fígado, também observamos uma maior expressão gênica do *Tnf* nos animais AIRmax^{RR}, comprovando que esta é uma citocina determinante para a sensibilidade desta sublinhagem, visto que podemos traçar uma correlação entre a expressão do gene nas duas populações celulares estudadas e a produção da proteína detectada no soro dos animais.

Observamos que os animais da sublinhagem AIRmin^{RR} , quando desafiados com a menor dose de LPS, também mostraram uma maior expressão gênica da *Il10*, corroborando os resultados iniciais de expressão gênica em células do fígado.

Podemos identificar nestas sublinhagens selecionadas para a baixa reatividade inflamatória aguda um perfil típico de resposta a endotoxina, que juntamente com a modulação exercida pelo gene *Nramp1*, torna-os mais resistentes aos efeitos tóxicos do LPS.

Como já descrito anteriormente, o estímulo com LPS induz a produção da IL-12 vimos que as sublinhagens mostraram um perfil de expressão gênica desta citocina na medula óssea similar aos resultados vistos nas células do fígado (**Figuras 5B** e **7B**), em que existe uma tendência a maior expressão entre os animais portadores do alelo *R* do gene *Nramp1*.

O *Ifng* também foi analisado e observamos que sua expressão nas células de medula óssea diferentemente do observado nas células do fígado, onde os animais AIRmax apresentaram uma expressão aumentada do gene em relação aos AIRmin^{RR} (**Figura 5A**) não foi possível visualizar diferenças entre as varias sublinhagens.

As moléculas envolvidas no reconhecimento do LPS e ativação celular também foram observadas e a expressão gênica tanto da *Lbp* quanto do receptor *Cd14* parece não ter uma importância maior na determinação da resistência ou sensibilidade dos animais à endotoxina, pelo menos nesta população celular investigada e mediante os 2 estímulos de LPS utilizados.

Como já descrito nos experimentos de rastreamento do cromossomo 1, existem 2 genes (*Casp 8* e *Il8rb*), cuja localização próxima ao *Nramp1*, torna-os motivo de investigação. Mesmo não existindo polimorfismo genético entre os animais para o *Il8rb*, decidimos verificar a sua expressão na população celular que sofreu maior modificação mediante o processo seletivo para a obtenção das linhagens AIR. Embora a expressão gênica do *Il8rb* seja observada tanto nos animais estimulados com LPS quanto nos animais controle, observamos uma aparente modulação nos AIRmin^{RR}, que para os dois estímulos utilizados mostra sempre uma expressão inferior às demais sublinhagens.

A *Casp 8* foi analisada e similar ao *Il8rb* também observamos a sua expressão nos animais controle. Não foram encontradas diferenças de expressão entre as sublinhagens, exceto para os animais AIRmax^{SS} que quando desafiados com 80 µg tiveram uma maior expressão do gene do que os outros animais.

Como já citado anteriormente, a alta resposta inflamatória dos animais AIRmax parece ser o resultado do acúmulo de três elementos convergentes durante o processo seletivo: a maior capacidade da medula óssea em produzir neutrófilos maduros, maior produção de fatores quimiotáticos no sítio inflamatório e maior resistência à apoptose espontânea das células do exsudato. (RIBEIRO *et al.*, 2003).

Estudos recentes realizados em nosso laboratório demonstraram que as células de medula óssea dos animais AIRmin estimulados com biogel, apresentam uma maior quantidade de genes

reprimidos em relação aos AIRmax. De acordo com as categorias biológicas sobre-representadas, pode-se observar que muitos destes genes estão relacionados com a resposta inflamatória, proliferação celular, quimiotaxia, mostrando assim, um típico perfil de ativação gênica destas duas linhagens (CARNEIRO et al., 2009).

As citocinas são um grupo de pequenas proteínas sinalizadoras, produzidas por uma grande variedade de células sabidamente importantes para vários processos do organismo, tais como a defesa do hospedeiro, processos de cicatrização e outras funções essenciais. Ainda que as citocinas sejam importantes para as funções homeostáticas do organismo, a sua produção e liberação excessiva iniciam uma série de injúrias teciduais que podem ocasionar o comprometimento de órgãos. Estudos sobre a patogênese da sepse, atestaram que as citocinas são fatores determinantes na severidade da doença (BLACKWELL e CHRISTMAN, 1996).

As complexas alterações metabólicas que levam ao choque séptico não são claramente compreendidas. Entretanto a resposta imediata à invasão bacteriana ou trauma é a produção de uma cascata de citocinas que inclui TNF-α, IL-1β, IL-6 e IL-8 que desencadeia uma variedade de mudanças metabólicas e fisiológicas para combater a infecção, promover o reparo e a recuperação dos tecidos afetados (PANACEK e KAUL, 1999). Em sequência há a liberação tardia de mediadores como IL-2, IFN-γ e GMCSF (BONE, 1991). A IL-2 e o GMCSF estão envolvidos na proliferação e ativação de PMN e células mononucleares ao passo que o IFN-γ aumenta os efeitos do LPS em células mononucleares (BONE, 1991; AKAGAWA e TOKUNAGA, 1985; YONG e LINCH, 1993; JAESCHKE, 1996). O aumento de TNF-α, IL-6 e IL-8 aparece na circulação e pode diminuir rapidamente, entretanto, com a severidade da doença a concentração de IL-6 e IL-8 pode tornar-se muito alta e ambas podem permanecer elevadas por um longo período. Tanto a IL-6 quanto a IL-8 podem ser induzidas pelo TNF-α e IL-1β, porém nem a IL-6 ou IL-8 sozinhas podem causar os sintomas da sepse (VAN ZEE *et al.*,1992).

As ações de células imunes ativadas combinadas com os efeitos dos mediadores inflamatórios causam sintomas como febre, dilatação vascular periférica, microtrombos em capilares e depressão miocárdica. Estes fenômenos podem inicialmente resultar em disfunção de múltiplos órgãos, choque e morte (BONE, 1991).

Analisamos a produção sérica de algumas citocinas que já tínhamos estudado a sua expressão gênica em células de fígado e de medula óssea.

A IL-6 é uma glicoproteína de 21-kDa cuja produção e secreção pode ser induzida por bactérias, vírus, LPS, IFN-γ, PAF e outros fatores liberados em resposta a injúria ou infecção (PANACEK e KAUL, 1999). Na sepse provavelmente é induzida pela endotoxina, e pelas citocinas TNF-α e IL-1β (sozinhas ou em sinergia) (FONG *et al.*, 1989).

Entre seus efeitos estão incluídos a ativação de linfócitos T e B, indução da produção de anticorpos, modulação da hematopoese e ativação do sistema de coagulação (BORDEN e CHIN, 1994; VAN DER POLL *et al.*, 1994). A natureza pleiotrópica da IL-6 inclui tanto ações pró como anti inflamatórias, ela pode ser uma indutora da produção de proteínas de fase aguda no fígado, mas também pode diminuir a produção de TNF-α e IL-1β (SCHINDLER *et al.*, 1990), pode induzir tanto a liberação do antagonista do receptor da IL-1 (IL-1ra) como a do receptor solúvel do TNF (TILG *et al.*, 1994), e também é capaz de induzir o TGF-β, um potente supressor de células T (AYALA *et al.*, 1993). Portanto, a IL-6 tanto pode promover quanto limitar a resposta pró inflamatória e também pode contribuir para a imunossupressão generalizada (VAN SNICK *et al.*, 1990; BARTON *et al.*, 1993; PANACEK e KAUL, 1999).

Dentro da complexidade da produção e interação das citocinas, a IL-6 é considerada um dos mais importantes mediadores da patogênese da sepse e choque séptico, sendo utilizada como marcador diagnóstico da inflamação sistêmica, uma vez que a sua concentração é correlacionada com a severidade da doença (BULTINCK *et al*., 2006).

Ao analisarmos a presença de IL-6 sérica observamos que ao serem estimulados com 20 µg de LPS os animais não apresentaram diferenças quanto à sua produção, o que foi observado somente quando desafiados com 80µg, neste, os animais portadores do alelo *R* do gene *Nramp1* produziram mais citocina, indicando seu possível envolvimento no recrutamento celular e produção da mesma. Observamos também que embora seja descrita uma função da IL-6 em diminuir a produção de TNF-α, isto não foi observado, pelo menos entre os animais AIRmax^{RR} e AIRmax^{SS} porém pode ser correlacionado aos AIRmin^{RR} e AIRmin^{SS}

O TNF-α é uma citocina que tem uma importante função em muitas doenças inflamatórias, assim como na sepse e choque séptico. É produzido por muitos diferentes tipos celulares incluindo os monócitos, neutrófilos, células de Kupffer, astrócitos (LIEBERMAN *et al*., 1989; HOEBE *et al.*, 2001), células endoteliais (NEUHAUS *et al.*, 2000), células da musculatura vascular lisa (WARNER *et al.*, 1989), miócitos (KAPADIA *et al.*,1995), células epiteliais renais (VON ASMUTH *et al.*, 1994) e enterócitos (OGLE *et al.*, 1997), é um dos primeiros mediadores

a aparecer em resposta a uma série de estímulos infecciosos (CHICHE *et al.,* 2001). Uma vez secretado, o TNF-α induz um amplo espectro de respostas imunológicas e inflamatórias (como a síntese de outros mediadores inflamatórios, liberação de óxido nítrico e radicais livres de oxigênio, aumento da regulação das moléculas de adesão,) o que resulta em febre, choque e injuria tecidual (TRACEY *et al.,* 1994; PAPADAKIS *et al*., 2000). A neutralização da produção do TNF-α através de anticorpos anti-TNF-α ou camundongos nocaute para o gene, tem sido associada com aumento da mortalidade em alguns modelos de infecção, demonstrando que o TNF-α é um importante mediador do hospedeiro na defesa do organismo (TAKASHIMA *et al.,* 1997). Por um outro lado, quando produzido em excesso o TNF-α pode causar uma severa patologia. Alguns estudos demonstraram que *in vivo*, a injeção de TNF-α produziu manifestações clínicas semelhantes àquelas observadas após a infecção com bactérias. Distúrbios hemodinâmicos e mortalidade tem sido correlacionados com níveis plasmáticos de TNF-α (DOFFERHOFF *et al.,* 1992; BRAUNER *et al.,* 2000).

Em nossos experimentos pudemos observar que a produção de TNF-α é um fator determinante para a sensibilidade dos animais ao LPS. Os AIRmax^{RR} quando desafiados com a menor dose de 20 µg já produzem uma quantidade maior da citocina, (resultado também observado na expressão gênica do *Tnf* em células do fígado e de medula óssea, **Figuras 4C** e **6C**), seguido pelos AIRmax^{SS}, enquanto que os animais AIRmin^{RR} e AIRmin^{SS} produzem quantidades menores de TNF-α (em ambas as doses de LPS utilizadas, **Figura 9B**). Pode-se correlacionar esta produção ao fundo genético dos animais e à modulação exercida pelo gene *Nramp1*. A sublinhagem mais sensível à endotoxina é a selecionada para a máxima reatividade inflamatória aguda, onde a presença em homozigoze do alelo *R* do gene *Nramp1* aumenta em aproximadamente 6% o infiltrado celular inflamatório destes animais (BORREGO *et al.,* 2006). Embora esta modulação gênica também seja observada na sublinhagem AIRmin^{RR} (em relação aos AIRmin^{SS}) estes animais mostram um perfil diferente de expressão e produção de citocinas que em conjunto com outros fatores leva a uma grande resistência ao LPS.

Apesar do significante progresso no entendimento de mecanismos celulares e moleculares da patogênese da infecção bacteriana, a sepse permanece como maior causa de morbidade e mortalidade em indivíduos doentes (OPAL, 2003). Dentre a grande quantidade de mediadores inflamatórios produzidos em resposta a infecção, as citocinas pró-inflamatórias são fortemente implicadas nos mecanismos patológicos da sepse severa (DINARELLO, 2000). As citocinas anti-

inflamatórias servem para limitar os efeitos da injúria causada pela resposta inflamatória exagerada, ainda que esta compensação inflamatória seja associada com imunossupressão e a progressão crônica da infecção (OPAL, 2003). Portanto, a falta de regulação desta cadeia de citocinas é o raciocínio fundamental do desenvolvimento da sepse (DINARELLO, 2000).

A IL-10 é uma proteína de 35 kD produzida por monócitos e macrófagos ativados, subpopulações de linfócitos T auxiliadores, células B por alguns tipos de células não linfocíticas (como os queratinócitos). Uma das suas principais funções é modular a expressão de citocinas, mediadores solúveis e moléculas de superfície em células de origem mielóide. A IL-10 potencialmente inibe a produção de IL-1α, IL-1β, IL-6, IFN-γ e TNF-α. Seu efeito inibitório principalmente na produção de IL-1β e TNF-α é crucial para a sua atividade anti inflamatória, pois estas citocinas freqüentemente possuem atividades sinergistícas em processos inflamatórios e amplificam esta resposta pela indução de mediadores secundários como as quimiocinas, prostaglandinas e o fator ativador de plaquetas (PAF) (MOORE *et al*., 2001).

Observamos em nossos resultados que o fundo genético associado à mínima resposta inflamatória auxilia de maneira mais efetiva o controle da resposta ao LPS, conferindo uma maior resistência aos animais da sublinhagens AIRmin. A produção sérica da IL-10 mostrou que os animais AIRmin^{SS} quando desafiados com a menor dose de LPS tendem a produzir maiores quantidades da citocina (**Figura 9C**), comprovando a expressão gênica da *Il10* vista em células do fígado e de medula óssea, (**Figuras 4D** e **6D**). Quando comparamos as demais sublinhagens (para a mesma dose), vimos que a produção da citocina é muito inferior. Embora os animais AIRmax^{RR} também produzam IL-10 (quando estimulados com 80µg), esta parece não auxiliar no controle da sepse, visto que a produção de citocinas pró inflamatórias nesta sublinhagem é sempre superior às demais.

Ao observarmos a produção da IL-12p40 também notamos uma modulação exercida pelo fundo genético de alta resposta inflamatória, em que os animais que apresentam um maior infiltrado celular (AIRmax^{RR}) tendem a produzir uma maior quantidade desta citocina, o que juntamente com outros fatores, deve contribuir para uma maior sensibilidade ao LPS (**Figura 9D**).

VALDEZ *et al.*, 2008, demonstrou que animais que possuem o alelo de resistência do gene *Nramp1* quando submetidos à infecção por S. Typhimurium, produzem mais IL-6, IL-12 e TNF-α do que os animais nocaute para o gene. Estudos posteriores também mostraram que os

animais portadores do alelo funcional do gene, quando submetidos à colite experimental por *S.* Typhimurium, apresentaram uma maior secreção de TNF-α, MIP-1α e IFN-γ, bem como um aumento de neutrófilos e de macrófagos no sítio inflamatório, o que não foi observado nos animais nocaute. O aumento da resposta inflamatória nos animais com o *Nramp1* funcional está relacionado com a sua maior produção de citocinas inflamatórias, que tem como objetivo o controle da infecção (VALDEZ *et al.*, 2009). Estes dados corroboram os nossos experimentos, uma vez que as sublinhagens mais resistentes ao LPS, produzem menos citocinas inflamatórias do que os animais das sublinhagens AIRmax, especialmente os AIRmax^{RR}.

Nosso protocolo experimental não nos permitiu observar a produção de IL-1β e IFN-γ em nossas amostras. Podemos correlacionar este fato à baixa sensibilidade do teste, embora utilizamos várias diluições para os respectivos ensaios e também ao período de observação (90 minutos após o desafio), visto que o aparecimento do IFN-γ ocorre mais tardiamente (≅ 2 horas) ao estímulo, (JAESCHKE, 1996). Panacek e Kaul, 1999, reportaram uma série de estudos feitos para saber com precisão o tempo exato do aparecimento da cascata de citocinas e concluíram que as variações são encontradas dependendo do animal e da infecção. Em um modelo murino de infecção por *S. aureus*, a bacteremia atinge altos níveis após 1 hora da injeção da bactéria e o pico de da concentração de IL-1β ocorre 4 horas após o desafio. Em babuínos adultos a infecção com uma dose letal de *E. coli* induziu um padrão similar de tempo na produção de citocinas, apresentando picos de TNF-α cerca de 2 horas, IL-1β 3 hs e IL-6 e IL-8 cerca de 7 a 8 horas após o desafio.

A IL-1 é uma importante citocina pró-inflamatória, sua presença aumenta as concentrações plasmáticas do fator ativador de plaquetas (PAF), prostaglandinas e NO (DINARELLO *et al.*, 1993). Estes são potentes vasodilatadores e indutores do choque em modelos animais. A família de genes da IL-1 é formada por três membros: IL-1α, IL-1β e o antagonista do receptor da IL-1 (IL-1ra). A IL-1 existe em duas formas, IL-1α e IL-1β e ambas as formas da citocina se ligam ao mesmo receptor e apresentam funções similares. É uma citocina que apresenta uma importante função na inflamação, sendo liberada principalmente pelas células mononucleares. Muitos de seus efeitos são similares aos do TNF-α, apresentando sinergia com o mesmo em muitas vezes. A administração da IL-1 em humanos resulta em inflamação, injúria tecidual e uma síndrome semelhante ao choque séptico (DINARELLO, 2000; TABRIZI *et al.;* 2001; CHICHE *et al.*, 2001).

O IL-1ra é uma proteína de fase aguda, produzida em resposta a infecções bacterianas, administração de LPS, processos cirúrgicos e demais traumas. É o inibidor natural da atividade da IL-1, pois compete a ocupação com o mesmo receptor da citocina, porém não induz a ativação celular. Estudos demonstram que *in vivo*, o aumento de expressão do IL-1ra protege camundongos desafiados com LPS da endotoxemia (HIRSCH *et al.;* 1996; DINARELLO, 2000). Em voluntários humanos, após a endotoxemia experimental, a concentração do IL-1ra aumenta em paralelo com a diminuição da concentração plasmática da IL-1 (HOLMES *et al.*, 2005). O IL-1ra tem a função de proteger o organismo contra os efeitos deletérios da exposição a endotoxina bacteriana e tem sido estudado como um agente terapêutico (TABRIZI *et al.;* 2001).

Não conseguimos detectar a produção sérica da IL-1β, porém detectamos a sua expressão gênica tanto em células do fígado, quanto da medula óssea, frente às duas doses de LPS utilizadas (**Figuras 4A** e **6A**). De acordo com Holmes *et al.*, 2005, alguns estudos demonstram que indivíduos que apresentam polimorfismos no gene do IL-1ra associados com variações alélicas no gene do TNF-β apresentam uma maior mortalidade, sugerindo uma possível interação destes no curso da sepse.

Diferentes abordagens podem ser utilizadas em estudos de genética de susceptibilidade à doenças. Marcadores genéticos tipo microssatélites têm sido utilizados como ferramentas importantes neste tipo de análise.

Como já citado anteriormente as regiões cromossômicas associadas a caracteres quantitativos são denominadas QTL (do inglês *Quantitative Trait Loci*). Estas regiões podem ser detectadas por marcadores genéticos dispersos pelo genoma e a sua associação com fenótipos estudados pode ser analisada por programas de mapeamento de QTL. Isto tem possibilitado a dissecação dos caracteres complexos em fatores mendelianos simples. O mapeamento de QTL possibilita estimar a localização de genes que controlam a variação fenotípica de um caráter, a magnitude de seus efeitos e as interações com outros QTL (PATERSON *et al.*, 1996).

Um outro procedimento utilizado para candidatar genes nestes QTL é o estudo da expressão gênica global através da técnica de microarranjos ou *microarrays*.

A técnica consiste na possibilidade da avaliação simultânea do perfil de transcrição de milhares de genes. Com o *microarray* tornou-se possível comparar os padrões de expressão entre indivíduos de diferentes espécies, de diferentes órgãos/tecidos dentro da mesma espécie ou diferentes tecidos submetidos a várias situações e tratamentos e, ainda, analisar os genes de

proteínas potencialmente reguladoras da transcrição bem como os fatores de transcrição. Os *microarrays* são utilizados na detecção e quantificação de ácidos nucléicos (mRNA na forma de cDNA) de amostras biológicas (SCHENA *et al.*, 1995; LI e BURMEISTER, 2006).

Uma etapa fundamental após a análise dos resultados é a validação experimental dos dados de expressão gênica. Esta validação é realizada pela utilização da técnica de qPCR, um método que apresenta grande sensibilidade e especificidade na análise dos transcritos (MANDIGERS *et al.*, 1998; HUGGETT *et al.*, 2005).

A tecnologia dos *microarrays* tem impulsionado de maneira importante a pesquisa da genômica funcional dos diferentes organismos, desde bactérias até o homem, incluindo situações normais e patológicas como o câncer, doenças autoimunes, doenças degenerativas entre outras (LI E BURMEISTER, 2006).

Observamos em nossos experimentos que os animais mais resistentes ao LPS, os AIRmin^{SS} apresentaram um perfil de expressão gênica bem peculiar, em que um grande número de genes (cerca de 955) está reprimido, ou seja, apresentam uma expressão inferior ao seu grupo controle (sem estímulo com LPS). Interessante ressaltar que ao analisarmos as categorias diferencialmente expressas dos genes ativados, notamos uma sobre-representação significativa de genes envolvidos nas categorias biológicas resposta inflamatória e apoptose, indicando um balanço na ativação gênica destes animais, sendo este um forte indicativo da sua resistência à endotoxina.

Analisamos pela tecnica do *microarray* a expressao de alguns genes ja estudados nos experimentos realizados em células do fígado e de medula ossea.

As citocinas pro inflamatorias tais como *IL1b*, *Il6* e o *Tnf* mostraram um perfil bem semelhante de expressão, sendo que as primeiras, diretamente envolvidas na resposta inflamatória e sepse, apresentaram uma ativação muito superior aos animais sem estímulo. A análise tanto da expressão quanto da produção do *Tnf* foi conclusiva em relação à sensibilidade dos animais da sublinhagem AIRmax^{RR}, mostrando uma modulação entre os QTL que determinam a intensidade da resposta inflamatória aguda e o gene *Nramp1*, indicando um possível envolvimento destes na determinação do fenótipo.

Interessante também foi a ativação da *Il10* nos AIRmin^{RR} que mediante a uma dose muito inferior a sua DL_{50} (cerca de 10 vezes) já apresenta uma expressão superior da citocina comparado às demais sublinhagens, evidenciando um controle da resposta inflamatória

exacerbada provocada pela exposição ao LPS, sendo este, provavelmente um dos mecanismos que favorece a sua alta resistência à endotoxina.

Procuramos analisar a ativação de alguns genes envolvidos na resposta ao LPS, tais como o *Ly96* ou *MD-2* (polipeptídeo que associado com o domínio extracelular do *Tlr4* é necessário para a resposta ao LPS) e o *Myd88* (proteína adaptadora comum a todos os *Tlrs*). O *Ly96* aparentemente não foi ativado pela dose de LPS utilizada, visto que os animais controle tiveram uma maior expressão do gene, mostrando que esta proteína não deve ter uma influência maior na sensibilidade ou resistência dos animais.

O gene *Myd88* foi analisado e a sua ativação foi observada nos animais AIRmax^{RR} , AIRmax^{SS} e AIRmin^{RR}, interessante notar que os AIRmin^{SS} tiveram uma repressão gênica (sua expressão foi menor do que os animais controle). Sendo este um gene importante na sinalização do LPS via *Tlrs*, (MEDZHITOV *et al.*, 1998) deve-se concluir que estes animais apresentam outros mecanismos, bem como outras vias de ativação celular e que devem ser influenciados pelo fundo de resposta inflamatória, assim como pelo gene *Nramp1*.

Os *Tlrs* também foram estudados e o *Tlr4* um dos principais receptores envolvidos na resposta ao LPS não mostrou variação de expressão entre os animais da sublinhagens, bem como em seus controles. Deve-se lembrar que não observamos polimorfismo genético entre os animais, visto que a linhagem C3H/HeJ que apresenta o alelo deficiente do *Tlr4* não fazia parte das 8 linhagens isogênicas que compuseram a F0 da seleção de inflamação.

Tanto o *Tlr2* quanto o *Tlr4* estão envolvidos na sinalização intracelular do LPS (MEANSA *et al.*, 2000), entretanto outros estudos descrevem que o *Tlr2* é um receptor essencial para a sinalização de uma variedade de PAMPs, incluindo lipoproteínas e lipopeptídeos bacterianos, peptidoglicanos e âncoras de GPI (KLIMPEL *et al.*, 1999; CARROLL *et al.*, 1999; TAKEUCHI *et al.*, 2002). As lipoproteínas são produzidas por uma variedade de patógenos incluindo as micobactérias, bactérias gram-negativas e espécies de *mycoplasma*. A região N-terminal do lipopeptideo é responsável pela atividade imunoestimulatoria de bactérias (TAKEUCHI *et al.*, 2002). Em nossos animais, parece que o estimulo por LPS ativou a expressão gênica do *Tlr2*, visto que a mesma foi observada em todos os animais das sublinhagens.

Outros genes estudados, *Cxcl1*, *Cxcl2* e *Cxcl10*, fazem parte de um *cluster* de quimiocinas (*Chemokine ligand* (*C-X-C*)), estão presentes no cromossomo 5 de 51 a 53cM. Em camundongos os *Cxcl1-3*, *Cxcl5* e *Cxcl6* se ligam ao receptor *Cxcr2*, que também é conhecido como *Il8rb*. Os

Cxcl1 e *Cxcl2* têm mostrado induzir uma rápida ativação de integrinas, causando a interrupção do *rolling* dos neutrófilos e a quimiotaxia (LEY *et al*., 2003). As quimiocinas e outros fatores quimioatraentes solúveis como o C5a, o PAF e o leucotrieno B4, são muito importantes para desencadear o recrutamento de PMN (REUTERSHAN e LEY, 2004).

A proteína amilóide do soro, também analisada pelo *microarray*, (*Saa3*, gene localizado no cromossomo 7 murino a 23.5cM) é uma proteína de fase aguda sintetizada no fígado, seus níveis plasmáticos aumentam dramaticamente em processos inflamatórios, como resultado do aumento da transcrição de citocinas inflamatórias como o TNF-α, IL-1 e IL-6 (JENSEN *et al.*, 1998). A proteína amilóide do soro assim como a proteína C reativa desenvolvem uma importante função na imunidade inata, atuando como opsoninas em infecções por bactérias gram-negativas (HARI-DASS *et al.*, 2005).

O receptor associado ao fator-1 do TNF (*Traf1*, localizado no cromossomo 2) faz parte de um grupo de proteínas adaptadoras que se ligam a uma grande variedade de receptores de superfície celular, incluindo o TNF e a superfamília de receptores da IL-1, levando a uma ativação do NF-κB e proteínas quinases ativadas por mitógenos. Os *Trafs* também interagem com algumas proteínas que regulam os receptores de morte e sobrevivência celular. Assim, os sinais mediados pelo *Traf*, podem diretamente induzir a sobrevivência da célula ou interferir no receptor de morte induzindo a apoptose (LEE e LEE, 2002).

Em nossos experimentos não foram observadas diferenças de expessão dos genes: *Cxcl1*, *Cxcl2*, *Cxcl10*, *Saa3* e *Traf1*, entre as sublinhagens. Para o estímulo de LPS utilizado, estes genes foram diferencialmente expressos em relação aos seus respectivos controles, o que pode ser um indicativo das suas participações na resposta inflamatória, bem como na regulação do fenótipo de sensibilidade ao LPS.

O *Tnfsf9* (membro 9 da superfamília de ligantes do TNF, localizado no cromossomo 17), e expresso em linfócitos B ativados, macrófagos e células dendriticas. O ligante é específico para o receptor 4-1BB e pode desempenhar um importante papel na indução da proliferação de linfócitos T ativados no sangue periférico (DEBENEDETTE *et al.*, 1995). Alguns estudos demonstram a função do 4-1BB em manter a produção de TNF induzida pela ativação do Tlr (KANG *et al.*, 2007). Em nossos animais observamos que o gene *Nramp1* parece ter um envolvimento na ativação do *Tnfsf9*, uma vez que os animais portadores do alelo funcional apresentaram uma maior expressão gênica quando comparados aos portadores do alelo *S*.

A enzima solúvel isocitrato desidrogenase 1 (NADP+), cujo gene *Idh1* esta localizado em murinos no cromossomo 1 a 29.8 cM, é importante no metabolismo de carboidratos. Em eucariontes existem ao menos 3 tipos de IDH, sendo que duas estão localizadas na matriz mitocondrial e a terceira no citopolasma. A região melhor conservada destas enzimas é uma sequência de resíduos ricos em glicina, localizado na região C-terminal. Estão relacionadas estruturalmente a IDH mais outras duas enzimas: 3-isopropilmalato desidrogenase que cataliza o terceiro passo da biossíntese de leucina em bactérias e fungos; e a tartarato desidrogenase, que cataliza a redução de tartarato a oxaloglicolato (HURLEY *et al.*, 1989; CUPP *et al.*, 1991). O gene *Idh1* foi observado nas sublinhagens, embora o estímulo por LPS não tenha ocasionado um aumento da expressão nos animais experimentais, podemos verificar que as sublinhagens AIRmin mostraram uma maior repressão gênica em relação aos AIRmax, principalmente os mais resistentes ao LPS, os AIRmin^{SS}.

Os efeitos biológicos do IFN-γ são mediados pelos genes estimulados pelo intérferon (*Interferon-stimulated genes,* ISGs). Uma família destes ISGs e a família Ifi-200, que inclui os genes Ifi202a, Ifi202b, Ifi203, Ifi204, e Ifi205, em camundongos, e os genes IFI16, MNDA, AIM2, e IFIX, em humanos. O grupo de genes Ifi-200 codifica proteínas com função e estrutura relacionadas, são as proteínas da família p-200. O aumento da expressão celular de certos membros da família p-200 e associado com a inibição da proliferação celular, modulação apoptose e diferenciação celular (GOUGH *et al.*, 2007; CHOUBEY e PANCHANATHAN, 2008).

Os receptores *scavenger* são glicoproteínas transmembrânicas encontradas em macrófagos, células endoteliais e células da musculatura lisa e apresentam uma variedade de ligantes como bactérias gram-negativas, células apoptóticas e lipoproteínas oxidadas de baixa densidade. Estes receptores são divididos em algumas classes, baseados na sua estrutura e função. Uma destas classes inclui o receptor de macrófago com estrutura de colágeno (*marco*, cujo gene também esta localizado no cromossomo 1), que está envolvido no reconhecimento de sílica, dióxido de titânio, partículas de látex e diesel, entre outros (KRAAL *et al.*, 2000; LANDONI *et al*., 2004).

Observamos nas sublinhagens uma diferença na expressão gênica tanto do *Ifi205* quanto do *Marco*, indicando uma possível modulação do fundo genético de alta resposta inflamatória aguda, favorecendo uma maior expressão de ambos os genes nos AIRmax^{RR} e AIRmax^{SS}. Deve-

se ressaltar que a expressão nos animais das sublinhagens foi independente do alelo do gene *Nramp1*.

A produção e expressão de citocinas inflamatórias e imunes, bem como a de receptores de superfície celular e moléculas envolvidas na sinalização intracelular, são fenótipos parciais, considerados para a indicação dos possíveis genes candidatos de cada região encontrada. Auxiliando assim, na determinação de fatores que contribuem para a sensibilidade ou resistência ao choque endotóxico induzido por LPS.

Nosso trabalho sugere a participação do gene *Nramp1* na modulação da expressão de alguns genes envolvidos tanto na resposta inflamatória quanto ao LPS. Estes resultados em conjunto permitem compreender melhor os mecanismos de interação gênica na progressão do choque endotóxico, indicando biomarcadores de ativação celular interessantes para o direcionamento de pesquisas clínicas

6 CONCLUSÕES

Tomados em conjunto nossos resultados permitem concluir que:

-O fundo genético de máxima ou mínima reatividade inflamatória aguda dos animais das sublinhagens homozigotas para o gene *Nramp1* não apresentou diferenças polimórficas importantes em relação às linhagens parentais durante o processo de acasalamento assitido por genotipagem

- Os animais AIRmax^{RR}, quando estimulados com 20 µg de LPS, mostraram maior expressão gênica do *Tnf* e em células de fígado e medula óssea.

- A expressão gênica do *Ifng* foi maior nos animais AIRmax^{RR} e AIRmax^{SS} estimulados com 20 e 80 µg de LPS

- A sublinhagem AIRmin^{RR} teve maior expressão de *Il12b* em células do fígado mediante os estímulos de 20 e 80 µg de LPS.

- Os animais AIRmin^{RR}, quando estimulados com 20 µg de LPS, apresentaram uma maior expressão gênica da citocina *Il10* em células de fígado e medula óssea.

- A sublinhagem AIRmin^{SS} mostrou uma tendência a maior produção sérica de IL-10 quando estimulada com 20 µg de LPS.

- As sublinhagens AIRmax^{RR} e AIRmin^{RR} produziram mais IL-6 sérica quando desafiadas com 80 µg de LPS.

- A produção sérica do TNF-α foi maior nos animais AIRmax^{RR} e AIRmax^{SS} estimulados com 20 e 80 µg de LPS.

- Os animais AIRmin^{SS} mostraram uma maior quantidade de genes reprimidos na resposta ao LPS em células de medula óssea.

- A ativação gênica de citocinas pró e anti inflamatórias foi observada em todas as sublinhagens estimuladas com 20 µg de LPS.

- Alguns genes diferencialmente expressos foram estudados indicando um possível envolvimento dos mesmos na resposta inflamatória bem como na resistência ou sensibilidade ao LPS.

REFERÊNCIAS*

ADEREM, A. Phagocytosis and the inflammatory response. **J. Infect. Dis.,** v.187, p.340-345, 2003. Suppl. 2.

AKAGAWA, K. S.; TOKUNAGA, T. Lack of binding of bacterial lipopolysaccharide to mouse lung macrophages and restoration of binding by gamma-interferon. **J. Exp. Med.,** v.162, p. 1444-1459, 1985.

AKIRA, S.; TAKEDA, K. Toll-like receptor signalling. **Nat. Rev. Immunol.,** v. 4, p. 499–511, 2004.

ALEXANDER, C.; RIETSCHEL, E. Th. Bacterial lipopolysaccharides and innate immunity. **J. Endotoxin Res.,** v. 7, p.167-202, 2001.

ANSPACH, F. B. Endotoxin removal by affinity sorbents. **J. Biochem. Biophys. Methods,** v. 49, p. 665-681, 2001.

ARAUJO, L. M. M.; RIBEIRO, O. G.; SIQUEIRA, M.; DE FRANCO, M.; STAROBINAS, N.; MASSA, S.; CABRERA, W. H.; MOUNTON, D.; SEMAN, M.; IBAÑEZ, O.M. Innate resistance to infection by intracellular bacterial pathogens differs in mice selected for maximal or minimal acute inflammatory response. **Eur. J. Immunol.,** v.28, p.2913 -2920, 1998.

ARRUDA, A. G. F. **Estudo comparativo da ativação de macrófagos em linhagens de camundongos geneticamente selecionados para alta ou baixa reatividade inflamatória aguda.** 85 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2008.

AYALA, A.; KNOTTS, J.; ERTEL, W.; PERRIN, M.; MORRISON, M.; CHAUDRY, I. Role of interleukin 6 and transforming growth factor-beta in the induction of depressed splenocyte responses following sepsis. **Arch. Surg.,** v.128, p.89-94, 1993.

BARTON, C. H.; WHITEHEAD, S. H.; BLACKWELL, J. M. Nramp transfection transfers Ity/Lsh/Bcg-related pleiotropic effects on macrophage activation: influence on oxidative burst and nitric oxide pathways. **Mol. Med.,** v.1**,** p.267-279, 1995.

BAS, S.; GAUTHIER, B. R.; SPENATO, U.; STINGELIN, S.; GABAY, C. CD14 Is an Acute-Phase Protein. **J. Immunol.,** v. 172, p. 4470–4479, 2004.

BAUMANN, H.; GAULDIE, J. The acute phase response. **Immunol. Today,** v.15, p.74-80, 1994.

---

* **De acordo com:**
ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023:** Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BEUTLER B.; RIETSCHEL E. Th. Innate immune sensing and its roots: the story of endotoxin. **Nat. Rev. Immunol.,** v. 3, p. 169-76, 2003.

BEUTLER, B. Inferences, questions and possibilities in Toll-like receptor signalling. **Nature,** v. 430, p. 257–263, 2004.

BEUTLER, B. Innate immunity: An overview. **Mol. Immunol.,** v. 40, p. 845–859, 2004.

BEUTLER, B. The Toll-like receptors: Analysis by forward genetic methods. **Immunogenetics,** v. 57, p. 385–392, 2005.

BEUTLER, B.; MILSARK, I. W.; CERAMI, A. C. Passive immunization against cachectin/tumor necrosis factor protects mice from lethal effect of endotoxin. **Science,** v.229, p-869-871, 1985.

BEUTLER, B.; POLTORAK, A. Positional cloning of LPS, and the general role of toll-like receptors in the innate immune response. **Eur. Cytokine Netw.,** v. 11, p. 143-52, 2000.

BILIAR, T.; CURRAN, R. D., WILLIANS, D.L., KISPERT, P. Liver nonparenchymal cells are stimulated to provide interleukin 6 for induction of the hepatic acute-phase response in endotoxemia but not in remote localized inflammation. **J. Clin. Pathol.,** v.127:31-37, 1992.

BILZER, M.; ROGGEL, F.; GERBES, A. L. Role of Kupffer cells in host defense and liver disease**. Liver Int.,** v.26, p.1175-1186, 2006.

BIOZZI, G.; RIBEIRO, O. G.; SARAN, A.; ARAUJO, L. M. M.; MARIA, D. A.; DE FRANCO, M.; CABRERA, W. K.; SANT"ANNA O. A.; MASSA, S.; COVELLI, V.; MOUTON, D.; NEVEU, T.; SIQUEIRA, M.; IBAÑEZ, O. M. Effect of genetic modification of acute inflammatory responsiveness on tumorigenesis in the mouse. **Carcinogenesis,** v.19 n.2, p.337, 1998.

BLACKWELL, T. S.; CHRISTMAN, J. W. Sepsis and cytokines: current status. **Br. J. Anaesth.,** v. 77, p.110-7, 1996.

BONE, R. C.; The pathogenesis of sepsis. **Ann. Intern. Med.,** v.115, p.457-469, 1991.

BORDEN, E. C.; CHIN, P. Interleukin-6: a cytokine with potential diagnostic and therapeutic roles. **J. Lab. Clin. Med.,** v.123, n.6, p.824-9, 1994.

BORREGO, A. **Estudo dos loci envolvidos na resistência à infecção por *Salmonella* Typhimurium em camundongos selecionados para a máxima ou mínima resposta inflamatória aguda**. 56 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2003.

BORREGO, A.; PETERS, L.C.; JENSEN, J.R.; RIBEIRO, O.G.; CABRERA, W.H.K.; STAROBINAS, N.; SEMAN, M.; IBAÑEZ, O.M.; DE FRANCO, M. Genetic determinants of acute inflammation regulate *Salmonella* infection and modulate *Slc11a1* gene (formerly *Nramp1*) effects in selected mouse lines. **Microbes Infect.,** v.8, p.2766-2771, 2006.

BRAUNER, J. S.; ROHDE, L. E.; CLAUSELL, N. Circulating endothelin-1 and tumor necrosis factor-alpha: early predictors of mortality in patients with septic shock. Intens. **Care Med.,** v.26, p.305-13, 2000.

BRENNAN, C. A.; ANDERSON, K. V. DROSOPHILA: The Genetics of Innate Immune Recognition and Response. **Annu. Rev. Immunol.,** v. 22, p.457–83, 2004.

BRYANT , E. H.; McCOMAS, S. A.; COMBS, L. M. The effect of an experimental bottleneck upon quantitative genetic variation in the housefly. **Genetics.** v. 114, p.1191-1211, 1986.

BRUNN, G. J.; PLATT, J. L. The etiology of sepsis: Turned inside out. **Trends Mol. Med.,** v.12, p. 10-16, 2006.

BULTINCK, J.; BROUCKAERT, P.; CAUWELS, A. The in vivo contribution of hematopoietic cells to systemic TNF and IL-6 production during endotoxemia. **Cytokine,** v. 36, p.160–66, 2006.

BUSTIN, S.A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays **J. Mol. Endocrinol.,** v.25, p.169–193, 2000.

CAHALAN, M. D.; GUTMAN, G. A. The Sense of place in the immnune system. **Nat. Immunol.,** v.7, p.329-32, 2006.

CARNEIRO, A. S.; RIBEIRO, O. G.; DE FRANCO, M.; CABRERA, W. H.; VORRARO, F.; SIQUEIRA, M.; IBAÑEZ, O. M.; STAROBINAS, N. Local inflammatory reaction induced by Bothrops jararaca venom differs in mice selected for acute inflammatory reaction. **Toxicon,** v. 40, p.1571-1579, 2002.

CARNEIRO, P. S.; PETERS, L. C.; VORRARO, F.; BORREGO, A.; RIBEIRO, O. G.; STAROBINAS, N.; JENSEN, J. R.; CABRERA, W. H.; IBAÑEZ, O. M.; DE FRANCO, M. Gene expression profiles of bone marrow cells from mice phenotype-selected for maximal or minimal acute inflammations: searching for genes in acute inflammation modifier loci. **Immunology,** 2009, *In press.*

CAHALAN, M. D.; GUTMAN, G. A. The sense of place of place in the immune system. **Nat. Immunol.,** v.7, p.329-332, 2006.

CAROFF, M.; KARIBIAN, D.; CAVAILLON, J-M.; HAEFFNER-CAVAILLON, N. Structural and functional analyses of bacterial lipopolysaccharides. **Microbes Infect.,** v.2, p.915-926, 2002.

CARROLL, J. D.; ESPEVIK, T. INGALLS, R. R.; RADOLF, J. D.; GOLENBOCK. D. T. Toll-like receptor 2 functions as a pattern recognition receptor for diverse bacterial products. **J. Biol. Chem.,** v.274, p.33419-25, 1999.

CELIA, M.; SCHEIDEGGER, D.; PALMER-LEHMANN, K.; LANE, P. LANZAVECCHIA, A.; ALBER, G. Ligation of CD40 on dendritic dells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation. **J. Exp. Med.,** v. 184, p.747-752, 1996

CHICHE, J. D.; SIAMI, S.; DHAINAUT, J. F.; MIRA, J. P. Cytokine polymorphisms and susceptibility to severe infectious diseases. **Sepsis,** v.4, p.209-215, 2001.

CHOUBEY, D.; PANCHANATHAN, R**.** Interferon-inducible Ifi200-family genes in systemic lupus erythematosus. **Immunol. Lett.,** v.119, p.32-41, 2008.

COXON, A.; TANG, T.; MAYADAS, T. N. Citokyne-activated endothelial cells delay neutrophil apoptosis in vitro and in vivo: a role for GM-CSF. **J. Exp. Med.,** v.190, p.923-933, 1999.

CUPP, J. R.; MCALISTER-HENN, L. *NAD*(+)-dependent isocitrate dehydrogenase. Cloning, nucleotide sequence, and disruption of the IDH2 gene from *Saccharomyces cerevisiae.* **J. Biol. Chem.,** v.266, p.22199-22205, 1991.

CUZZOLA, M.; MANCUSO, G.; BENINATI, C.; BIONDO, C.; GENOVESE, F.; TOMASELLO, F.; FLO, T. H.; ESPEVIK, T.; TETI, G. β2 Integrins Are Involved in Cytokine Responses to Whole Gram-Positive Bacteria. **J. Immunol.,** v. 164, p. 5871–5876, 2000.

DAUPHINE, S. M.; KARSAN, A. Lipopolysaccharide signaling in endothelial cells. **Lab. Invest.,** v. 86, p. 9–22, 2006.

DE BOER, J. P.; CREASEY, A. A.; CHANG, A.; ROEM, D.; EERENBERG, A. J. M.; HACK, C. E.; TAYLOR, F. B. JR. Activation of the complement system in baboons challenged with live *Escherichia coli*: correlation with mortality and evidence for a biphasic activation pattern. **Infect. Immun.,** v. 61, p. 4293-4301.

DE FRANCO, M.; CARNEIRO, P. S.; PETERS, L. C.; VORRARO, F.; BORREGO, A.; RIBEIRO, O. G.; STAROBINAS, N.; CABRERA, W. K.; IBAÑEZ, O. M. *Slc11a1* (*Nramp1*) alleles interact with acute inflammation loci to modulate wound-healing traits in mice. **Mamm. Genome,** v. 18, p. 263-9, 2007.

DEBENEDETTE, M. A.; CHU, N. R.; POLLOK, K. E.; HURTADO, J; WADE, W. F.; KWON, B. S.; WATTS, T. H. Role of 4-1BB ligand in costimulation of T lymphocyte growth and its upregulation on M12 B lymphomas by cAMP. **J. Exp. Med.,** v.181, p.985-92, 1995.

DENTENER, M. A.; VREUGDENHIL, A. C. E.; HOET, P. H. M.; VERNOOY, J. H. J.; NIEMAN, F. H. M.; HEUMANN, D.; JANSSEN, Y. M. W.; BUURMAN, W. A.; WOUTERS, E. F. M. Production of the Acute-Phase Protein Lipopolysaccharide-Binding Protein

by Respiratory Type II Epithelial Cells: Implications for Local Defense to Bacterial Endotoxins. **Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.,** v. 23, p. 146–153, 2000.

DERFALVI, B.; IGAZ, P.; FULOP, K. A.; SZALAI, C.; FALUS, A. Interleukin-6-induced production of type II acute phase proteins and expression of junB gene are downregulated by human recombinant growth hormone in vitro. **Cell Biol. Int.,** v. 24, p.109-14, 2000.

DESSEIN, A. J.; MARQUET, S.; HENRI, S.; NE, W. E.; HILLAIRE, D.; RODRIGUES, V.; PRATA, A.; ALI, Q. M.; GHARIB, B.; DE REGGI, M.; MAGZOUB, M. M.; SAEED, O. K.; ABDELHAMEED, A. A.; ABEL, L. Infection and disease in human schistosomiasis mansoni are under distint major gene control. **Microbes Infect.,** v.1, p.561-567, 1999.

DIAMOND, M. S.; SPRINGER, T. A. The dynamic regulation of integrin adhesiveness. **Curr. Biol.,** v. 4, p. 506-17, 1994.

DIETRICH, W.R. et al. A genetic map of the mouse with 4006 simple sequence lengh polymorphism. **Nat. Gen.,** v. 7, p. 220, 1994.

DINARELLO, C. A; WOLFF, S.M. The role of interleukin-1 in disease. **N. Engl. J. Med.,** v.328, p.106-113, 1993.

DINARELLO, C.A. Cytokines as mediators in the pathogenesis of septic shock. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.,** v.216, p.133-165, 1996.

DINARELLO, C. A. Proinflammatory and anti-inflammatory cytokines as mediators in the pathogenesis of septic shock. **Chest,** v. 112, p.321-329, 1997.

DINARELLO, C. A.; Proinflammatory cytokines**. Chest.** v. 118, p.503-8, 2000.

DOBROVOLSKAIA, M. A.; VOGEL, S. N. Toll receptors, CD14, and macrophage activation and deactivation by LPS. **Microbes Infect.,** v. 4, p. 903–914, 2002.

DOFFERHOFF, A. S.; BOM, V. J.; DE VRIES-HOSPERS, H. G.; VAN INGEN, J.; VD MEER, J.; HAZENBERG, B. P.; MULDER, P.O; WEITS, J. Patterns of cytokines , plasma endotoxin, plasminogen activator inhibitor, and acute-phase proteins during the treatment of severe sepsis in humans. **Crit. Care. Med.,** v.20, p.185-92, 1992.

ELSON, G.; DUNN-SIEGRIST, I.; DAUBEUF, B.; PUGIN, J. Contribution of Toll-like receptors to the innate immune response to Gram-negative and Gram-positive bacteria. **Blood,** v. 109, p.1574-1583, 2007.

FAUVE, R. M.; JUSFORGUES, H.; HEVIN, B. Maintenance of granuloma macrophages in serum-free médium. **J. Immunol. Methods,** v. 64, p.345-351, 1983.

FLICK, D. A.; GIFFORD, G. E. Comparison of in vitro cell cytotoxic assays for tumor necrosis factor. **J. Immunol. Methods,** v.68, p.167-75, 1984.

FONG, Y. *et al.* Antibodies to cachectin/tumor necrosis factor reduce interleukin-1B and interleukin-6 appearance during lethal bacteremia. **J. Exp. Med.,** v.170, p.1627-1633, 1989.

FONTAN, E.; FAUVE, R. M. Inflammation and antibacterial resistance. III. Influence of an inflammatory reaction induced by the injection of polyacrilamide gels on the resistance of mice to Lysteria monocitógenes infection. **Ann. Immunol.,** v. 134 c, n. 2, p. 255-264, 1983.

FORBES, J. R.; GROS, P. Divalent-metal transport by NRAMP proteins at the interface of host-pathogen interactions. **Trends Microbiol.,** v.9, p.397-403, 2001.

FORTIER, A.; MIN-OO, G.; FORBES, J.; LAM-YUK-TSEUNG, S.; GROS, P. Single gene effects in mouse models of host: pathogen interactions. **J. Leukoc. Biol.,** v. 77, p. 868–877, 2005.

FREUDENBERG, M. A.; KEPPLER, D.; GALANOS, C. Requirement for lipoplysaccharide-responsive macrophages in galactosamine-induced sensitization to endotoxin. **Infect. Immun.,** v.51, p.891-895, 1996.

FRITSCHEA, G.; NAIRZA, M.; THEURLA, I.; MAIRA, S.; BELLMANN-WEILERA, R.; BARTONB, H. C.; WEISS, G. Modulation of macrophage iron transport by *Nramp1* (*Slc11a1*). **Immunobiology,** v. 212, p. 751–757, 2008.

FUJIHARA, M.; MUROI, M.; TANAMOTO, K.; SUZUKI, T.; AZUMA, H.; IKEDA, H. Molecular mechanisms of macrophage activation and deactivation by lipopolysaccharide: roles of the receptor complex. **Pharmacol. Ther.,** v. 100, p.171-94, 2003.

GEROLD, G.; ZYCHLINSKY, A.; DE DIEGO, J. L. What is the role of Toll-like receptors in bacterial infections? **Semin. Immunol.,** v. 19, p. 41–47, 2007.

GIULIETTI, A.; OVERBERGH, L.; VALCKX, D.; DECALLONNE, B.; BOUILLON, R.; MATHIEU, C. An overview of Real-Time quantitative PCR Applications to quantify cytokine gene expression. **Methods,** v.25, p.386-401, 2001.

GODOWSKI, P.J. A smooth operator for LPS response. **Nat. Immunol.,** v.6, p.544-6, 2005.

GORBETA, M. B.; SEFTON, M. V. Endotoxin: The uninvited guest. **Biomaterials,** v. 26, p. 6811–6817, 2005.

GORDON, S. Alternative activation of macrophages. **Nat. Rev .Immunol.,** v.3, p.23-25, 2003.

GOUGH, D. J.; SABAPATHY, K.; KO, E. Y.; ARTHUR, H. A.; SCHREIBER, R. D.; TRAPANI, J. A.; CLARKE, C. J; JOHNSTONE, R. W. A novel c-Jun-dependent signal transduction pathway necessary for the transcriptional activation of interferon gamma response genes. **J. Biol. Chem.,** v.282, p.938-46, 2007.

GREGORY, C. D.; DEVITT, A. CD14 and apoptosis. **Apoptosis,** v. 4: 11–20, 1999.

GREWE, M.; GAUSLING, R.; GYUFKO, K.; HOFFMANN, R.; DECKER K. Regulation of thr mRNA expression for tumor necrosis factor-α in rat liver macrophages. **J. Hepatol.,** v.20, p.811-818, 1994.

HACK, C. E.; AARDEN, L. A.; THIJS, L. C. The role of cytokines in sepsis. **Adv. Immunol.,** v. 66, p.101-195, 1997.

HAENEY, M. R. The role of complement cascade in sepsis. **J. Antimicrob. Chemother.,** v. 41, p.41-6, 1998, Sup. A.

HAILMAN, E. et al. Lipopolysacharide (LPS)- binding protein accelerates the binding of LPS to CD14. **J. Exp. Med.,** v.179, p.269-277, 1994.

HAIMOVITZ-FRIEDMAN, A.; CORDON-CARDO, C.; BAYOUMY, S.; GARZOTTO, M.; MCLOUGHLIN, M.; GALLILY, R.; EDWARDS, C. K. R.; SCHUCHMAN, E. H.; FUKS, Z.; KOLESNICK, R. Lipopolysaccharide induces disseminated endothelial apoptosis requiring ceramide generation. **J. Exp. Med.,** v.186, p.1831-41, 1997.

HALEY, C.S.; KNOTT, S.A. A simple regression method for mapping quantitative trait loci in line crosses using flanking markers. **Heredity, 69:**315-324, 1992.

HARI-DASS, R.; SHAH, C.; MEYER, D. J.; RAYNES. J. G. Serum amyloid A protein binds to outer membrane protein A of Gram-negative bacteria. **J. Biol.Chem.,** v. 280, p.18562–18567, 2005.

HAZIOT, A.; FERRERO, E.; KONTGEN, F.; HIJIYA, N.; YAMAMOTO, S.; SILVER, J.; STEWART, C. L.; GOYERT, S. M. Resistance to Endotoxin Shock and Reduced Dissemination of Gram-Negative Bacteria in CD14-Deficient Mice. **Immunity,** v. 4, p. 407–414, 1996.

HEINZEL, F. P.; RERKO, R. M.; LING, P.; HAKIMI, J.; SCHOENHAUT, D. S. Interleukin 12 is produced in vivo during endotoxemia and stimulates synthesis of gamma interferon. **Infect. Immun.,** v. 62, p.4244-4249, 1994.

HEUMANN, D.; GLAUSER, M. P.; CALANDRA, T. Molecular basis of host - pathogen interaction in septic shock. **Curr. Opin. Microbiol.,** v. 1, p. 49-55, 1998.

HEUMANN, D.; ROGER, T. Initial responses to endotoxins and Gram-negative bacteria. **Clin. Chim. Acta,** v.323, p.59-72, 2002. Review.

HIEMSTRA, P. S.; EISENHAUER, P. B.; HARWIG, S. S. L.; VAN DEN BARSELAAR, M. T.; VAN FURTH, R.; LEHER, R. I. Antimicrobial proteins of murine macrophages. **Infect. Immun.,** v.61, p-3038-3046, 1993.

HIRSCH, E.; IRIKURA, V. M.; PAUL, S. M.; HIRSCH, D. Functions of interleukin 1 receptor antagonist in gene knockout and overproducing mice. **Proc. Natl. Acad. Sci.,** v.93, p.11008-11113, 1996.

HITCHCOCK, P. J.; LEIVE, L.; MAKELA, P. H.; RIETSCHEL, E. T.; STRITTMATTER W.; MORRISON, D. C. Lipopolysaccharide Nomenclature-Past, Present, and Future. **J. Bacteriol.,** v. 166, p. 699-705, 1986.

HOEBE, K. H.; WITKAMP, R. F.; FINK-GREMMELS, J.; VAN MIERT, A. S.; MONSHOUWER, M. Direct cell-to-cell contact between Kupffer cells and hepatocytes augments endotoxin-induced hepatic injury. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.,** v.280, p.G720–8, 2001.

HOFFMANN, J.A. The immune response of Drosophila. **Nature,** v. 426, p.33–38, 2003.

HOLMES, C. L.; RUSSELL, J. A.; WALLEY, K. R. Genetic polymorphisms in sepsis and septic shock. **Chest.,** v. 144, p.1103-1115, 2003.

HOLST, O.; ULMER, A. J.; BRADE, H.; HANS-DIETER, F.; RIETSCHEL, E. Th. Biochemistry and cell biology of bacterial endotoxins. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.,** v.16, p.83-104, 1996.

HOSHINO, K.; TAKEUCHI, O.; KAWAI, T.; SANJO, H.; OGAWA, T.; TAKEDA, Y.; TAKEDA, K.; AKIRA, S. Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. **J. Immunol.,** v. 162, p. 3749–3752, 1999.

HOWARD, M.; MUCHAMUEL, T.; ANDRADE, S.; MENON, S. Interleukin 10 protects mice from lethal endotoxemia. **J. Exp. Med.,** v.177, p.1205-120, 1993.

HUANG, K.; FISHWILD, D. M.; WU, H. M.; DEDRICK, R. L. Lipopolysaccharide-induced E-selectin expression requires continuous presence of LPS and is inhibited by bactericidal/permeability-increasing protein. **Inflammation,** v. 19, p. 389-404, 1995.

HUGGETT, J.; DHEDA, K.; BUSTIN, S.; ZUMLA, A. Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. **Science,** v. 270, p.467-70, 1995.

HUMMELL, D. S.; SWIFT, A. J.; TOMASZ, A.; WINKELSTEIN, J. A. Activation of the alternative complement pathaway by pneumococcal lipoteichoic acid. **Infect. Immun.,** v. 47, p. 384-387, 1985.

HURLEY, J. H.; THORSNESS, P. E.; RAMALINGAM, V.; HELMERS, N. H.; KOSHLAND, D.E.; STROUD, R. M. Structure of a bacterial enzyme regulated by phosphorylation, isocitrate dehydrogenas. **Proc. Natl. Acad. Sci.,** v.86, p.8635-8639, 1989.

IBAÑEZ, O. M.; STIFFEL, C.; RIBEIRO, O. G.; CABRERA, W.; MASSA, S.; DE FRANCO, M.; et al. Genetics of nonspecific immunity: I. Bidirectional selective breeding of lines of mice endowed with maximal or minimal inflammatory responsiveness. **Eur. J. Immunol.,** v.22, p.2555-2563, 1992.

ILIEV, D. B.; ROACH, J. C.; MACKENZIE, S.; PLANAS, J. V.; GOETZ, F. W. Endotoxin recognition: In fish or not in fish ? **FEBS Lett.,** v. 579, p. 6519–6528, 2005.

INGALLS, R. R.; MONKS, B. G.; SAVEDRA, R. JR.; CHRIST, W. J.; DELUDE, R. L.; MEDVEDEV, A. E.; ESPEVIK, T.; GOLENBOCK, D. T. CD11/CD18 and CD14 Share a Common Lipid A Signaling Pathway. **J. Immunol.,** v. 161, p. 5413–5420, 1998.

JABADO, N.; JANKOWSKI, A.; DOUGAPARSAD, S.; PICARD, V.; GRINSTEIN, S.; GROS, P. Natural resistance to intracellular infections: natural resistance-associated macrophage protein 1 (*Nramp1*) functions as a pH-dependent manganese transporter at the phagosomal membrane. **J. Exp. Med.,** v.192, p.1237-1247, 2000.

JAESCHKE, H. Chemokines, neutrophils, and inflammatory liver injury. **Shock,** 6: 397-402, 1996.

JAESCHKE, H.; SMITH, C. W. Cell adhesion an migration. III leukocyte adhesion and transmigration in the liver vasculature. **Am. J. Phisiol.,** v. 273, G1169-G1173, 1997.

JANEWAY, C. A. JR.; MEDZHITOV, R. Innate immune recognition. **Annu. Rev. Immunol.,** v. 20, p. 197–216, 2002.

JEAN-BAPTISTE, E.; Cellular mechanisms in sepsis. **J. Intensive Care Méd.,** v.22, p.63-72, 2000.

JENSEN, L. E.; WHITEHEAD, A. S. Regulation of serum amyloid A protein expression during the acute-phase response. **J. Biochem.,** v. 334, p 489–503, 1998.

JIANG, Z.; GEORGEL, P.; DU, X.; SHAMEL, L.; SOVATH, S.; MUDD, S.; HUBER, M.; KALIS, C.; KECK, S.; GALANOS, C.; FREUDENBERG, M.; BEUTLER, B. CD14 is required for MyD88-independent LPS signaling. **Nat. Immunol.,** v. 6, p. 565-70, 2005.

JIRILLO, E.; CACCAVO, D.; MAGRONE, T.; PICCIGALLO, E.; AMATI, L.; LEMBO, A.; KALIS, C.; GUMENSCHEIMER, M. The role of the liver in the response to LPS: experimental and clinical findings. **J. Endotoxin Res.**, v. 8, n.5, p-319-27, 2002.

KANG, Y. J.; KIM, S. O.; SHIMADA, S.; OTSUKA, M.; SEIT-NEBI, A.; KWON, B. S.; WATTS, T. H.; HAN, J. Cell surface 4-1BBL mediates sequential signaling pathways 'downstream' of TLR and is required for sustained TNF production in macrophages. **Nat. Immunol.,** v.8, n.6, p.601-9, 2007.

KAPADIA, S.; LEE, J.; TORRE-AMIONE, G.; BIRDSALL, H. H.; MA, T. S.; MANN, D. L. Tumor necrosis factor-alpha gene and protein expression in adult feline myocardium after endotoxin administration. **J. Clin. Invest.**, v.96, p.1042–52, 1995.

KAWAHARA, K.; SEYDEL, U.; MATSUURA, M.; DANBARA, H.; RIETSCHEL, E. T.; ZAHRINGER, U. Chemical structure of' glycosphingolipids isolated from *Sphingomonas paucimobilis*. **FEBS Lett.,** v. 292, p. 107-11-, 1991.

KAWAI, T.; AKIRA, S. Pathogen recognition with Toll-like receptors. **Curr. Opin. Immunol.,** v. 17, p. 338–344, 2005.

KITA, E.; EMOTO, M.; OKU, D.; NISHIKAWA, F.; HAMURU, A.; KAMIKAIDOU, N.; KASHIBA, S. Contribution of interferon gamma and membrane-associated interleukin 1 to the resistance to murine typhoid of Ity r mice. **J. Leukoc. Biol.,** v.51, p.244-250, 1992.

KITCHENS, R. L. Role of CD14 in cellular recognition of bacterial lipopolysaccharides. **Chem. Immunol.,** v.74, p.61-82, 2000.

KLEIN, A.; ZHADKEWICH, M.; MARGOLICK, J.; WINKELSTEIN, J.; BULKLEY, G. Quantitative discrimination of hepatic reticuloendothelial clearance and phagocytic killing. **J. Leukoc. Biol.,** v.55, p.248-252, 1994.

KLIMPEL, G. R.; GODOWSKI, P.; ZYCHLINSKY. A. Cell activation and apoptosis by bacterial lipoproteins through Toll-like receptor-2. **Science,** v. 285, p.736-9, 1999.

KMIEC, Z. Cooperation of liver cells in health and disease. **Adv. Anat. Embryol. Cell. Biol.,** v.161, p.3-13, 2001.

KNOLLE, P. A.; GERKEN, G. Local control of the immune response in the liver. **Immunol. Rev.,** v. 174, p. 21–34, 2000.

KNOLLE, P.A.; LÖSER, E.; PROTZER, U.; DUCHMANN, R.; SCHMITT, E.; ZUM BÜSCHENFELDE, K.H.; ROSE-JOHN, S.; GERKEN, G. Regulation of endotoxin-induced IL-6 production in liver sinusoidal endothelial cells and Kupffer cells by IL-10. **Clin. Exp. Immunol.,** v.107, p.555-61, 1997.

KOL, A.; LICHTMAN, A. H.; FINBERG, R. W.; LIBBY, P.; KURT-JONES, E. A. Heat Shock Protein (HSP) 60 Activates the Innate Immune Response: CD14 Is an Essential Receptor for HSP60 Activation of Mononuclear Cells. **J. Immunol.,** v. 164, p. 13–17, 2000.

KRAAL, G.; VAN DER LAAN, L. J.; ELOMAA, O.; TRYGGVASON, K. The macrophage receptor MARCO. Microbes Infect., v.2, p.313-6, 2000.

LANDONI, V. I.; VERMEULEN, M.; VAN ROOIJEN, N.; GÓMEZ, S.; PALERMO, M.; ISTURIZ, M. A.; ALVES-ROSA, F. Macrophage derived signalling regulates negatively the megakaryocyte compartment. **Cell Mol. Biol., Noisy-le-grand,** v.50, p. OL667-75, 2004

LANG, T.; PRINA, E.; SIBTHORPE, D.; BLACKWELL, J. M. *Nramp1* transfection transfer *Ity/Lsh/Bcg* – related pleiotropic effects on macrophage activation: influence on antigen processing and presentation. **Infect. Immun.,** v.65, p.380-386, 1997.

LEE, N. K.; LEE, Y. S. Modulation of Life and Death by the Tumor Necrosis Factor Receptor-Associated Factors (TRAFs). **J. Biochem. Mol. Biol.,** v. 35, n. 1, p. 61-66, 2002.

LEY, K. Arrest chemokines. **Microcirculation.** v. 10, p.289-95, 2003.

LEMAITRE, B.; NICOLAS, E.; MICHAUT, L.; REICHHART, J. M.; HOFFMANN, J.A. The dorsoventral regulatory gene cassette spätzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in Drosophila adults. **Cell,** v. 86, p. 973-83, 1996.

LEULIER, F.; LEMAITRE, B. Toll-like receptors - Taking an evolutionary approach. **Nat. Rev. Genet.,** v. 9, p. 165-78, 2008.

LI, J.; BURMEISTER, M. Genetical genomics: combining genetics with gene expression analysis. **Hum. Mol. Genet.,** v.14, p.163-169, 2005.

LIEBERMAN, A. P.; PITHA, P. M.; SHIN, H. S.; SHIN, M. L. Production of tumor necrosis factor and other cytokines by astrocytes stimulated with lipopolysaccharide or a neurotropic virus. **Proc. Natl. Acad. Sci.,** v.86, p.6348–52, 1989.

LITT, M.; LUTY, J. A. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. **Am. J. Hum. Genet.,** v.44, p.398-401, 1989.

LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis os relative gene expression data using Real-Time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C}t$ method. **Methods,** v.25, p. 402-408, 2001.

LOOS, M.; CLAS, F.; FISCHER, W. Interaction of purified lipoteichoic acid with the classical complement pathaway. **Infect. Immun.,** v. 53, p.595-599, 1986.

LÓPEZ-BOJÓRQUES, L. N.; DEHESA, A. Z.; REYES-TÉRAN, G. Molecular mechanisms involved in the pathogeneis of septic shock. **Arch. Med. Res.,** v.35, p.465-479, 2004.

LU, Y. C.; YEH, W. C.; OHASHI, P. S. LPS/TLR4 signal transduction pathway. **Cytokine,** v. 42, p.145–151, 2008.

LUSTER, M.I.; GERMOLEC, D.R.; YOSHIDA, T.; KAYAMA, F.; THOMPSON, M. Endotoxin-induced cytokine gene expression and excretion in the liver. **Hepatology,** v.19, n. 2, p.480-488, 1993.

MAGALHÃES, P. O.; LOPES, A. M.; MAZZOLA, P. G.; RANGEL-YAGUI, C.; PENNA, T. C. V.; PESSOA, A. JR. Methods of Endotoxin Removal from Biological Preparations: A Review. **J. Pharm. Pharmaceut. Sci.,** v. 10, p. 388-404, 2007.

MAHALINGAM, S.; KARUPIAH, G. Chemokines and chemokine receptors in infectious diseases. **Immunol. Cell Biol.,** v. 77, p.469-475, 1999.

MANDIGERS, C. M.; MEIJERINK, J. P.; RAEMAEKERS, J. M.; SCHATTENBERG, A. V.; MENSINK, E. J. Graft-versus-lymphoma effect of donor leucocyte infusion shown by real-time quantitative PCR analysis of t(14;18). **Lancet,** v.352, p.1522-3, 1998.

MARIA, D. A.; MANENTI, G.; GALBIATI, F.; RIBEIRO, O. G.; CABRERA, W. H.; BARRERA, R. G.; PETTINICCHIO, A.; DE FRANCO, M.; STAROBINAS, N.; SIQUEIRA,

M.; DRAGANI, T. A.; IBANEZ, O. M. Pulmonary adenoma susceptibility 1 (Pas1) locus affects inflammatory response. **Oncogene**, v. 22, n. 3, p. 426-432, 2003.

MARQUET, S.; ABEL, L.; HILLAIRE, D.; DESSEIN, H.; KALIL, J.; FEINGOLD, J.; et al. Genetic localization of a locus controlling the intensity of infection by *Schistossoma mansoni* on chromossome 5q31-q33. **Nat. Genet.,** v.14, p.181-184, 1996

MATSUURA, K.; ISHIDA, T.; SETOGUCHI, M.; HIGUCHI, Y.; AKIZUKI, S.; YAMAMOTO, S. Upregulation of mouse CD14 expression in Kupffer cells by lipopolysaccharide. **J. Exp. Med.,** v.179, p.1671–6, 1994.

MCNAB, G.; REEVES, J.L.; SALMI, M.; HUBSCHER, S.; JALKANEN, S.; ADAMS, D. H. Vascular adhesion protein 1 mediates binding of T cells to human hepatic endothelium. **Gastroenterology,** v.110, p.522–528, 1996.

MEANSA, T. K.; GOLENBOCK, D. T.; FENTONA, M. J. The biology of Toll-like receptors. **Cytokine Growth Factor Rev.,** v. 11, p.219-32, 2000.

MEDVEDEV, A. E.; FLO, T.; INGALLS, R. R.; GOLENBOCK, D. T.; TETI, G.; VOGEL, S. N.; ESPEVIK, T. Involvement of CD14 and Complement Receptors CR3 and CR4 in Nuclear Factor-kB Activation and TNF Production Induced by Lipopolysaccharide and Group B Streptococcal Cell Walls. **J. Immunol.,** v. 160, p. 4535–4542, 1998.

MEDZHITOV, R.; PRESTON-HURLBURT, P.; KOPP, E.; STADDLEN, A,. CHEN, C.; GOSH, S.; JANEWAY JR, C. A. Myd88 is an adaptador protein in the hToll/IL-1 receptor family signaling patways. **Mol. Cell.**, v. 2, p.253-258, 1998.

MEDZHITOV, R. Toll-like receptors and innate immunity. **Nat. Rev. Immunol.,** v.1, p.135-145, 2001.

MIYAKE, K. Innate recognition of lipopolysaccharide by CD14 and toll-like receptor 4-MD-2: unique roles for MD-2. **Int. Immunopharmacol.,** v. 3, p. 19– 128, 2003.

MIYAKE, K. Endotoxin recognition molecules, Toll-like receptor 4-MD-2. **Semin. Immunol.,** v. 16, p. 11–16, 2004.

MOORE, K.L.; NAGLE, D.L. Complex trait analysis in the mouse: the strengths, the limitations and the promisse yet to come. **Ann. Rev. Genet., v.** 34, p. 653-686, 2000.

MORIKAWA, A.; KOIDE, N.; KATO, Y.; SUGIYAMA, T.; CHAKRAVORTTY, D.; YOSHIDA, T.; YOCOCHI, T. Augmentation of nitric oxide production by gamma interferon in a mouse vascular endothelial cell line and its modulation by tumor necrosis factor alpha and lipopolysaccharide. **Infect. Immun.**, v. 68, p.6209-14, 2000.

MORRISSEY, P. J.; CHARRIER, K. GM-CSF administration augments the survival of *Ity*-resistant A/J mice, but not *Ity*-susceptible C57BL/6 mice, to a lethal challenge with *Salmonella typhimurium*. **J. Immunol.,** v.144, p.557-561, 1990.

MULLIGAN, M. S.; SMITH, C. W.; ANDERSON, D. C.; TODD III, R. F.; MIYASAKA, M.; TAMATAMI, T.; ISSEKUTZ, T. B.; WARD, P.A. Role of leukocyte adhesion molecules in complement-induced lung injury. **J. Immunol.,** v. 150, p.2401-2406, 1993.

MUNDER, M.; MALLO, M.; EICHMANN, K.; MODOLELL, M. Murine macrophages secrete interferon g upon combined stimulation with interleukin (IL)-12 and IL-18: a novel pathway of autocrine macrophage activation. **J. Exp. Med.,** v.187, p. 2103-8, 1998.

MURPHY, E. E.; TERRES, G.; MACATONIA, S. E.; HSIEH, C. S.; MATTSON, J.; LANIER, L.; WYSOCKA, M.; TRINCHIERI, G.; MURPHY, K.; O'GARRA, A. B7 and interleukin 12 cooperate for proliferation and interferon g production by mouse T helper clones that are unresponsive to B7 costimulation. **J. Exp. Med.,** v. 180, p.223-31, 1994.

MUZIO, M.; BOSISIO, D.; POLENTARULLI, N.; et al.; Differential expression and regulation of Toll-like receptors (TLR) in human leukocytes: selective expression of TLR3 in dendritic cells. **J. Immunol.,** v.164, p.5998-6004, 2000.

NAGAI, Y.; AKASHI, S.; NAGAFUKU, M.; OGATA, M.; IWAKURA, Y.; AKIRA, S.; KITAMURA, T.; KOSUGI, A.; KIMOTO, M.; MIYAKE, K. Essential role of MD-2 in LPS responsiveness and TLR4 distribution. **Nat. Immunol.,** v. 3, p. 667–672, 2002.

NAGAI, Y.; SHIMAZU, R.; OGATA, H.; AKASHI, S.; SUDO, K.; YAMASAKI, H.; HAYASHI, S. I.; IWAKURA, Y.; KIMOTO, M.; MIYAKE, K. Requirement for MD-1 in cell surface expression of RP105/CD180 and B-cell responsiveness to lipopolysaccharide. **Blood,** v. 99, p. 1699-1705, 2002.

NEUHAUS, T.; TOTZKE, G.; GRUENEWALD, E.; JUESTEN, H. P.; SACHINIDIS, A.; VETTER, H.; Tumour necrosis factor-alpha gene expression and production in human umbilical arterial endothelial cells. **Clin. Sci., Lond.,** v.98, p.461–70, 2000.

OERTLI, B.; BECK-SCHIMMER, B.; FAN, X.; WUTHRICH, R. P. Mechanisms of hyaluronan-induced up-regulation of ICAM-1 and VCAM-1 expression by murine kidney tubular epithelial cells: hyalurunan triggers cell adhesion molecule expression through a mechanism involving activation of nuclear fator-kappa B and activating protein-1**. J. Immunol.,** v. 161, p.3431-3437, 1998.

OGLE, C. K.; GUO, X.; HASSELGREN, P. O.; OGLE, J.D.; ALEXANDER, J. W. The gut as a source of inflammatory cytokines after stimulation with endotoxin. **Eur. J. Surg.,** v.163, p.45–51, 1997.

OKAMURA, H.; KASHIWAMURA, S.; TSUTSUI, H.; YOSHIMOTO, T.; NAKANISHI, K. Regulation of interferon-gamma production by IL-12 and IL-18. **Curr. Opin. Immunol.**, v.10, p.259-264, 1998.

OPAL, S.M. Clinical trial design and outcomes in patients with severe sepsis. **Shock**, v.20, p.295-302, 2003.

OVERBERGH, L.; VALCKX, D.; WAER, M.; MATHIEU, C. Quantification of murine cytokine mRNAs using real time quantitative reverse transcriptase PCR. **Cytokine,** 11:305-312, 1999.

OZMEN, L.; PERICIN, M.; HAKIMI, J.; CHIZZONITE, R. A.; WYSOCKA, M.; TRINCHIERI, G.; GATELY, M.; GAROTTA, G. Interleukin 12, interferon g, and tumor necrosis factor a are the key cytokines of the generalized Shwartzman reaction. **J. Exp. Med.,** v.180, p.907-15, 1994.

PANACEK, E.; KAUL, M. IL-6 as a marker of excessive TNF-α activity in sepsis. **Sepsis**, 3:65-73, 1999.

PAPADAKIS, K. A.; TARGAN, S. R. Tumor necrosis factor: biology and therapeutic inhibitors. **Gastroenterology,** v.119, p.1148-57, 2000.

PASARE, C.; MEDZHITOV, R. Toll-like receptors: Linking innate and adaptive immunity. **Microbes Infect.,** v.6, p.1382–1387, 2004.

PARKER, G. A.; PICUT, C. A.; Liver immunobiology. **Toxicol. Pathol.,** v.33, p.52-62, 2005.

PATERSON, A. H. **Genome mapping in plants**. New York: Academic Press, 1996. p.330.

PERERA, P. Y.; MAYADAS, T. N.; TAKEUCHI , O.; AKIRA, S.; ZAKS-ILBERMAN, M.; GOYERT, S. M.; VOGEL, S. N. CD11b/CD18 Acts in Concert with CD14 and Toll-Like Receptor (TLR) 4 to Elicit Full Lipopolysaccharide and Taxol-Inducible Gene Expression. **J. Immunol.,** v. 166, p. 574–581, 2001.

PETERS, L. C.; JENSEN, J. R.; BORREGO, A.; CABRERA, W. H. K.; BAKER, N.; STAROBINAS, N.; RIBEIRO, O. G.; IBANEZ, O. M.; DE FRANCO, M. *Slc11a1* (formerly *Nramp1*) gene modulates both acute inflammatory reaction and pristane-induced arthritis in mice. **Gennes Immun.,** v. 8, p. 51-6, 2006.

PETSCH, D.; ANSPACH, F. B. Endotoxin removal from protein solutions. **J. Biotechnol.,** v. 76, p. 97–119, 2000.

PFEFFER, K.; MATSUYAMA, T.; KUNDIG, T. M.; WAKEHAM, A.; KISHIHARA, K.; SHAHINIAN, A.; WIEGMANN, K.; OHASHI, P. S.; KRONKE, M.; MAK, T. W. Mice deficient for the 55 kd tumor necrosis factor receptor are resistant to endotóxico shock, yet succumb *to L. monocytogenes* infection. **Cell,** v.73, p.457-67, 1993.

POLTORAK, A.; SMIRNOVA, I.; HE, X. Genetic and physical mapping of the Lps locus: identification of the toll-4 receptor as a candidate gene in the critical region. **Blood Cells Mol Dis,** v.24, p.340-355, 1998.

PUDDU, P.; GANTUZZI, L.; BORGHI, P.; VARANO, B.; RAINALDI, G.; GUILLEMARD, E.; MALORNI, W.; NICAISE, P.; WOLF, S. F.; BELARDELLI, F.; GESSANI, S. IL-12 induces IFN-g expression and secretion in mouse peritoneal macrophages. **J. Immunol.,** v.159, p.3490-7, 1997

PUGIN, J.; HEUMANN, D.; TOMASZ, A.; KRAVCHENKO, V. V.; AKAMATSU, Y.; NISHIJIMA, M.; GLAUSER, M. P.; TOBIAS, P.; ULEVITCH, R. J. CD14 is a pattern recognition receptor. **Immunity,** v. 1, p. 509-16, 1994.

QIU, D. K.; HUA, J.; LI, J. Q.; LI, E. L. CD14 expression on Kupffer cells during the course of carbon tetrachloride-mediated liver injury. **Chin. J. Dig. Dis.,** v.6, p. 137–41, 2005.

QUERESHI, S. T.; LARIVIERI, L.; LEVEQUE, G. Endotoxin-tolerant mice have mutation in Toll-like receptor 4 (Tlr4). **J. Exp. Med.,** v.189, p.615-625, 1999.

QUEZADO, Z. M. N.; HOFFMAN, W. D.; WINKELSTEIN, I.; YATSIV, C. A.; KOEV, C. A.; CORK, L. C.; ELIN, R. J.; EICHACKER, P. Q.; NATANSON, C. The third component of complement protects against *Escherichia coli* endotoxin-induced shock and multiple organ failure. **J. Exp. Med.,** v. 179, p.569-578, 1994.

QURESHI, S. T.; MEDZHITOV, R. Toll-like receptors and their role in experimental models of microbial infection. **Genes Immun.,** v.4, p. 87-94, 2003.

RACANELLI, V.; REHERMANN, B. The liver as an immunological organ. **Hepatology,** v.43, p.as54-as62, 2006.

RAETZ, C. R. H.; REYNOLDS, C. M.; TRENT, M. S.; BISHOP, R. E. Lipid A Modification Systems in Gram-Negative Bacteria. **Annu. Rev. Biochem.,** v. 76, p. 295–329, 2007.

RAMADORI, G.; ARMBRUST, T. Cytokines in the liver. **Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.,** v.13, p.777-84, 2001

RAMADORI, G.; MEYER ZUM BUSCHENFELDE, K. H.; TOBIAS, P. S.; MATHINSON, J. C.; ULEVITCH, R. Biosynthesis of lipopolysaccharide-binding protein in rabbit hepatocytes. **Pathobiology,** v. 58, p.89-94, 1990.

RAMARATHINAM, L.; NIESEL, D. W.; KIMPEL, G. R. Ity influences the production of IFN-gamma by murine splenocytes stimulated in vitro with Salmonella typhimurium. **J. Immunol.,** v.150, p.3965-3972, 1993.

RAYMOND, F.; SHEETAL, H.; JOLENE, T. A.; MAYFAIR, K. HOLIAN, A. MARCO Mediates Silica Uptake and Toxicity in Alveolar Macrophages from C57BL/6 Mice. **J. Biol. Chem.,** v. 281, n. 45, p. 34218–34226, 2006

REED, L. J.; MUENCH, H. A simple method of estimating fifty percent endpoints. **Am. J. Hyg.,** v.55, p.268-275, 1952.

REUTERSHAN, J.; LEY, K. Bench-to-bedside review: Acute respiratory distress syndrome – how neutrophils migrate into the lung. **Crit. Care**, v 8, p.453-461, 2004.

RIBEIRO, O.G.; MARIA, D.A.; ADRIOUCH, S.; PECHBERTY, S.; CABRERA, W.H.; MORISSET, J.; IBAÑEZ, O.M.; SEMAN, M. Convergent alteration of granulopoiesis,

chemotactic, and neutrophil apoptosis during mouse selection for high acute inflammatory response. **J. Leukc. Biol.,** v.74, n.4,p. 497-506, 2003.

RIETSCHEL, E. T.; BRADE, H.; HOLST, O.; BRADE, L.; MÜLLER-LOENNIES, S.; MAMAT, U.; ZÄHRINGER, U.; BECKMANN, F.; SEYDEL, U.; BRANDENBURG, K.; ULMER, A. J.; MATTERN, T.; HEINE, H.; SCHLETTER, J.; LOPPNOW, H.; SCHÖNBECK, U.; FLAD, H. D.; HAUSCHILDT, S.; SCHADE, U. F.; DI PADOVA, F.; KUSUMOTO, S.; SCHUMANN, R. R. Bacterial endotoxin: Chemical constitution, biological recognition, host response, and immunological detoxification. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.,** v. 216, p. 39-81, 1996.

RIETSCHEL, E. T.; BRADE, H.; HOLST, O.; BRADE, L.; MULLER-LOENNIES, S.; MAMAT, U.; et al. Bacterial endotoxin: chemical contitution, biological recognition, host response and immunological detoxification. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.,** v.26, p.256-274, 1996.

RIETSCHEL, E. T.; CAVAILLON, J. M. Richard Pfeiffer and Alexandre Besredka: Creators of the concept of endotoxin and anti-endotoxin. **Microbes Infect.,** v.5, p. 1407–1414, 2003.

RIETSCHEL, E. T.; KIRIKAE, T.; SCHADE, F. U. Bacterial endotoxin: molecular relationships of struture to activity and function. **FASEB. J.,** v.8, p.217-225, 1994.

RITSCHEL, E. T.; BRADE, H. Bacterial endotoxins. **Sci. Am.,** v. 267, p. 54-61, 1992.

RODRIGUES, V. Jr.; PIPER, K.; COUISSINER-PARIS, P.; BACELAR, O.; DESSEIN, H.; DESSEIN, A. J. Genetic control of schistosome infections by the SM1 locus of the 5q31-q33 region is liked to differentiation of type 2 helper T lymphocytes. **Infect. Immun.,** v.67, p.4689-4692, 1999.

ROGER, T.; PÉPIN, L. F.; COUDERC, J.; DE FRANCO, M.; SEMAN, M. Co-selection of the rare T cell receptor-gamma B haplotype in mouse lines selected for low responsiveness to red blood cell antigens. **Eur. J. Immunol.,** v.23, p.287-290, 1993.

ROLANDO, N.; WADE, J.; DAVALOS, M.; WENDON, J.; PHILPOTT-HOAWARD, J.; WILLIAMS, R. The systemic inflammatory response syndrome in acute liver failure. **Hepatology,** v.32, p.734-739, 2000.

SALKOWSKI, C. A., THOMAS, K. E.; CODY, M. J.; VOGEL, S. Impaired IFN-g Production in IFN Regulatory Factor-1 Knockout Mice During Endotoxemia Is Secondary to a Loss of Both IL-12 and IL-12 Receptor Expression. **J. Immunol.,** v.165, p.3970–77, 2000.

SALLES, M. J. C.; SPROVIERI, S. R. S.; BEDRIKOW, R.; PEREIRA, A. C.; CARDENUTO, S. L.; AZEVEDO, P. R. C.; SILVA, T. M.; GOLIN, V. Síndrome da resposta inflamatória aguda sistêmica / sepse – Revisão e estudo da terminologia e fisiopatologia. **Rev. Assoc. Med. Brás.,** v. 45, p.86-92, 1999.

SANT'ANNA, O. A.; IBAÑEZ, O. M.; DE FRANCO, M.; MASSA, S.; CABRERA, W. H.; RIBEIRO, O. G.; et al. Genetic control of innate and acquired immunity. **Ciênc. Cult.,** v.46 n.5-6, p.363-367, 1994.

SCHENA, M.; SHALON, D.; DAVIS, R. W.; BROWN, P. O. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. **Science,** v.270, p.467-70, 1995.

SCHMITZ, G.; ORSÓ, E. CD14 signalling in lipid rafts: new ligands and co-receptors. **Curr. Opin. Lipidol.,** v. 13, p. 513-21, 2002.

SCOTT, M. J.; LIU, S.; SU, G. L.; VODOVOTZ, Y.; BILLIAR, T. R. Hepatocytes enhace effects of lipopolysaccharide on liver nonparenchymal cell through close cell interactions. **Shock,** v.23, p.453-458, 2005.

SCHINDLER, R.; MANCILLA, J.; ENDRES, S.; GHORBANI, R.; CLARCK, S.; DINARELLO, C. Correlations and interactions in the production of interleukin-6 (IL-6), IL-1, and tumor necrosis factor (TNF) in human blood mononuclear cells: Il-6 supresses IL-1 and TNF. **Blood,** v.75, p.40-47, 1990.

SEBASTIANI, G.; OLIEN, L.; GAUTHIER, S.; SKAMENE, E.; MORGAN, K.; GROSS, P.; et al. Mapping of genetic modulators of natural resistance to infection with Salmonella typhimurium in wild-derived mice. **Genomics,** v.47, p.180-186, 1998.

SEKI, S.; HABU, Y.; KAWAMURA, T.; TAKEDA, K.; DOBASHI, H.; OHKAWA, T.; HIRAIDE, H. The liver is a crucial organ in the first line of host defense: the roles of Kupffer cells, natural killer (NK) cells and NK1.1 Ag+ T cells in the helper 1 immune responses. **Immmun. Rev.,** v.174, p.35-46, 2000.

SEKI, S.; OSADA, S. I.; ONO, S.; AOSASA, S.; HABU, Y.; NISHIKAGE, T.; MOCHIZUKI, H.; HIRAIDE, H. Role of Liver NK Cells and Peritoneal Macrophages in Gamma Interferon and Interleukin-10 Production in Experimental Bacterial Peritonitis in Mice. **Infect. Immun.,** v.66, p. 5286–94, 1998.

SEKI, S.; OSADA, S.; ONO, S.; AOSASA, S.; HABU, Y.; NISHIKAGE, T.; MOCHIZUKI, H.; HIRAIDE, H. Role of Liver NK Cells and Peritoneal Macrophages in Gamma Interferon and Interleukin-10 Production in Experimental Bacterial Peritonitis in Mice. **Infect. Immun.,** v.66, p.5286-94, 1998.

SETH, K.; BANKEY, P. The liver as an immune organ. **Curr. Opin.Crit. Care,** v.7, p.99-104, 2001.

SEYDEL, U.; HAWKINS, L.; SCHROMM, A. B.; HEINE, H.; SCHEEL, O.; KOCH, M. H. J.; et al. The generalized endotoxic principle. **Eur. J. Immunol.,** v.33, p.1586-1592, 2003.

SHALABY, M.R.; WAAGE, A.; AARDEN, L.; ESPEVIK, T. Endotoxin, tumor necrosis factor-alpha and interleukin 1 induce interleukin 6 production in vivo. **Clin. Immunol. Immunopathol.,** v.53, p.488-98, 1989.

SILVA, E.; PASSOS, R. D. H.; FERRI, M. B.; POLI DE FIGUEIREDO, L. F. Sepsis: From bench to bedside. **Clinics,** v. 63, p. 109-120, 2008, Review.

SKEEN, M. J.; MILLER, M. A.; SHINNICK, T. M.; ZIEGLER, H. K. Regulation of murine macrophage IL-12 production: activation of macrophages in vivo, restimulation in vitro, and modulation by other cytokines. **J. Immunol.,** v. 156, p.1196-206, 1996.

STIFFEL, C.; IBAÑEZ, O. M.; RIBEIRO, O. G.; DECREUSEFOND, C.; MOUNTON, D.; SIQUEIRA, M.; BIOZZI, G. Genetic acute inflammation reactions in inbred lines of mice and their interline crosses. **Exp. Clin. Immunogenetics,** v. 7, p.221-233, 1990.

STOBER, C. B.; BRODE, S.; WHITE, J. K.; POPOFF, J. F.; BLACKWELL, J. M. *Slc11a1*, Formerly *Nramp1*, Is Expressed in Dendritic Cells and Influences Major Histocompatibility Complex Class II Expression and Antigen-Presenting Cell Function. **Infect. Immun.,** v. 75, p. 5059–5067, 2007.

SU, G. L. Lipopolysaccharides in liver injury: molecular mechanisms of Kupffer cell activation. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.,** v. 283, p.G256–G265, 2002;

SULTZER, B. M. Genetic control of leucocyte responses to endotoxin. **Nature,** v.219, p.1253-1254, 1968.

SUMPIO, B. E.; RILEY, J. T.; DARDIK, A. Cells in focus: endothelial cell. **Int. J. Biochem. Cell Biol.,** v. 34, p. 1508-12, 2002.

TABRIZI, A. R.; ZEHNBAUER, B. A.; FREEMAN, B. D.; BUCHMAN, T. G. Genetic Markers in Sepsis. **J. Am. Coll. Surg.,** v.192, p.106-117, 2001.

TAKAHASHI, M.; OGASAWARA, K.; TAKEDA, K.; HASHIMOTO, W.; SAKIHARA, H.; KUMAGAI, K.; ANZAI, R.; SATOH, M.; SEKI, S. LPS induces NK1.11 ab T cells with potent cytotoxicity in the liver of mice via production of IL-12 from Kupffer cells. **J. Immunol.,** v.156, p.2436–42, 1996.

TAKASHIMA, K.; TATEDA, K.; MATSUMOTO, T.; IIZAWA, Y.; NAKAO, M.; YAMAGUCHI, K. Role of tumor necrosis factor alpha in pathogenesis of *pneumococcal pneumonia* in mice. **Infect. Immun.,** v.65, p.257-60, 1997.

TAKEUCHI, O.; SATO, S.; HORIUCHI, T.; HOSHINO, K.; TAKEDA, K.; DONG, Z.; MODLIN, R. L.; AKIRA S. Cutting Edge: Role of Toll-Like Receptor 1 in Mediating Immune Response to Microbial Lipoproteins. **J. Immunol.,** v. 169, p. 10–14, 2002.

THOMAS, K. E.; GALLIGAN, C. L.; NEWMAN, R. D.; FISH, E. N.; VOGEL, S. Contribution of Interferon- to the Murine Macrophage Response to the Toll-like Receptor 4 Agonist, Lipopolysaccharide. **J. Biol. Chem.,** v. 281, p. 31119–31130, 2006.

TILG, H.; TREHU, E.; ATKINS, M.; DINARELLO, C.; MIER, J. Interleukin 6 (IL-6) as an anti-inflammatory cytokine: Induction of circulating IL-1 receptor antagonist and soluble tumor necrosis factor receptor p55. **Blood**, v.83, p.113-118, 1994.

TOELLNER, K-M.; SCHEEL-TOELLNER, D.; SEITZER, U.; SPRENGER, R.; TRÜMPER, L.; SCHLÜLTER, C.; et al. The use of reverse transcripton polymerase chain reaction to analyse large numbers of mRNA species from a single cell. **J. Immunol. Methods,** v.191, p.71-75, 1996.

TRACEY, K. J.; CERAMI, A. Tumor necrosis factor-deficient, mice. **J. Exp. Med.,** 187, p.1517-28, 1998.

TREZENA, A. G.; SOUZA, C. M.; BORREGO, A.; MASSA, S.; SIQUEIRA, M.; DE FRANCO, M.; et al. Co-localization of Quantitative trait loci regulating resistance to *Salmonella Typhimurium* infection and specific antibody production phenotypes. **Microbes Infect.,** v.4, p.1409-1415, 2002.

TRINCHIERI, G.; SHER, A. Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence. **Nat. Rev. Immunol.,** v. 7, p. 179-190, 2007.

TSIOTOU, A. G.; SAKORAFAS, G. H.; ANAGNOSTOPOULOS, G.; BRAMIS, J. Septic shock; current pathogenic concepts from a clinical prespective. **Med. Sci. Monit.,** v. 11, p. RA76-85, 2005.

UNDERHILL, D. M. Toll-like receptors: networking for sucess. **Eur. J. Immunol.,** v.33, p.1767-1775, 2003.

UNDERHILL, D. M.; OZINSKI, A. Toll-like receptors: key mediators of microbe detection. **Curr. Opin. Immunol.,** v.14, p.103-110, 2002.

VALDEZ, Y.; DIEHL, G. E.; VALLANCE, B. A.; GRASSL, G. A.; GUTTMAN, J. A.; BROWN, N. F.; ROSENBERGER, C. M.; LITTMAN, D. R.; GROS, P.; FINLAY, B B. *Nramp1* expression by dendritic cells modulates inflammatory responses during *Salmonella* Typhimurium infection. **Cell. Microbioll.,** v. 10, p.1646-61, 2008.

VALDEZ, Y,; GRASSL, G. A.; GUTTMAN, J. A.;COBURN, B.; GROS, P.; VALLANCE, B. A.; FINLAY, B B. Nramp1 drives an accelerated inflammatory response during Salmonella-induced colitis in mice. **Cell. Microbioll.,** v. 11, p.351-62, 2009.

VAN AMERSFOORT, E.S.; VAN BERKEL, T.J.C.; KUIPER, J. Receptors, mediators, and mechanisms involved in bacterial sepsis and septic shock. **Clin. Microbiol. Rev.,** v.16, n. 3, p.379-414, 2003.

VAN DER POLL, T.; LEVI, M.; ERIK HACK, C.; TEN CATE, H. VAN DEVENTER, S. J. H.; EERENBERG, A. J. M.; DE GROOT, E. R.; JANSEN, J.; BLILLER, H. G. H. R.; TEN CATE, J. W.; AARDEN, L. A. Elimination of Interleukln 6 Attenuates Coagulation Activation in Experimental Endotoxemia in Chimpanzees. **J. Exp. Med.,** v.179, p.1253-1259, 1994.

VAN SNICK, J. Interleukin 6 (IL-6): an overview . **Annu. Rev. Immunol.,** v.8, p.253-278, 1990.

VAN ZEE, K. et al. Effects of intravenous IL-8 administration in nonhuman primates. **J. Immunol.,** v.148, p.1746-1752, 1992.

VASQUEZ-BRAVO, Y. L. A. R. **Aspecto da resposta inflamatória aguda em linhagens de camundongos com reatividade máxima (AIRmax) e mínima (AIRmin) obtidas por seleção genética bidirecional.**, Tese (Doutorado em Imunologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1996.

VIDAL, S. M.; PINNER, E.; LEPAGE, P.; GAUTHIER, S.; GROS, P. Natural resistance to intracellular infections: Nramp1 encodes a membrane phosphoglycoprotein absent in macrophages from susceptibile (*Nramp1* D169) mouse strains. **J. Immunol.,** v.157, p.3559-3568, 1996.

VIGAR, N. D.; CABRERA,W. K.; ARAUJO, L. M. M.; RIBEIRO, O. G.; OGATA, T. R. P.; SIQUEIRA, M.; IBAÑEZ, O. M.; DE FRANCO, M.. Pristane-induced arthritis in mice selected for maximal or minimal acute inflammatory reaction. **Eur. J. Immunol.,** v.30, p.431-437, 2000.

VISINTIN, A.; ILIEV, D. B.; MONKS, B. G.; HALMEN, K. A.; GOLENBOCK, D. T. MD-2. **Immunobiology,** v. 211, p. 437–447, 2006.

VIVES-PI, M.; SOMOZA, N.; FERNÁNDEZ-ALVAREZ, J.; VARGAS, F.; CARO, P.; ALBA, A.; GOMIS, R.; LABETA, M. O.; PUJOL-BORRELL, R. Evidence of expression of endotoxin receptors CD14, toll-like receptors TLR4 and TLR2 and associated molecule MD-2 and of sensitivity to endotoxin (LPS) in islet beta cells. **Clin. Exp. Immunol.,** v. 133, p. 208–218, 2003.

VON ASMUTH, E. J.; DENTENER, M. A.; CESKA, M.; BUURMAN, W. A. IL-6, IL-8 and TNF production by cytokine and lipopolysaccharide-stimulated human renal cortical epithelial cells in vitro. **Eur. Cytokine Netw.,** v.5, p.301–10, 1994.

VORRARO, F. **A infecção pelo *Trypanosoma cruzi* em linhagens geneticamente selecionadas para a produção de anticorpos ou para a reatividade inflamatória aguda**. 89 f. Dissertação (Mestrado em Ciências – Imunologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

WALKER, K.B. Detection and analysis of cytokine mRNA in tissues and cell lines. [Protocol]. **J. Immunol. Methods,** v.212, p.113-123, 1998.

WARNER, S. J.; LIBBY, P. Human vascular smooth muscle cells. Target for and source of tumor necrosis factor. **J. Immunol.,** v. 142, p.100–9, 1989.

WATTERS, T. M.; KENNY, E. F.; O'NEILL, L. A. J. Structure, function and regulation of the Toll/IL-1 receptor adaptor proteins. **Immunol. Cell Biol.,** v. 85, p. 411–419, 2007.

WEIGHARDTA, H.; HOLZMANN, B. Role of Toll-like receptor responses for sepsis pathogenesis. **Immunobiology,** v. 212, p. 715–722, 2008.

WESTPHAL, O.; JANN, K. Bacterial lipopolysaccharides: extraction with phenol-water and further applications of the procedure. **Methods Carbohydr. Chem.,** v. 5, p.83-91, 1965.

WHEATHON, A. D.; SPOONCER, E. Role of cytokines and extracellular matrix in the regulation of haemopoietic steam cells. **Curr. Opin. Cell. Biol.,** v.10, p.721-726, 1998.

WOJCIECHOWSKI, W.; DESANCTIS, J.; SKAMENE, E.; RADZIOCH, D. Attenuation of MHC class II expression in macrophages infected with Micobacterium bovis BCG involves class II transactivator and depends on the Nramp1 gene. **J. Immunol.,** v.163, p.2688-2696, 1999.

WORRAL, N.K.; CHANG, K.; LEJEUNE, W.S.; MISKO, T.P.; SULLIVAN, P.M.; FERGUNSON, T.B. Jr.; WILLIAMSON, J.R.; TNF-alpha causes reversible in vivo systemic vascular barrier dysfunction via NO-dependent and-independent mechanisms. **Am. J. Physiol.,** v.273, p.2565-2574, 1997.

WYCKOFF, T. J. O.; RAETZ, C. R. H.; JACKMAN, J. E. Antibacterial and anti-inflammatory agents that target endotoxin. **Trends Microbiol.,** v. 6, p. 154-159, 1998.

WYLLIE, P. S.; GOSS, J. A. The natural resistance-associated macrophage protein 1 *Slc11a1* (formely *Nramp1*) and iron metabolism in macrophages. **Microbes Infect.,** v.4, p.351-359, 2002, Review.

WYSOCKA, M.; KUBIN, M.; VIEIRA, L. Q.; OZMEN, L.; GAROTTA, G.; SCOTT, P.; TRINCHIERI, G. Interleukin-12 is required for interferon-g production and lethality in lipopolysaccharide-induced shock in mice. **Eur. J. Immunol.**, v.25, p.672-6, 1995.

YING, S. C.; JIANG, H.; KIM, Y. B.; GEWURZ, H. C1q peptides bind endotoxin and inhibit endotoxin-initiated activation of the classical complement pathaway. **J. Immunol.,** v. 150, p.304, 1993.

YONG, K. L.; LINCH, D. C. Granulocyte-macrophage-colony-stimulating factor differentially regulates neutrophill migration across IL-1 actived and nonactived human endothelium. **J. Immunol.,** 150: 2449-2456, 1993.

ZWEIGNER, J.; SCHUMANN, R. R.; WEBER. JR. The role of lipopolysaccharide-binding protein in modulating the innate immune response. **Microbes Infect.,** v. 8, p. 946-52, 2006.