Tatiana Martins Venancio

**A proteína de transferência de colesterol esterificado humana
protege camundongos da sepse polimicrobiana e atenua a
resposta inflamatória em macrófagos estimulados com
lipopolissacarídeo**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção
do título de Mestre em Ciências

Programa de Endocrinologia

Orientadora: Profa. Dra. Patrícia Miralda Cazita

São Paulo

2014

Este estudo foi realizado no Laboratório de Lípidos (LIM10) do Serviço de Endocrinologia e Metabologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Este projeto foi desenvolvido com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) – Bolsa de Mestrado: 2011/04302-6 e projeto regular 2012/22422.

Aos meus pais Joana e Sebastião (*i.m.*) por todo amor e dedicação
incondicionais ao longo de todos esses anos.

À minha irmã Juliana pelo amor e companheirismo.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Dra. Patrícia Miralda Cazita, por me ensinar a fazer pesquisa, por me proporcionar participar deste projeto tão relevante e interessante que fez com que eu me apaixonasse pela ciência. E por ter sido uma mãezona, me aconselhando tanto profissionalmente como pessoalmente. Agradeço pela paciência nos momentos mais difíceis deste projeto.

Ao Dr. Eder Quintão por ser um exemplo de pesquisador, por me inspirar, pela humildade de compartilhar seus conhecimentos científicos e também os não científicos. Minha eterna admiração e gratidão.

À Dra. Edna Nakandakare pela disponibilidade e serenidade de sempre, por me ouvir pacientemente sempre que a procurei, pelos auxílios na elaboração do projeto, nos testes estatísticos e pelas correções da dissertação.

Ao Dr. Francisco Soriano por todo auxílio neste projeto, por me ensinar a fazer CLP, por todas as discussões científicas, pela simpatia e disponibilidade.

À Dra. Valéria Nunes por toda sua dedicação ao trabalho como pesquisadora, por ser essencial na vida científica de todos do LIM-10, pelo auxílio nas inúmeras técnicas que domina com destreza, pelo companheirismo e, principalmente, por ser tão doce.

Ao Dr. Sérgio Catanozi por ter se tornado um grande amigo e parceiro, por sempre ter uma palavra de consolo, um chocolate e um pão de queijo nos finais de tarde em que os experimentos davam errado, pelos ensinamentos sobre como trabalhar com camundongos e pela humildade de trocar seu amplo conhecimento científico ao longo de todos esses anos.

À Dra. Marisa Passarelli pelo grande profissionalismo, pelos ensinamentos, pelas ótimas aulas e por influenciar de forma direta e indireta o modo de fazer pesquisa de todos do LIM-10.

À Dra. Roberta Machado por todo companheirismo, pelos conselhos, pelas conversas divertidas, pela paciência, por me auxiliar ao longo desta pesquisa ajudando nos experimentos e por sempre discutir meus dados com muita empolgação.

À Dra. Ana Maria Lottenberg pela troca de ideias, pelas considerações na banca da qualificação e pelos ensinamentos sobre nutrição.

À minha amiga e parceira Juliana Tironi, por ser ótima companheira, aguentar meu mau humor, chorar e rir junto comigo, me ouvir mesmo discordando de tudo e me aconselhar. Foi um prazer imenso iniciar e encerrar o mestrado ao seu lado, compartilhando tantos momentos nesses seis anos. Sem você tudo teria sido muito mais árduo!

Ao Diego Gomes, por ser tão divertido, aturar meu mau humor, pelas aulas de inglês, por me ajudar a desestressar nos nossos *happy hours*, pela ótima viagem à Paraíba e por ser tão parceiro e amigo em todas as horas.

À Milessa Afonso pela amizade e companheirismo, pelas conversas e parceria de todos os dias, por animar o laboratório com suas cantorias e alto astral, por gravar as músicas que peço e por abrir a porta da sua casa para inesquecíveis momentos de alegria.

À Paula Ramos pelas caronas, pelas dicas de direção e conversas animadas no bandeirão.

À Karol Santana por sempre ser tão meiga e companheira, pelo “Pode vir, Tatinha” e pela companhia no cinema (mesmo nos filmes ruins).

À Fernanda Fusco pela parceria, pela amizade, por todas nossas conversas animadas e “deprês” e por ser tão meiga e querida.

À Maria Silvia pelas caronas em São Paulo e Campinas, pelas conversas, conselhos e saudáveis discussões políticas e filosóficas.

À Cláudia Souza por todo o apoio durante todos esses anos, por responder todas as minhas questões, por sempre solucionar os problemas burocráticos, pelas conversas animadas e pela companhia simpática nos almoços.

À Dra. Camila Canteiro por todo apoio no final da iniciação científica e início do Mestrado, principalmente com a técnica de PCR. Por ter sempre belas e doces palavras para dizer, pela simpatia e paciência.

À Dra. Gabriela Castilho por sempre me fazer rir, pelas longas conversas sobre inúmeros assuntos, por ser sempre a “menos fofa do laboratório”, pela ajuda

com a minha primeira aula em inglês, pela humildade de compartilhar seus conhecimentos.

À Dra. Ligia Okuda por me ensinar a fazer ELISA, pela paciência e dedicação com todos os iniciantes no laboratório e por ser, apesar de rígida, uma pessoa tão doce e paciente.

Ao Dr. Rodrigo Iborra por me auxiliar desde o primeiro dia no laboratório, me pregando peças, mas sempre respondendo meus questionamentos, por me ensinar a fazer Western Blot, BCA, LDH e outras técnicas das quais nem me lembro, pela parceria, conversas no bandeirão, discussões políticas ferrenhas e por ser tão companheiro.

À Dra. Adriana de Lima por ser tão fofa, atenciosa e ótima profissional, sempre preocupada com o bem de todos, por sempre trazer lembrancinhas das viagens que faz, pelo auxílio na sala de cultura e por sempre responder a todas as minhas questões sobre formatação e burocracias em geral tão pacientemente.

À Fabiana Ferreira por tantas vezes me ajudar nos experimentos, por responder a todos meus questionamentos, pela simpatia e gentileza que são sua marca registrada.

À Kelly Gomes por ter entrado no laboratório e nos ajudado na organização, por ser tão simpática, sempre disponível e pela ajuda nos ELISAs.

À geração intermediária do LIM-10, sempre parceiros: Lis Mie, Bruna Lacerda e Guilherme Ferreira obrigada pela convivência.

Aos que já não estão mais no laboratório, mas que me ajudaram de algum modo no início da minha jornada científica: Raphael Pinto, Débora Rocco, Karina Almeida, Alessandra Carreiro, Simone Batista, Patrícia Rios, Maria Olívia e Renata Bombo.

À Jussara Rocha pela ajuda no início da pesquisa, pelas preparações de reagentes e organização do laboratório e pela simpatia de sempre.

À Cida e à Senária Egutti pela simpatia e por sempre sanarem minhas dúvidas sobre burocracias da pós-graduação.

À Rosibel por todo auxílio na organização dos materiais e equipamentos do laboratório, por ser tão atenciosa e carinhosa desde o início.

À Dona Ana pela simpatia e por nos auxiliar na organização e limpeza do laboratório. E também a todos os auxiliares de limpeza que contribuíram para o desenvolvimento deste projeto.

Ao Eliton Silva e à Carol Stocco pelos cafezinhos, pela amizade, carinho e parceria dentro e fora da pós-graduação, e também a todos os colegas do Cursinho Mafalda por alegrarem meus sábados.

À nova geração do LIM-10 Ana Paula Lembo, Jaqueline Novaes, Marina Demasi e Ana Rosa pela convivência.

Ao Leandro e ao Pedro por se dedicarem aos cuidados dos animais utilizados neste estudo.

Ao professor Chin Lin pelo auxílio com a técnica de PCR e por sempre me receber em seu laboratório com muita gentileza e dedicação.

Aos colegas do LIM-51, Dra. Thais Salgado, Dra. Denise, Dr. Hermes, por todo auxílio em inúmeros experimentos e, principalmente, à Dra. Edielle Melo, por ter me apresentado à minha orientadora.

Ao Professor Niels Câmara por ter aberto as portas de seu laboratório e por me auxiliar na citometria de fluxo.

À Dra. Helena Oliveira por ter cedido os animais transgênicos e por sua contribuição científica.

À Ângela Castoldi e Mary Amano pelo auxílio na citometria de fluxo, pelos conselhos e conversas descontraídas.

Ao Dr. Isac de Castro pelo auxílio nas análises estatísticas.

Aos melhores amigos que alguém pode ter na vida: Bárbara Born, Leonardo Rosa, Juliana Oliveira, Amanda Ribeiro e Tutti Righetto. Por toda dedicação, paciência e por estarem comigo em todos os momentos.

Ao Mate, pela correção dessa dissertação, por ter entrado na minha vida nesse finalzinho de mestrado para alegrar meus dias e compartilhar momentos tão especiais.

À minha mãe, Joana Martins Venancio, pelas marmitas feitas como muito carinho, pela paciência, por entender esse período tão difícil e pelo amor incondicional.

Ao meu pai, Sebastião Veríssimo Venancio (*i. m.*) por ter se dedicado tanto à minha educação, por confiar em mim incondicionalmente, mesmo sem entender exatamente o que faço. Tudo o que conquistei foi por intermédio seu.

À minha irmã Juliana Venancio, por acreditar em mim quando nem eu mesma acredito, por ouvir minhas lamentações, pela paciência que só uma irmã poderia ter.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de mestrado e pelo apoio financeiro para realização desta pesquisa.

"E bem pode ser que as pessoas descubram no fascínio do conhecimento uma boa razão para viver, se elas forem sábias o bastante para isto, e puderem suportar a convivência com o erro, o não saber e, sobretudo, se não morrer nelas o permanente encanto com o mistério do universo."

Rubem Alves

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURA

RESUMO

SUMMARY

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Sepses: definição e aspectos epidemiológicos	1
1.1.2 Fisiopatologia	3
1.2 Macrófagos	6
1.3 Neutrófilos	7
1.4 Linfócitos	8
1.5 Receptores de reconhecimento padrão (PRR)	9
1.5.1 Sinalização mediada pelo receptor Toll-like 4 (TLR4)	11
1.6 Modelos experimentais de sepse	13
1.6.1 Ligadura e perfuração do ceco (CLP)	14
1.6.2 Lipopolissacarídeo (LPS): estrutura, internalização e resposta imunológica	15
1.7 Metabolismo de lipoproteínas na Sepses	19
1.8 Proteínas transportadoras de lípidos	20
1.8.1 Proteína de aumento da permeabilidade bactericida (BPI)	21
1.8.2 Proteína de ligação ao LPS (LBP)	22
1.8.3 Proteína de transferência de fosfolípidos (PLTP)	22
1.8.4 Proteína de transferência de colesterol esterificado (CETP)	23
1.9 CETP e seu papel controverso nas doenças cardiovasculares	25
1.10 Inibidores de CETP	27
1.11 CETP: Novas funções além do transporte reverso de colesterol	30
2. JUSTIFICATIVA	32
3. OBJETIVO	33
3.1 Objetivos gerais	33
3.2 Objetivos específicos	33

4. MÉTODOS	34
4.1 Desenho experimental	34
4.2 Animais	34
4.3 Determinação da atividade plasmática de CETP	36
4.4 Concentração plasmática de CETP	38
4.5 Modelo experimental de sepse: Ligadura e perfuração do ceco (CLP)...	38
4.6 Determinação da migração de leucócitos para cavidade peritoneal	39
4.7 Aferição dos mediadores Inflamatórios	40
4.8 Extração e avaliação da integridade do RNA	40
4.9 Análise da expressão de RNAm de TLR4 e AOA hepáticos	41
4.10 Determinação da expressão proteica de TLR4 e AOA por Western Blot	44
4.11 Cultura celular	45
4.12 Determinação da viabilidade celular pela liberação de Lactato Desidrogenase	46
4.13 Análises por microscopia confocal	46
4.14 Análises por citometria de fluxo	48
4.15 Análise estatística	51
5. RESULTADOS	53
5.1. Resultados in vivo	53
5.2 Resultados in vitro	61
5.2.1 Papel da CETP exógena	62
5.2.2 Papel da CETP endógena	71
6. DISCUSSÃO	79
7. CONCLUSÃO	88
8. REFERÊNCIAS BIBLOGRÁFICAS	89

LISTA DE ABREVIATURA

ABCA-1 - ATP binding cassette transporter A-1

ABCG-1- ATP binding cassette transporter G-1

AOAH - aciloxiacil hidrolase

APC - alofococianin

ApoA1 - apolipoproteína A-1

ApoB - apolipoproteína B

ApoE - apolipoproteína E

B-E - receptor de lipoproteína de baixa densidade

BPI - proteína de aumento da permeabilidade bactericida

CARS - síndrome da resposta inflamatória compensatória

CD - cluster differentiation

CD14 - glycosylphosphatidylinositol-linked molecule

CE- colesterol esterificado

CETP - proteína de transferência de colesterol esterificado

CLP - ligadura e perfuração cecal

DEFINE - determinação da eficácia e tolerabilidade da inibição da CETP com anacetrapib

DNA - ácido desoxirribonucleico

EDTA - Ethylenediamine tetraacetic acid

HDL - lipoproteína de alta densidade

IκB - inhibitor of nuclear factor kappa B kinase

IL - interleucina

ILAS - Instituto Latino Americano da Sepsis

ILLUMINATE - investigation of lipid level management to understand its impact in atherosclerotic events

ILLUSTRATE - investigation of lipid level management using coronary ultrasound to assess reduction of atherosclerosis

IRAK1 - IL-1 receptor associated kinase

KC - células de Kupffer

LA - lipídeo A

LBP - proteína transportadora de lipopolissacarídeo

LCAT - lecitina colesterol aciltransferase

LDL - lipoproteína de baixa densidade

LP - lipoproteína

LPS - lipopolissacarídeo

LRP - proteína relacionada ao receptor de LDL

LTA - lipoteicóico

MARS - síndrome da resposta inflamatória mista

MyD88 - Myeloid differentiation protein 88

NF-κB - nuclear factor kappa B

NLR - Nod-like receptor

ON - óxido nítrico

PAF - platelet-activating factor

PBS - phosphate buffered saline

PCR - proteína C reativa

PE – phycoerythrin

PERCEP - peridinin-chlorophyll protein

PGE2 - prostaglandin E2

PLTP - proteína de transferência de fosfolípidos

PMAPs - padrões moleculares associados a patógenos

PROGRESS - Promoting Global Research Excellence in Severe Sepsis

PRRs- receptores de reconhecimento padrão

QM – quilomícron

RNA – ácido Ribonucleico

RPM - rotações por minuto

SAA - proteína soro amiloide A

SIRS - síndrome da resposta inflamatória sistêmica

SR-BI - scavenger receptor class B type I

TG- triacilglicerol

TLR4 - Toll-like receptor 4

TNF- α - tumor necrosis factor alpha

TRAF-6 - TNF receptor associated factor 6

TRC - transporte reverso de colesterol

TXA2 - tromboxano A2

UTI - Unidades de Tratamento Intensivo

VLDL - lipoproteína de densidade muito baixa

WT - wild type

RESUMO

Venancio TM. ***A proteína de transferência de colesterol esterificado humana protege camundongos da sepse polimicrobiana e atenua a resposta inflamatória em macrófagos estimulados com lipopolissacarídeo*** [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2014.

Sepse é a resposta inflamatória sistêmica decorrente de infecção grave, com alto índice de mortalidade, tornando-se um grave problema de saúde pública. Apesar dos inúmeros estudos realizados em busca de alternativas terapêuticas, o entendimento acerca dos mecanismos envolvidos na doença permanece restrito. A interação entre o metabolismo lipídico e a resposta inflamatória tem sido intensamente investigada. Neste estudo, avaliou-se a influência da proteína de transferência de colesterol esterificado (CETP) – glicoproteína plasmática que promove a transferência de lipídeos entre lipoproteínas – na resposta inflamatória. Inicialmente, foram comparados camundongos transgênicos para CETP humana (CETP) e controles irmãos não transgênicos (WT) submetidos ao modelo de sepse polimicrobiana de ligadura e perfuração do ceco (CLP), avaliando a taxa de sobrevivência e o perfil inflamatório entre os grupos. Em seguida, a resposta inflamatória em macrófagos de peritônio de camundongos estimulados com LPS na ausência ou presença da CETP exógena (CETP humana recombinante) e endógena (macrófagos de animais CETP) foi analisada. Verificou-se que camundongos CETP apresentaram maior taxa de sobrevivência, maior migração de linfócitos para o foco infeccioso, menores concentrações plasmáticas de IL-6 e menor expressão proteica do receptor *Toll-like* 4 (TLR4) e da enzima aciloxiacil hidrolase (AOAH) no fígado, comparados aos WT. Nos macrófagos, observou-se que a presença da CETP recombinante foi capaz de se ligar ao LPS, pela análise da microscopia confocal, e, em cultura, reduziu de forma dose dependente a captação de LPS, a expressão de TLR4, a ativação do NF-KB (p65) e a secreção de IL-6 para o sobrenadante do cultivo celular. Os dados obtidos com os macrófagos de animais CETP corroboraram, em parte, os

encontrados com a utilização da CETP exógena. Houve redução da captação de LPS e da ativação do NF-KB (p65), sem alteração na expressão de TLR4 e secreção de IL-6. Entretanto, apresentaram redução das concentrações de TNF- α celular e no sobrenadante de cultura. Dessa maneira, foi possível concluir que a CETP atua como agente modulador da resposta inflamatória induzida pela CLP e em macrófagos estimulados pelo LPS.

Esses achados devem ser considerados nas doenças inflamatórias e nos futuros estudos relacionados à inibição da CETP, além de estabelecer novas perspectivas de tratamento da sepse.

Descritores: 1. Proteína de transferência de ésteres de colesterol 2. Sepse 3. Camundongos transgênicos 4. Lipopolissacarídeos 5. Taxa de sobrevivência 6. Receptor 4 toll-like 7. Macrófagos 8. Migração de leucócitos 9. Inflamação 10. Citocinas

SUMMARY

Venancio TM. ***The human cholesteryl ester transfer protein protects mice from polymicrobial sepsis and attenuates the inflammatory response in macrophages stimulated with lipopolysaccharide*** [dissertation]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2014.

Sepsis is a systemic inflammatory response due to serious infection with high mortality rate, which has become a serious problem for public health. Despite numerous studies seeking for therapeutic alternatives, the understanding of the mechanisms involved in this disease remains limited. The interaction between lipid metabolism and inflammatory response has been intensively investigated. In the present study it was evaluated the influence of CETP (cholesteryl ester transfer protein) - plasma glycoprotein that promotes the transfer of lipids between lipoprotein - in the inflammatory response. Initially transgenic mice for human CETP (CETP) were compared to non transgenic control mice (WT) after polymicrobial sepsis induced by cecal ligation and puncture (CLP), to determine survival rate and the inflammatory profile between groups. Then, macrophages isolated from peritoneal cavity stimulated with LPS in the presence or absence of exogenous CETP (recombinant human CETP) and endogenous CETP (macrophages from CETP mice) were analyzed. It was found that CETP mice showed a higher survival rate, a greater lymphocyte migration to infectious focus, a lower IL-6 plasma concentration and a decrease in Toll-like receptor 4 (TLR4) and acyloxyacyl hydrolase enzyme (AOAH) protein expression in the liver in comparison to WT mice. In macrophages, recombinant CETP was able to bind to LPS, by confocal microscopy analysis and in cell culture, it was observed that in the presence of the recombinant CETP macrophages presented decreased in LPS uptake, TLR4 expression, NF- κ B activation (p65) and IL-6 secretion into the cell culture medium. Furthermore, the results with macrophages from animals CETP corroborate partly with what was found in the exogenous experiments. LPS uptake and NF- κ B activation (p65) were reduced, but no difference regarding the expression of TLR4, nor the IL-6 secretion to the cell culture medium. However, the CETP group also showed reduced levels of

TNF- α both in macrophages and in the culture supernatant. Thus, we conclude that CETP acts as modulator of the inflammatory response induced by CLP and in the macrophages stimulated by LPS. In addition, new therapeutic perspectives could be established.

Descriptors: 1.Cholesteryl ester transfer protein 2.Sepsis 3.Transgenic mice 4.Lipopolysaccharide 5.Survival rate 6.Toll-like receptor 4 7.Macrophages 8.Leukocyte migration 9.Inflammation 10.Cytokine

1. INTRODUÇÃO

1.1 Sepses: definição e aspectos epidemiológicos

Sepses é a resposta inflamatória sistêmica decorrente de infecção grave, com alto índice de mortalidade (Skrupky *et al.*, 2011). Durante a sepses, ocorre uma resposta inflamatória exacerbada e manifestações graves em todo o organismo. Inicialmente, há disfunção da barreira endotelial, seguida por infecção generalizada, podendo resultar em choque séptico e falência de múltiplos órgãos (Hotchkiss *et al.*, 2003; Riedemann *et al.*, 2003; Skrupky *et al.*, 2011; Leelahavanichkul *et al.*, 2012).

As definições atuais consideram que a sepses grave e o choque séptico representam estágios evolutivos da mesma doença, o que não significa, necessariamente, um aumento da gravidade do processo infeccioso e sim da gravidade da resposta sistêmica (Rangel-Frausto *et al.*, 1995).

O Consenso realizado pela American College of Chest Physicians and the Society of Critical Care Medicine, de 1991, estabeleceu critérios para a classificação da sepses e doenças similares, as quais foram enquadradas como síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS) (Bone *et al.*, 1992).

Além disso, ficou estabelecido que o termo sepses deve ser utilizado apenas nos casos em que a infecção é documentada, pois a SIRS pode ser causada por diversas outras injúrias (além da infecção por bactérias, vírus e fungos), tais como trauma, queimaduras, choque hemorrágico e pancreatite aguda (Beishuizen *et al.*, 1998). No mundo, ocorrem cerca de 18 milhões de casos de sepses grave por ano (Niederman *et al.*, 1990; Rangel-Frausto, 2005).

Segundo informações do Instituto Latino Americano da Sepses (ILAS, 2014), organização que reúne os maiores especialistas sobre o assunto na

América Latina, atualmente, 48,1% dos pacientes com a doença vão a óbito no Brasil. A mortalidade por sepse é maior que as por doenças coronarianas nas Unidades de Tratamento Intensivo (UTI) dos hospitais brasileiros. Todos os anos, morrem, no país, cerca de 250 mil pessoas vítimas da doença, custando cerca de R\$ 17 bilhões anuais ao sistema de saúde, sendo R\$ 10 bilhões gastos com pacientes que acabam morrendo. De acordo estudo multicêntrico PROGRESS (*Promoting Global Research Excellence in Severe Sepsis*), a mortalidade intra-hospitalar foi maior no Brasil, quando comparada com outros países: 56% contra 30% em países desenvolvidos e 45% em outros países em desenvolvimento (Teles *et al.*, 2008).

A mortalidade não tem se modificado nas últimas duas décadas apesar do aprimoramento de várias medidas terapêuticas de tratamento intensivo. O tratamento continua a ser dependente de antibióticos e intervenções de apoio, direcionado para o controle da infecção e correção de distúrbios hemodinâmicos, como reposição volêmica, emprego de corticosteroides, terapia anticoagulante, controle glicêmico e suporte ventilatório (Vincent *et al.*, 2000).

Dessa maneira, estratégias têm sido investigadas para o desenvolvimento de tratamentos alternativos contra a sepse. Dentre elas, podemos citar: os inibidores da endotoxina (anticorpos antiendotoxina) e citocinas (TNF- α), os bloqueadores de produção de substâncias vasoativas (óxido nítrico), (Friedman *et al.*, 1996; Pollack *et al.*, 1996; Vincent *et al.*, 1999), a utilização da proteína C ativada (recombinante humana) (King *et al.*, 2014) e inibidores do receptor TLR4 (Van Lieshout *et al.*, 2014 ; Salomão *et al.*, 2008). Contudo, a maioria dos projetos não demonstrou diminuição na taxa de

mortalidade em ensaios clínicos (Friedman *et al.*, 1998; King *et al.*, 2014). Segundo Bernard & Benard (2012), as pesquisas atuais, embora tenham avançado consideravelmente, deixam mais perguntas do que respostas.

1.1.2 Fisiopatologia

A sepsé resulta de uma descompensação hemodinâmica decorrente da presença de agentes infecciosos e mediadores inflamatórios na circulação sanguínea, comprometendo o fluxo sanguíneo na microcirculação (Ince *et al.*, 1999). Estudo recente sugere que há uma complexa interação entre a inflamação, a coagulação e a diminuição da fibrinólise decorrente da resposta imune (Opal & Esmon, 2003).

Os fatores desencadeantes da resposta inflamatória por meio da ativação celular e da cascata de eventos plasmáticos são, principalmente, os componentes da parede celular dos micro-organismos, como o ácido lipoteicoico (LTA) e peptidoglicanos, derivados de bactérias gram-positivas (exotoxinas), ou o lipopolissacarídeo (LPS), no caso de bactérias gram-negativas (endotoxinas). O LPS e as exotoxinas são liberados, normalmente, durante a replicação da bactéria e/ou como consequência da sua morte, devido à lise da parede celular (Hallman *et al.*, 2001; Werling & Jungi, 2003; Opal, 2007).

Após a invasão por micro-organismos patogênicos, as células do sistema imunológico (neutrófilos, monócitos, macrófagos, eosinófilos, células dendríticas, mastócitos e linfócitos) são recrutadas para o local da infecção e iniciam a resposta inflamatória (King *et al.*, 2014).

O evento central na cascata fisiopatológica da sepse é a liberação sistêmica excessiva de citocinas pró-inflamatórias, tais como o fator de necrose tumoral- α (TNF- α), interleucinas (IL)-1 β , IL-6, IL-12, IL-18, e interferon- γ (INF γ) em resposta ao patógeno (Abbas *et al.*, 2011).

As citocinas são mediadores primários liberados durante as primeiras horas após a exposição ao LPS estimulando a liberação de mediadores secundários como outras citocinas, derivados do ácido araquidônico (PGE2, TXA2), fator ativador de plaqueta (PAF), peptídeo vasoativo, histamina e uma variedade de produtos derivados do complemento (Medzhitov *et al.*, 2000). Esses mediadores ativam o sistema celular (fagócitos e endotélio) e humoral, os quais são, primariamente, orientados para eliminação de bactérias invasoras, mas causam, ocasionalmente, inflamação generalizada levando à falência de múltiplos órgãos. Os mecanismos de disfunção de órgãos na sepse dependem do evento fisiopatológico inicial e das condições do paciente (Medzhitov *et al.*, 2000; Kourilsky *et al.*, 2001).

Uma razão para a falha das estratégias anti-inflamatórias em pacientes com sepse pode ser as manifestações graves que ocorrem durante todo o processo. Tem sido postulado que a resposta imune na sepse representa a interação entre dois fenômenos contrastantes no status inflamatório do paciente. No início, a SIRS é caracterizada por excessiva produção de mediadores inflamatórios (status hiperinflamatório) que é, então, progressivamente, suprimida pelo desenvolvimento de uma resposta anti-inflamatória (status hipoinflamatório), a síndrome da resposta inflamatória compensatória (CARS). Entre estes dois momentos, ocorreria a síndrome da resposta inflamatória mista (MARS), representando uma homeostase

temporária entre o declínio da SIRS e ascensão da CARS (Russell *et al.*, 2006; Novotny *et al.*, 2012). Entretanto, Osuchowski e colaboradores (2006) evidenciaram que a resposta inflamatória é dinâmica e que as citocinas não apresentam um comportamento linear, havendo presença tanto de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IL-6), como de citocinas anti-inflamatórias (IL-10) e modulação por antagonistas (IL-1Ra) na fase inicial da sepse. Em paralelo, o estímulo anti-inflamatório fisiológico propiciaria um equilíbrio destes mediadores promovendo a sobrevida ao paciente. No entanto, se houver um desequilíbrio destes mediadores, a evolução da sepse será para choque, falência múltipla dos órgãos e morte (Sikora *et al.*, 2001).

O TNF α , IL-1 e IL-6 são responsáveis por elevação de proteínas na fase aguda inflamatória, que inclui a proteína C reativa (PCR) durante a infecção. O aumento do nível sérico destas citocinas e IFN γ tem sido correlacionado com a gravidade e mortalidade no curso da sepse (Sikora *et al.*, 2001).

A IL-10 é produzida por macrófagos e células dendríticas, sendo envolvida no controle da reação imune inata. Ela inibe a função do macrófago e dos neutrófilos, caracterizando-se como exemplo clássico de feedback negativo. Inibe ela própria a IL-10 e outras citocinas: IL-1 α , IL-1 β , IL-8, IL-12, IFN γ e TNF α (Ng *et al.*, 2013). Assim como as citocinas pró-inflamatórias, elevado nível sérico de IL-10 prolongado tem sido correlacionado com o pior prognóstico na sepse, sugerindo que a superprodução pode ser preditora de gravidade e desfecho fatal (Gogos *et al.*, 2000).

Portanto, o equilíbrio entre os efeitos das citocinas pró e anti-inflamatórias determina a manutenção da homeostase, preservando a função vital do organismo (Ng *et al.*, 2004).

1.2 Macrófagos

A medula óssea libera os monócitos para a corrente sanguínea e estes migram para os tecidos, onde sofrem a diferenciação final em macrófagos. Macrófagos encontrados na cavidade peritoneal são responsáveis pela defesa contra a invasão de antígenos (Topley *et al.*, 1996). No organismo, são responsáveis por limitar a disseminação inicial ou crescimento de agentes infecciosos e modular as reações imunológicas subsequentes, tendo função tanto na resposta imune inata quanto na adaptativa (Abbas *et al.*, 2011; Stafford *et al.*, 2002).

O contato entre a célula fagocitária e o antígeno é acompanhado por sinais intracelulares que disparam processos celulares diversos, como rearranjo do citoesqueleto, alterações no tráfego de membrana, ativação de mecanismos microbicidas, produção de citocinas e quimiocinas pró e anti-inflamatórias, apoptose e produção de moléculas necessárias para a apresentação eficiente de antígenos para o sistema imune adaptativo (Underhill & Ozinsky, 2002).

As endotoxinas induzem a liberação de citocinas diretamente dos macrófagos e neutrófilos. Em paralelo, os antígenos presentes no foco de infecção são fagocitados, ocorrendo aumento do consumo de oxigênio pelos macrófagos e pela produção de radicais livres de oxigênio, juntamente às proteases e hidrolases que são capazes de causar danos a esses patógenos. Essas propriedades fagocíticas e bactericidas são essenciais para a defesa normal do hospedeiro. Quando a ativação dos macrófagos torna-se descontrolada, estas células contribuem para o desenvolvimento de uma resposta inflamatória generalizada (Ryan *et al.*, 1992; Medzhitov *et al.*, 1998).

A ativação de macrófagos promove a sinalização de duas vias distintas, na resposta inflamatória: a clássica (M1) e a via alternativa (M2). A primeira via caracteriza-se por ser desencadeada em resposta a produtos microbianos, como o LPS, e os M1 são responsáveis pela morte de antígenos. Já a ativação alternativa (M2) é promovida por moléculas anti-inflamatórias, como as interleucinas 4, 10 ou 13, que levam à proliferação celular, angiogênese, remodelação e reparo tecidual (Mosser & Edwards, 2008; Siveen & Kuttan, 2009).

Quando ativados, os macrófagos produzem, sequencialmente, TNF- α , IL-1, IL-6 e IL-8. Essas citocinas agem em outras células ou em outros elementos sanguíneos (polimorfonucleares, células endoteliais, fibroblastos, plaquetas e nos próprios monócitos) por meio da ligação a seus receptores de superfície, induzindo a produção e liberação de mediadores, o que contribui para uma resposta inflamatória tardia (Medzhitov *et al.*, 1998).

1.3 Neutrófilos

Os neutrófilos produzidos na medula óssea são os leucócitos mais abundantes no sangue. Desempenham um papel fundamental na manutenção da defesa do hospedeiro, pois são as primeiras células que migram para o sítio infeccioso, local em que ativam a resposta inflamatória contra estruturas específicas contidas na superfície dos patógenos, sendo capazes de combater os micro-organismos, com a produção de agentes bactericidas e com a secreção de mediadores inflamatórios, como citocinas e quimiocinas que melhoram o recrutamento e a ativação de si mesmos e de outras células do

sistema imunológico (Topley, 1996 b; Medzhitov *et al.*, 2000; Abbas *et al.*, 2011).

No foco infeccioso, os neutrófilos atuam fagocitando os patógenos, e gerando óxido nítrico (ON) e espécies reativas de oxigênio, como peróxido de hidrogênio (H₂O₂), os quais, além de combaterem os agentes infecciosos, também são responsáveis por danos teciduais, aumentando a permeabilidade vascular e causando disfunções nos órgãos (Alves-Filho *et al.*, 2010; Fortin *et al.*, 2010). Estudos mostram que, na fase letal da sepse, há prejuízo na migração de neutrófilos para o foco infeccioso. Alves-Filho e colaboradores (2010) observaram, em diferentes modelos de animais, a falha da migração de neutrófilos para o foco infeccioso está associada ao aumento do número de bactérias no peritônio e no sangue, seguida de inflamação sistêmica e redução da taxa de sobrevivência na sepse.

Deste modo, a sepse é também resultado da migração de neutrófilos diminuída para o foco infeccioso, dificultando a remoção de patógenos e iniciando uma robusta resposta inflamatória caracterizada pelo “sequestro” inadequado de neutrófilos para os órgãos (Mercer-Jones *et al.*, 1997).

1.4 Linfócitos

Os linfócitos são células altamente especializadas originadas da medula óssea, capazes de capturar e apresentar antígenos. São as únicas células que possuem receptores destes antígenos, sendo, portanto, peças-chave na resposta imune adquirida. Desempenham funções extremamente complexas e são bastante heterogêneas de acordo com sua função e linhagem.

Diferenciam-se entre si pela proteína de superfície que possuem em sua membrana (Abbas *et al.*, 2011).

Há três classes de linfócitos do sistema imune humano: linfócitos B, linfócitos T e células natural killer. Os primeiros são as únicas células envolvidas na produção de anticorpos, responsáveis pela imunidade humoral. Os linfócitos T são responsáveis pela imunidade celular, possuem receptores que reconhecem apenas fragmentos peptídicos de proteínas antigênicas. As células “natural killer” atuam destruindo células infectadas do hospedeiro, porém não possuem receptores específicos, portanto, são componentes da imunidade inata (Abbas *et al.*, 2011).

Durante a sepse, os linfócitos desempenham papel de extrema importância. Estudos mostraram que há um aumento de apoptose de linfócitos na circulação periférica de pacientes com sepse (Kung *et al.*, 2014). A apoptose é inespecífica e ocorre rapidamente levando a uma profunda perda destas células associada a uma piora do quadro do paciente (Soriano *et al.*, 2013).

Além disso, Hotchkiss e colaboradores (2000) evidenciaram que a prevenção de apoptose de linfócitos está associada com a redução de bactérias na circulação sanguínea de camundongos com sepse.

1.5 Receptores de reconhecimento padrão (PRR)

O sistema imune inato não possui a alta especificidade do sistema imune adaptativo necessária para a memória imunológica, porém é capaz de distinguir o próprio do não próprio. A resposta imunológica inata utiliza sistemas de reconhecimento primitivos e inespecíficos, que permitem sua ligação a

muitos produtos microbianos (Kourilsky *et al.*, 2001). Estas estruturas estão referidas como “padrões moleculares associados a patógeno” (PAMPs), como, exemplo, o lipopolissacarídeo (LPS), o peptidoglicano, ácidos lipoteicoicos, DNA das bactérias, RNA de dupla-fita e glucanos.

Os receptores do sistema da imunidade inata que estão envolvidos no reconhecimento destes PAMPs são chamados receptores de reconhecimento do padrão (PRR). Os PRR estão expressos em muitas células efectoras do sistema inato, tais como: os neutrófilos, os macrófagos, as células dendríticas e células B – especialistas na apresentação de antígeno.

Os PRR são estruturalmente diversos, mas se resumem funcionalmente a três classes: os secretados, os endocíticos e os de sinalização (Aderem *et al.*, 2000). Os receptores da família “toll-like” (TLR) são representantes desta classe. Os TLR são proteínas que atravessam a membrana plasmática (transmembrana) evolutivamente conservadas em insetos e vertebrados, sendo essenciais para o reconhecimento dos PAMPs (Beutler, 2002).

Vários membros da família TLR foram identificados em mamíferos (13 TLR em camundongos e 11 em seres humanos). Todos possuem um domínio TIR (toll/IL-1 receptor) conservado na região citosólica que é responsável pela ativação de vias de sinalização comuns às que levam à ativação do fator de transcrição nuclear κ -B (NF- κ B) e proteínas quinases ativadas por estresse (Kawai & Akira, 2006; Park & Lee, 2013).

Os TLR 1, 2, 4, 5, 6, 10 e 11 são expressos na superfície das células de defesa (fagócitos) e os TLR 3, 7, 8 e 9 estão localizados em compartimentos intracelulares e reconhecem o DNA das bactérias, e RNA de fita simples e fita dupla. Os TLR são importantes para a proteção contra agentes infecciosos,

mas, em um processo inflamatório persistente, podem levar à sepse e a danos teciduais.

1.5.1 Sinalização mediada pelo receptor Toll-like 4 (TLR4)

A reação do hospedeiro à sepse polimicrobiana envolve uma resposta integrada nos órgãos e nas células. Para infecções que envolvem bactérias gram-negativas, o TLR4 é o centro desta resposta por meio do reconhecimento do LPS.

A ativação do TLR4 por agonistas (como o LPS) recruta outra proteína, a MD-2. Essa molécula parece estar relacionada com a estabilização e formação dos dímeros de TLR4 (Lien *et al.*, 2002). Aparentemente, o complexo de reconhecimento do LPS possui três componentes: o TLR4, a MD-2 e o CD14, que é uma proteína superficial de monócitos que facilita a ativação celular induzida pelo LPS (Barton *et al.*, 2003).

O TLR4 e a MD-2 estão associados entre si, enquanto o CD14 é recrutado ao complexo depois de se ligar ao LPS. Após a ligação com TLR4, ocorre a dimerização do receptor e o recrutamento de uma molécula adaptadora a Myeloid differentiation protein (MyD88) com o segmento TIR (Toll/IL1R) (Lien *et al.*, 2002; Han *et al.*, 2005).

Na sequência, a MyD88 se associa e ativa a IRAK1 (IL-1 receptor-associated kinase). A fosforilação da IRAK1 leva ao recrutamento do TRAF-6 (TNF receptor-associated factor-6), que, ao se oligomerizar, ativa uma quinase específica chamada mitogen-activated protein kinase (MAP3K). Essa proteína leva à ativação da I κ B, que é fundamental para sua degradação. A proteína I κ B fosforilada recebe a adição de ubiquitina, pela ação da ubiquitina ligase, sendo,

em seguida, degradada pelo complexo proteossoma 26S, resultando na liberação do NF- κ B (Janssens & Tschopp, 2006).

Quando não estimulado, o fator NF- κ B encontra-se no citoplasma ligado ao I κ B. Esse complexo impede a translocação do NF- κ B para o núcleo. Assim, a fosforilação e a degradação do I κ B são necessárias para que ocorra a translocação do NF- κ B para o núcleo (Srivastava & Ramana, 2009).

O NF- κ B é um fator de transcrição dimérico composto por diferentes membros da família Rel, tais como p65 (RelA), p50, p52, c-Rel e RelB. Os NF- κ B dos mamíferos contêm 5 membros: NF- κ B1 (p50/p105), NF- κ B2 (p52/p100), RelA (p65), RelB, e c-Rel (Janssens & Tschopp, 2006; Srivastava & Ramana, 2009), exercendo muitas funções biológicas em processos essenciais, tanto na resposta imune inata quanto na adaptativa. O desmembramento do complexo I κ B/NF- κ B permite o transporte do NF- κ B para o núcleo, com consequente ligação deste aos genes que apresentam a sequência regulatória GGGACTTTCC junto à região promotora, levando a um aumento na expressão dos genes relacionados à resposta imune e ao estresse (Xu *et al.*, 2005).

Figura 1. Cascata inflamatória da via de sinalização do TLR4, desencadeada pelo LPS, culminando na ativação do NF-κB. A LBP liga-se ao LPS, facilitando sua transferência para as lipoproteínas (LP) ou para o CD14, o qual transfere esse LPS para o TLR4 desencadeando a cascata inflamatória e culminando na ativação do fator de transcrição NF-κB que é translocado para o núcleo após fosforilação e degradação do IκB. No núcleo, o NF-κB se liga a regiões promotoras de genes envolvidos na resposta inflamatória.

1.6 Modelos experimentais de sepse

Dentre os modelos experimentais utilizados no estudo de sepse, destacam-se a administração endovenosa, intraperitoneal ou em meio de cultura celular, da bactéria viva ou de componentes microbianos, como o lipopolissacarídeo (LPS). Entretanto, os modelos de injúria com consecutiva liberação de flora microbiana por ligação e perfuração do ceco (“cecal ligation and puncture” – CLP) são os que melhor reproduzem as mudanças patofisiológicas observadas em um indivíduo com sepse. Embora os modelos que utilizam LPS colaborem com as explicações acerca dos mecanismos da doença, eles não reproduzem a complexidade e a heterogeneidade intrínseca

dos pacientes. O perfil sistêmico de liberação de citocinas na CLP, por exemplo, se assemelha ao perfil dos humanos doentes (Dejager *et al.*, 2011)

1.6.1 Ligadura e perfuração do ceco (CLP)

Desenvolvida há mais de 30 anos, a CLP em roedores tornou-se o modelo mais amplamente utilizado de sepse experimental. Como o ceco é uma fonte endógena de contaminação de bactérias, a perfuração deste resulta em peritonite bacteriana, que é seguida por translocação de bactérias entéricas mistas para circulação sanguínea (Rittirsch *et al.*, 2009; Buras *et al.*, 2005). No início da sepse, ocorre a bacteremia, em seguida, é disparada a ativação sistêmica da resposta inflamatória, resultando em choque séptico, em disfunção de múltiplos órgãos e, finalmente, na morte (Buras *et al.*, 2005).

Quando o modelo CLP é usado em roedores, ocorre a demonstração da doença com sintomas típicos de sepse ou choque séptico, como hipotermia, taquicardia e taquipneia. Apesar de sua importância clínica e utilização generalizada na pesquisa sobre a sepse, uma das principais preocupações do modelo CLP é sua consistência. No passado, várias versões do CLP foram utilizadas, sendo que algumas diferiam substancialmente da sua descrição original em 1979 (Buras *et al.*, 2005; Rittirsch *et al.*, 2009).

A CLP consiste em ligadura abaixo da válvula ileocecal, após laparotomia mediana seguida de uma punção com agulha para dentro do ceco, de um lado, e através da parede cecal no lado oposto. O número de perfurações e o tamanho da agulha determinam a taxa de mortalidade (Rittirsch *et al.*, 2009).

Uma das vantagens do modelo de CLP é que pode ser instrumento reprodutível para projetar o grau de severidade da sepse experimental. A gravidade definida por intensidade de sepse induzida por CLP permite que os investigadores obtenham importantes compreensões funcionais sobre a resposta inflamatória, que, caso contrário, pode ser mascarada pela heterogeneidade da severidade da sepse. Além disso, o desempenho do procedimento padronizado facilita a comparação dos resultados experimentais entre diferentes grupos de laboratório (Buras *et al.*, 2005; Rittirsch *et al.*, 2009; Dejager *et al.*, 2011).

1.6.2 Lipopolissacarídeo (LPS): estrutura, internalização e resposta imunológica

O LPS é um dos componentes principais da membrana externa de várias famílias microbianas gram-negativas, contribuindo muito para a integridade estrutural da bactéria, uma vez que ajuda a prover uma barreira de permeabilidade a substâncias hidrofóbicas (Rossol *et al.*, 2011).

A estrutura do LPS é formada por três regiões: um antígeno O, uma parte central e uma região interna de lipídio A (LA). A cadeia O é característica e única para cada sorotipo bacteriano, tornando-se, então, um importante fator da virulência. A região central contém alguns açúcares, como heptoses e cetodeoxioctanato, sendo este último não encontrado em outro lugar na natureza. O Lipídeo A é um dissacarídeo de glucosamina fosforilado nas posições 1 e 4, e tem seis ou sete ácidos graxos esterificados e representa o princípio endotóxico do LPS, por provocar uma resposta aguda em animais, como febre, calafrios, cefaleia, mal-estar, entre outros (Salvo *et al.*, 1995).

Figura 2. Estrutura do LPS. Figura adaptada de Calabrese *et al.*, (2014).

A interação de LPS com monócitos/macrófagos é particularmente importante, por estimular a produção de uma variedade de mediadores inflamatórios (Kang *et al.*, 1990).

Há dois diferentes mecanismos pelos quais o LPS pode, inicialmente, interagir com as células: interações específicas e inespecíficas.

Nas interações específicas, o LPS liga-se a um PRR. As interações inespecíficas, por outro lado, resultam da ligação do LPS a uma macromolécula qualquer constituinte da membrana, com exceção dos receptores, com consequente solubilização dos lipídeos contidos no LPS pela membrana plasmática (Kang *et al.*, 1992).

Ligações inespecíficas podem mediar endocitose de LPS em monócitos humanos, que são capazes de remover maior parte do LPS por fagocitose quando são expostos a altas doses da endotoxina (Kang *et al.*, 1990).

A rota intracelular de LPS pode conferir consequências importantes para a resposta inflamatória. O LPS pode ser neutralizado pela ação de lipoproteínas plasmáticas, como as HDL (van Leeuwen *et al.*, 2003), ou, também, pela captação via receptores scavenger (SR) no fígado, não resultando em grandes respostas inflamatórias (Guo *et al.*, 2009).

Animais que não expressam SR-B1 têm concentração elevada de LPS no plasma quando comparados àqueles que expressam. Soma-se a esse fato o atraso na produção de citocinas e subsequente aumento exagerado na produção dessas. Além disso, o SR-B1 modula a resposta inflamatória mediada pelo TLR4 em macrófagos. Acredita-se que o SR-B1 desempenha um papel importante de proteção durante a sepse (Guo *et al.*, 2009).

Em macrófagos e neutrófilos, a internalização do LPS é dependente de CD14, e é acompanhada por reações pró-inflamatórias intensas (Buttenschoen *et al.*, 2010). Após internalização, o LPS pode ser destoxificado ou desacilado, como formas de impedir que haja deflagração da resposta inflamatória via receptores específicos. O termo destoxificação engloba modificações na estrutura do LPS, assim como mecanismos indiretos que neutralizam ou modulam respostas pró-inflamatórias ao LPS pelo hospedeiro (Buttenschoen *et al.*, 2010).

Os principais mecanismos de destoxificação de LPS consistem na presença de moléculas que se ligam à endotoxina e previnem sua ligação ao TLR4. O LPS pode ser transferido para lipoproteínas plasmáticas (HDL, LDL, VLDL e QM) e, também, para as apolipoproteínas E (apoE) e A1 (apoA1), tendo o efeito tóxico neutralizado e a resposta inflamatória atenuada. A apo E

redireciona o LPS das células de Kupffer para o hepatócito, conferindo proteção ao hospedeiro (Barlage *et al.*, 2001).

O fígado, rapidamente, remove o LPS contido no sangue. Inicialmente, é levado para as células de Kupffer, pelas quais é absorvido por endocitose (Kang *et al.*, 1992).

Quando injetado em roedores, o LPS concentra-se no fígado e isso ocorre em poucas horas. Entretanto, pouco se sabe sobre o papel do fígado na destoxificação de endotoxinas (Buttenschoen *et al.*, 2010).

A principal via de desacilação do LPS é por meio da aciloxiacilo hidrolase (AOAH), uma lipase que remove seletivamente as cadeias de ácidos graxos secundárias do lipídeo A, sendo substituídas por hidroxilas de glucosaminas (Feulner *et al.*, 2004).

A AOAH é encontrada em células mieloides, como monócitos e neutrófilos, células de kupffer e células dendríticas, as principais células produtoras de AOAH. A desacilação do LPS ocorre lentamente ao longo do tempo, sendo concluída em, aproximadamente, três dias. A eficácia da desacilação por meio da AOAH tem sido demonstrada em camundongos, por meio da atenuação dos níveis de citocinas e quimiocinas em resposta ao LPS (Feulner *et al.*, 2004).

Estudos atuais têm observado que a desacilação é necessária para inativar o LPS. Na ausência de AOAH, o LPS internalizado pelas células de Kupffer pode ser liberado e estimular um ou mais tipos de células (Shao *et al.*, 2007). E, ainda, Shao e colaboradores (2012) concluíram que a AOAH atua mais rapidamente quando o LPS está ligado à lipoproteína de alta densidade (HDL).

1.7 Metabolismo de lipoproteínas na Sepses

As lipoproteínas têm sido apontadas como protetoras durante a sepsis (van Leeuwen *et al.*, 2003). São capazes de reduzir a resposta inflamatória e as taxas de mortalidade em modelos experimentais (Wu *et al.*, 2004). Experimentos *in vitro* e *in vivo* demonstraram que toxinas de bactérias gram-negativas (LPS) ou gram-positivas (ácido lipoteicoico) se ligam e são neutralizadas pelas lipoproteínas (Murch *et al.*, 2007).

Durante a infecção e inflamação, pode ocorrer um aumento na concentração sérica de triglicérides, caracterizada por uma elevação da fração de VLDL (Hardardóttir & Feingold, 1995) - provavelmente devido a maior secreção dessa partícula, como resultado da lipólise do tecido adiposo, ou aumento da síntese de novo de ácidos graxos hepáticos e supressão de sua oxidação. Em infecções mais graves, ocorre uma diminuição da depuração da VLDL secundária à diminuição da atividade da lipoproteína lipase e de apoLP E na VLDL. Em roedores, ocorre hipercolesterolemia atribuída ao aumento da síntese hepática de colesterol e diminuição da depuração da LDL, redução da secreção e conversão de colesterol em ácido biliar.

Durante a sepsis, ocorre redução na concentração plasmática das lipoproteínas, principalmente as de alta densidade (HDL), devido às alterações na atividade das proteínas plasmáticas - a lecitina colesterol acetiltransferase (LCAT), a proteína de transferência de fosfolípidos (PLTP) e, principalmente, a proteína de transferência de colesterol esterificado (CETP) - que modulam a composição dessas lipoproteínas (Masucci-Magoulas *et al.*, 1995; Hardardóttir *et al.*, 1996; Levels *et al.*, 2007). Estudos em humanos verificaram que, durante

a resposta inflamatória na fase aguda, a apoA1 é substituída pela proteína soro amiloide A (SAA) na partícula de HDL. Essa mudança reduz a afinidade da HDL pelo hepatócito e aumenta sua afinidade pelo macrófago, sugerindo que, durante a inflamação, a HDL é redirecionada dos hepatócitos para uma via de receptores scavengers de macrófagos. Há, também, um turnover mais rápido, e o declínio de HDL deixa os pacientes mais suscetíveis ao estímulo inflamatório (Catapano *et al.*, 2014).

A habilidade da HDL na interação com a proteína de ligação ao LPS (LBP) favorece a depuração do LPS na circulação sanguínea. Esse processo envolve o SR-BI que é capaz de se ligar ao complexo HDL-LPS, mediando o influxo de LPS para o fígado (Vishnyakova *et al.*, 2003).

A concentração de HDL-C está inversamente relacionada com a severidade da sepse e o aumento da resposta inflamatória (van Leewen *et al.*, 2003). Em humanos, uma baixa concentração basal de HDL colesterol pode ser considerada um fator de risco de desenvolvimento de sepse (Chien *et al.*, 2005).

1.8 Proteínas transportadoras de lípidos

A proteína de aumento da permeabilidade bactericida (BPI), a proteína de ligação ao LPS (LBP), a proteína de transferência de fosfolípidos (PLTP) e a CETP são pertencentes a uma família de proteínas conhecidas como transportadoras de lípidos. Os membros dessa família compartilham a habilidade de se ligar a uma variedade de substratos lipídicos, apresentam semelhanças estruturais em seus éxons, sugerindo que elas estão intimamente relacionadas entre si, sob o ponto de vista evolutivo, pois a similaridade entre

seus genes sugere uma ancestralidade genética comum, e também quanto a sua funcionalidade. Todas as proteínas desta família estão localizadas no braço longo do cromossomo 20, com exceção da CETP, que se localiza no cromossomo 16 (Balakrishnan *et al.*, 2013; Bingle *et al.*, 2004).

1.8.1 Proteína de aumento da permeabilidade bactericida (BPI)

A BPI, uma proteína com peso molecular de 55-60 kDa, presente em neutrófilos, eosinófilos, monócitos, fibroblastos tecido epitelial da mucosa intestinal, foi reportada, pela primeira vez, em 1975. É uma proteína multifuncional. Tem papel antimicrobiano agindo como promotora de crescimento de células endoteliais; atua na neutralização do LPS, auxiliando no combate à sepse; além de agir como agente de opsonização, diminuir o estímulo dos neutrófilos, inibir a maturação de células dendríticas e possuir ação antianigiogênica (Eckert *et al.*, 2006).

Para neutralizar o LPS, a BPI se liga à porção do lipídio A da endotoxina, levando a danos na membrana e à morte da bactéria - sendo também, capaz de estabilizar os agregados de LPS, inibindo a ação da LBP, uma vez que a BPI tem um domínio amino-terminal com maior afinidade ao LPS, comparando-a com a LBP (Heumann *et al.*, 1993).

Embora LBP e BPI sejam da mesma família, elas têm atividades antagônicas. Enquanto a BPI é descrita como anti-inflamatória, a LBP é uma das proteínas envolvidas na indução da resposta inflamatória (Heumann *et al.*, 1993; Zweigner *et al.*, 2006).

1.8.2 Proteína de ligação ao LPS (LBP)

A LBP é uma glicoproteína plasmática com peso molecular de 58-60kDa, sintetizada, principalmente, pelo fígado, rim, pulmão e células epiteliais. Assim como a BPI, a LBP liga-se à porção anfipática do lipídio A do LPS. Dessa forma, o monômero de LPS é entregue pela LBP para o receptor de superfície CD14. Esta glicoproteína de membrana está ligada a um grupo fosfatidilinositol glicosilado e é expressa na superfície dos monócitos e das células polimorfonucleares (Schumann *et al.*, 1990; Wright *et al.*, 1990; Wang *et al.*, 1998). O CD14 também existe sob uma forma solúvel presente no soro e é responsável pelas respostas ao LPS de células que não possuem o CD14 na membrana (Frey *et al.*, 1992; Juan *et al.*, 1995), como as células dendríticas (Verhasselt *et al.*, 1997). A proteína CD14 não tem um domínio intracelular, assim, a transdução do sinal é efetuada por proteínas transmembranares, como os receptores Toll-Like (TLR), desencadeando a resposta inflamatória.

Foi descrito que uma única molécula de LBP é capaz de transportar centenas de moléculas de LPS para o CD14 sem ser consumida (Pugin *et al.*, 1993; Tobias *et al.*, 1995).

A LBP tem 45% de homologia com a BPI, 25% de homologia com a CETP e 23% de homologia com a PLTP.

1.8.3 Proteína de transferência de fosfolípidos (PLTP)

A PLTP é uma glicoproteína com peso molecular de 80kDa. Sua principal atuação é na redistribuição de fosfolípidos entre as lipoproteínas ricas em apoB e HDL. Além disso, a PLTP facilita a transferência de inúmeras moléculas, tais como diacilglicerol, fosfatidilcolina e esfingomielina entre as

lipoproteínas plasmáticas. Análise de 16 tecidos humanos mostrou que os órgãos que mais expressam RNAm para esta proteína são: os ovários, timo e placenta, além de concentrações moderadas no pâncreas, intestino delgado, testículos, pulmões e próstata. No plasma, encontra-se ligada, principalmente, às partículas de HDL2. O aumento de FL na HDL, mediado pela PLTP, representa maior disponibilidade de substrato para LCAT. A PLTP pode promover a formação de HDL2 e pré- β HDL, a partir de HDL3 (Rao *et al.*, 1997; Albers *et al.*, 2012).

Gautier e colaboradores (2008) descreveram a atuação da PLTP na resposta inflamatória. Nesse estudo, camundongos com ablação gênica para PLTP apresentaram aumento da mortalidade induzida pelo LPS, maiores taxas de citocinas circulantes e diminuição da redistribuição intravascular de LPS entre as lipoproteínas.

Em humanos, foi observado aumento da atividade da PLTP em pacientes com sepse comparados aos saudáveis (Barlage *et al.*, 2001).

1.8.4 Proteína de transferência de colesterol esterificado (CETP)

A CETP é uma glicoproteína com peso molecular de 66-74kDa produzida por vários órgãos. Tem seu RNA mensageiro expresso, primariamente, no fígado, baço, intestino delgado, adrenais e tecido adiposo (Jiang *et al.*, 1992; Oliveira *et al.*, 1996).

Existe uma variação considerável na atividade da CETP entre os vertebrados. Em ratos, camundongos, porcos, cães, vacas e carneiros, ela é praticamente ausente, enquanto, nos coelhos, a atividade é alta (Ha *et al.*, 1982). No homem, sua atividade é considerada intermediária (Marcel *et*

al.,1990). Além disso, sabe-se que HDL separada pelo método de ultracentrifugação sequencial encontra-se associada à CETP (Groener *et al.*, 1984). Lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL) e lipoproteínas de baixa densidade (LDL) estão associadas também, mas com uma ligação mais fraca.

No transporte reverso de colesterol (TRC), processo pelo qual o excesso de colesterol dos tecidos periféricos (incluindo o da parede arterial) é removido pela HDL e transportado ao fígado para ser reutilizado ou excretado na bile e nas fezes, ou aos tecidos esteroideogênicos para síntese hormonal. A CETP exerce um papel importante, ao transferir o CE das partículas de HDL para as apoB-LP em troca de triacilgliceróis (TG) (Rothblat & Philips, 2010).

O aumento do conteúdo de TG nas HDL facilita a atividade da lipase hepática, reconstituindo partículas pequenas de HDL (pré-βHDL) que são mediadoras do efluxo celular de colesterol (Francone *et al.*,1996; Stein *et al.*, 2005).

Esse sistema se inicia com fluxo unidirecional de colesterol contido em macrófagos via receptores ABCA1 e ABCG1 para as apolipoproteínas pobres em lípidos, as apoA-I e partículas de HDL. Logo após, ocorre esterificação do colesterol pela lecitina colesterol aciltransferase (LCAT), ocorrendo, em seguida, a transferência de CE para as LP que contêm apoB, pela CETP. Por fim, há captação seletiva de CE das HDL pelos receptores SR-BI, expressos no fígado, em gônadas e em adrenais, ou captação de LP que contêm apoB pelos receptores B-E e LRP no fígado (Wang *et al.*, 2004; Terasaka *et al.*, 2007; Rothblat & Philips, 2010) (Figura 1).

Figura 3. Transporte reverso de colesterol. A apo A-I e as partículas nascentes de HDL (pré-β-HDL) removem o excesso de colesterol celular por meio da interação com o receptor ABCA-1. Após esterificação do colesterol pela LCAT, formam-se, gradativamente, partículas maiores de HDL. O colesterol esterificado pode ser diretamente removido das HDL pelo receptor SR-BI no fígado ou em órgãos esteroidogênicos. Por intermédio da CETP, o CE é transferido para as lipoproteínas ricas em apoB, as quais podem ser removidas pelos receptores B-E ou LRP no fígado. Figura adaptada de Castilho (2012).

1.9 CETP e seu papel controverso nas doenças cardiovasculares

A CETP desempenha um papel ambíguo na aterosclerose. Por um lado, distribui o colesterol da partícula de HDL entre as apoB lipoproteínas, de modo a ser captado por distintos receptores hepáticos (scavenger, B/E e LRP) sendo fundamental na via indireta do TRC. Por outro, o enriquecimento de colesterol nas LP potencialmente aterogênicas, como as LDL, eleva a possibilidade de oxidação desta partícula, contribuindo para a formação de placas de ateroma (Oliveira & de Faria, 2011). Estudos demonstraram que o aumento na atividade de CETP pode promover aterogênese ao estimular a transferência de CE para LDL em pacientes com baixa concentração de HDL (Tall *et al.*, 1987).

Humanos com deficiência de CETP, por alterações genéticas, apresentam concentrações plasmáticas elevadas de HDL-C (Brown *et al.*, 1989).

O primeiro estudo populacional sobre CETP e aterosclerose (Honolulu Heart Program) mostrou que a deficiência genética de CETP está associada com aumento da prevalência de doença aterosclerótica, sendo, então, um fator de risco independente para a doença, apesar da elevação moderada de HDL-C no plasma (Zhong *et al.*, 1996).

Investigações populacionais posteriores indicaram efeito oposto, ou seja, a deficiência de CETP resultando em proteção contra aterosclerose (Moriyama *et al.*, 1998). Estudos que descrevem a completa deficiência de CETP em famílias japonesas sugeriram que esta mutação está associada à longevidade (Inazu *et al.*, 1990).

Entretanto, um estudo em Omagari (Hirano *et al.*, 1997), região também japonesa, onde a deficiência de CETP é extremamente frequente, mostrou que, em pessoas com 80 anos ou mais, a ausência de CETP e altas concentrações de HDL no plasma eram significativamente menores do que em indivíduos mais jovens, indicando que a elevação de HDL causada pela ausência de CETP não estaria associada à longevidade. Nesse mesmo estudo, demonstrou-se que a mutação do gene da CETP era mais frequente em pacientes com doenças coronarianas, em comparação com indivíduos saudáveis (Hirano *et al.*, 1997, Oliveira & de Faria 2011).

No estudo de Framingham, iniciado em 1948, o qual desenvolve pesquisas relacionadas a doenças cardiovasculares, foram analisados indivíduos com mutação genética associada à diminuição da atividade da CETP. Em um dos estudos, verificou-se que, de fato, essa mutação aumenta a

concentração de HDL-C. Esses efeitos, porém, conferiram menor risco cardiovascular entre os indivíduos analisados (Ordovas *et al.*, 2000). Em outro estudo de Framingham, os resultados foram totalmente contrários ao anterior. A deficiência de CETP conferiu maior risco cardiovascular entre os indivíduos (Vasan *et al.*, 2009).

1.10 Inibidores de CETP

O papel controverso da CETP como proteína pró ou antiaterogênica tem sido amplamente discutido (Cazita & Quintão 2010; Sirtori *et al.*, 2011). De modo geral, sabe-se que a sua atividade está inversamente relacionada às concentrações plasmáticas de HDL-C, e que baixo HDL-C constitui um fator de risco independente para o desenvolvimento de aterosclerose e doenças coronarianas (Gordon *et al.*, 1989; Thompson *et al.*, 2008).

Dessa maneira, estratégias terapêuticas para aumentar os níveis de HDL-C têm sido intensamente pesquisadas e os inibidores de CETP aparecem como algo promissor pela indústria farmacêutica na última década (Barter & Rye, 2011; Sirtori *et al.*, 2011).

Os primeiros estudos começaram a ser realizados a partir do final da década de 90 e no início dos anos 2000 (Sugano *et al.*, 1998; Rittershaus *et al.*, 2000; Gaofu *et al.*, 2005). Os experimentos iniciais em modelos animais apresentaram resultados promissores: coelhos submetidos a dietas aterogênicas tiveram aumentos significativos nos níveis circulantes de HDL-colesterol e redução na área das lesões ateroscleróticas, quando tratados com dois potentes inibidores da atividade da CETP, JTT 705 e Torcetrapib (Okamoto *et al.*, 2000; Morehouse *et al.*, 2007).

O estudo ILLUMINATE (*Investigation of Lipid Level Management to Understand its Impact in Atherosclerotic Events*) foi o primeiro teste clínico do primeiro inibidor de CETP, o Torcetrapib (Barter & Rye, 2012), o qual teve suas pesquisas suspensas na fase III de experimentação.

Os efeitos colaterais do fármaco foram analisados pelo estudo global, o ILLUSTRATE (*Investigation of Lipid Level Management Using Coronary Ultrasound to Assess Reduction of Atherosclerosis*). Apesar da elevação dos níveis de apolipoproteína A e HDL-C em mais de 60%, houve inúmeros efeitos adversos, tais como: aumento na pressão arterial, aumento da concentração sérica de aldosterona, levando a danos cardiovasculares; infecção e sepse (Barter & Rye, 2011; Sirtori *et al.*, 2011).

Desta forma, a experiência com o Torcetrapib como estratégia de elevar as concentrações de HDL-C à custa da inibição da CETP como forma de prevenir doença cardiovascular passou a ser questionada, inclusive pela tendência de aumentar a incidência de câncer e infecção.

O segundo inibidor, o dalcetrapib, em fase III de experimentação, também teve suas pesquisas suspensas devido à ineficácia. O fármaco aumentou a concentração de HDL-C em 30%, mas não diminuiu a concentração de LDL-C (Barter & Rye 2011).

Até o momento, dois outros inibidores, o anacetrapib e o evacetrapib, já em fase III de experimentação, estão sendo investigados. Ambos têm sido eficazes no aumento da concentração de HDL-C e na diminuição de LDL-C (Barter & Rye 2012).

O estudo DEFINE (determinação da eficácia e tolerabilidade da inibição da CETP com anacetrapib), em sua fase III, avaliou a segurança da inibição da

CETP pelo anacetrapib em pacientes com alto risco para desenvolver doenças coronarianas. Na 76ª semana, o tratamento com anacetrapib apresentou redução de 39,8% de LDL e aumento de 138,1% de HDL-C em pacientes que estavam sendo tratados também com estatinas. O tratamento foi bem tolerado sem importantes diferenças clínicas nos parâmetros-chave de segurança pré-definidos, tais como pressão arterial, eletrólitos e aldosterona (Gotto *et al.*, 2014).

Após 12 semanas sem o tratamento com o anacetrapib, havia efeitos residuais (cerca de 50 a 60% dos efeitos observados com a droga foram observados sem a droga na 12ª semana depois). Os pesquisadores concluíram que o anacetrapib pode ser encontrado na circulação mesmo após 4 anos do tratamento (Gotto *et al.*, 2014 b).

Os estudos com evacetrapib têm demonstrado que a inibição de CETP, tanto em humanos quanto em camundongos transgênicos, não apresentou aumento da aldosterona ou pressão arterial. Na fase I do estudo conduzido em indivíduos japoneses saudáveis, evacetrapib foi bem tolerado quando administrado por 14 dias numa dose de 30 a 600mg, com aumento significativo de HDL-C e diminuição de LDL-C. Na fase II, administrado por 12 semanas, foi conduzido nos Estados Unidos e Europa, aumentando a HDL-C em mais de 129% e diminuindo a LDL-C em 36%, utilizando-se em, aproximadamente, 400 pacientes com dislipidemia. O fármaco foi bem tolerado, não apresentando nenhuma adversidade na pressão arterial ou nos níveis de mineralocorticoides (Teramoto *et al.*, 2014).

1.11 CETP: Novas funções além do transporte reverso de colesterol

Estudos atuais vêm indicando que a CETP, provavelmente, possui outras funções, além daquelas relacionadas ao metabolismo plasmático de lipoproteínas (Oliveira & de Faria, 2011). Pesquisas com grupos de portadores da doença de Alzheimer têm demonstrado que os principais polimorfismos do gene da CETP, I405V, TaqI B e C-629A, relacionados com menor atividade da proteína e maiores concentrações plasmáticas de HDL, podem estar associados ao surgimento do distúrbio, embora ainda haja controvérsias se de maneira direta ou inversa. Alguns estudos indicam que a presença dos alelos mutantes seria protetora e que a redução da atividade da CETP retardaria o surgimento dos sintomas de demência (Rodríguez *et al.*, 2006; Sanders *et al.*, 2010). No entanto, há trabalhos que apresentaram resultado oposto (Arias-Vásquez *et al.*, 2007) ou que não encontraram correlação entre tais polimorfismos e a manifestação da doença (Fidani *et al.*, 2004).

As variações do gene da CETP já foram implicadas, também, com fenótipos de longevidade excepcionalmente alta em determinadas populações (Barzilai *et al.*, 2003; Schechter *et al.*, 2010; Koropatnik *et al.*, 2008), mas, do mesmo modo que nos estudos com pacientes de Alzheimer, a correlação entre menor atividade da CETP e aumento da expectativa de vida ou melhoria do estado de saúde na senescência ainda não foi comprovada (Hirano *et al.*, 1997; Arai *et al.*, 2003; Cellini *et al.*, 2005; Capri *et al.*, 2006).

Outro estudo mostrou que a elevação dos níveis plasmáticos de apo CIII agrava a obesidade induzida por dieta, e que a expressão da CETP em concentrações fisiológicas reverte este efeito adipogênico, indicando um papel da CETP na modulação da adiposidade (Salerno *et al.*, 2007).

Em 2008, demonstramos que camundongos transgênicos para a CETP humana são mais resistentes à exposição ao LPS que os animais controles selvagens, apresentando menores índices de mortalidade e quantidades plasmáticas reduzidas de TNF α e IL-6, quando em contato com a toxina. Além disso, a redução da mortalidade foi correlacionada positivamente com a quantidade de CETP, uma vez que os animais homozigotos foram mais resistentes ao LPS que os heterozigotos e selvagens. Apontando que a CETP, aparentemente, também está relacionada à inflamação e aos mecanismos de defesa do organismo contra infecções.

Trabalho recente em uma unidade de terapia intensiva no Brasil demonstrou uma correlação positiva entre a concentração plasmática de CETP e sobrevida de pacientes com sepse. Neste estudo, os pacientes que não sobreviveram à sepse apresentaram menor concentração plasmática de CETP quando comparados aos sobreviventes (Grion *et al.*, 2010).

Outro estudo relatou diminuição da atividade da CETP durante sepse clínica e após endotoxemia experimental (Leves *et al.*, 2007).

Estes achados são altamente relevantes, uma vez que houve aumento significativo de infecções nos pacientes tratados com o inibidor da CETP (Barter *et al.*, 2007) e ganha uma atenção adicional no contexto de sepse em humanos.

2. JUSTIFICATIVA

A sepse causa alto índice de mortalidade nas UTIs de todo o mundo, tornando-se um grave problema de saúde pública. Apesar dos inúmeros estudos realizados em busca de alternativas terapêuticas, o entendimento acerca dos mecanismos envolvidos permanece restrito.

Cazita e colaboradores (2008 b), mostraram que a expressão da CETP foi capaz de prevenir a mortalidade em camundongos transgênicos para CETP humana comparados aos controles irmãos não transgênicos após endotoxemia.

Entretanto, alguns estudos mostram que a patogênese da sepse causada pela administração de LPS difere da induzida por um foco infeccioso. Desta forma, é importante demonstrar se a sobrevida dos animais transgênicos para CETP observada neste estudo foi específica para o LPS ou comum à sepse usando um modelo que melhor mimetiza a sepse em humanos, como a CLP. Considerando, ainda, que o inibidor de CETP, o Torcetrapib, foi interrompido devido a mortes causadas por infecção e sepse em humanos, julgamos de fundamental importância a continuação dos estudos sobre o papel da CETP na resposta imune. Esta interação entre a pesquisa experimental e clínica, na investigação sobre sepse, torna-se essencial para melhor compreensão dos mecanismos envolvidos, além de estabelecer novas perspectivas terapêuticas.

3. OBJETIVO

3.1 Objetivos gerais

Avaliar a participação da CETP na resposta inflamatória induzida por sepse polimicrobiana e em macrófagos estimulados com LPS.

3.2 Objetivos específicos

Análise *in vivo*: Avaliar, em animais que expressam o gene da CETP humana comparados aos controles irmãos não transgênicos, o padrão da resposta inflamatória após a indução de sepse polimicrobiana por meio de ligadura e perfuração do ceco (CLP) determinando:

- ✓ Curva de sobrevivência;
- ✓ A liberação de citocinas inflamatórias;
- ✓ O perfil de lipoproteínas;
- ✓ A migração de leucócitos para a cavidade peritoneal;
- ✓ A expressão hepática do receptor TLR4 e da enzima AOA.

Análise *in vitro*: Avaliar o papel da CETP endógena e exógena na resposta inflamatória em macrófagos:

CETP exógena: Macrófagos obtidos de peritônio de camundongos não transgênicos (WT) tratados com LPS na ausência ou presença de diferentes concentrações de CETP humana recombinante, determinando:

- ✓ A captação do LPS;
- ✓ A expressão de TLR4;
- ✓ A ativação do NF- κ B;
- ✓ A liberação de citocinas inflamatórias.

CETP endógena: Macrófagos obtidos de peritônio de camundongos transgênicos comparados aos controles irmãos não transgênicos (WT) tratados com LPS;

4. MÉTODOS

4.1 Desenho experimental

Cruzamento entre matrizes heterozigóticas para a CETP humana de camundongos da linhagem C57BL6/J

4.2 Animais

Os protocolos experimentais para utilização de animais estavam de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e todos os procedimentos deste projeto foram aprovados pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP (Cappesq 029/12).

As matrizes fundadoras da colônia de animais transgênicos para a CETP humana C57BL/6J, foram procedentes da Divisão de Medicina Molecular da Universidade de Columbia, NY, EUA, e foram gentilmente cedidos pela Profa. Helena C. F. Oliveira, da UNICAMP, com a anuência do Dr. Alan Tall. Os camundongos CETP são da linhagem 5203, na qual foi inserido um minigene da CETP humana. Essa linhagem, além de conter os elementos responsivos naturais do gene da CETP, possui padrão de expressão tecidual da proteína semelhante ao humano (Jiang *et al.*, 1992). Os camundongos foram gerados no biotério de apoio localizado no 4º andar da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo sob os cuidados da equipe de profissionais do biotério (veterinários e técnicos especializados) e responsabilidade do Dr. Luiz Fernando Onuchic e da Dra. Patricia M. Cazita. Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas, em um número de 5 animais/gaiola, em condições de fotoperíodo (12 x 12h), e submetidos à alimentação *ad libitum* de ração comercial e água.

Camundongos machos, com idade entre 8-12 semanas, que expressam o gene humano da CETP e controles irmãos não transgênicos (WT) foram obtidos a partir do cruzamento das matrizes heterozigóticas. A confirmação da expressão da CETP ou não (WT) foi realizada pela concentração e atividade plasmática da proteína (**Tabela 1**).

Tabela 1. Atividade e concentração plasmática de CETP para trigem dos animais.

	CETP	WT
Concentração (µg/mL)	5,804 ± 2,074 ^a	0,0247 ± 0,0224
Atividade (%transferência¹⁴C-CE)	42,00±14,54 ^a	8,417±4,033

Análise estatística: teste *Mann Whitney*. Massa e atividade: ^a $p < 0,01$: (CETP vs WT). Houve correlação positiva entre a massa e atividade plasmática de CETP. Pearson r : 0.9527, $p < 0,001$; $n=24$.

4.3 Determinação da atividade plasmática de CETP

As lipoproteínas utilizadas para determinação da atividade da CETP foram obtidas a partir de pool de plasma humano de doadores normolipidêmicos. O sangue foi coletado em tubos contendo EDTA 10% e imediatamente centrifugado a 2.500 rpm por 15 minutos, a 4°C, para separação do plasma e em seguida foram adicionados os conservantes: benzamidina 2 mM (5 µL/mL), gentamicina + cloranfenicol 15 mM (20 µL/mL), fenilmetil sulfonyl fluoreto (FMSF) 0,5 mM (0,5 µL/mL) e aprotinina 10 mg/mL (5 µL/mL).

As lipoproteínas foram separadas por ultracentrifugação sequencial, utilizando-se um rotor 50 Ti em ultracentrífuga Beckman Modelo L-8 (Beckman Instruments, Palo Alto, CA, EUA) (Havel *et al.*, 1955). O plasma foi ultracentrifugado a 40.000 rpm, 4°C por 20 horas, após ajuste da densidade com KBr sólido para 1,063 g/mL para obtenção das frações VLDL e LDL. O infranadante do plasma de densidade maior que 1,063 g/mL foi utilizados posteriormente para obtenção da fração de HDL.

A HDL foi marcada com [4-¹⁴C]-colesteril oleato (¹⁴C-CE) utilizando 3-5 µCi por mL de infranadante do plasma de densidade maior que 1,063 g/mL.

Inicialmente, o isótopo dissolvido em tolueno foi seco sob fluxo de nitrogênio rediluído em 100 µL de etanol, e adicionado gota-a-gota ao infranadante, sob agitação lenta, durante cinco minutos. A mistura foi, então, incubada a 37°C em banho-maria, com agitação por 24 horas. Em seguida, a densidade foi ajustada com KBr sólido para 1,21 g/mL e ultracentrifugada a 40.000 rpm a 4°C durante 40 horas para obtenção da fração de HDL. A HDL radiomarcada foi dialisada utilizando-se tampão fosfato com 0,01% de EDTA (pH 7,4), filtradas com filtros estéreis de 0,22 micra, e mantida em geladeira até o momento a sua utilização. O conteúdo de colesterol total, triglicérides e proteína foi determinado para verificar se a fração obtida correspondia a HDL e os resultados foram satisfatórios (dados não apresentados).

Utilizou-se HDL radiomarcada com colesterol éster (^{14}C -CE) como doadora de colesterol e as lipoproteínas VLDL + LDL comoceptoras, na presença do plasma dos animais como fonte da CETP (Mcpherson *et al.*, 1991; Cazita *et al.*, 2003; Casquero *et al.*, 2006). As incubações foram realizadas a 37°C durante 2 horas. Após esse período, as lipoproteínas contendo apolipoproteína B (VLDL e LDL) foram precipitadas com uma solução de sulfato de dextrana-MgCl₂ (1:1), centrifugadas a 2.500 rpm por 30 minutos e o sobrenadante coletado para a contagem da radiação.

A radioatividade foi determinada utilizando-se solução contadora. O cálculo da porcentagem de transferência de [^{14}C]-CE das frações de HDL para as LP contendo apolipoproteína B foi realizado segundo a expressão:

$$\% \text{ Transferência de } [^{14}\text{C}]\text{-CE} = [1 - (\text{contagem da radioatividade a } 37^\circ\text{C} / \text{contagem da radioatividade do branco})] \times 100.$$

4.4 Concentração plasmática de CETP

A determinação da concentração plasmática de CETP foi realizada por kit imunoenzimático (ELISA) da empresa Wako (USA), específico para determinação de CETP em plasma humano, uma vez que os animais utilizados no presente estudo expressavam CETP humana.

4.5 Modelo experimental de sepse: Ligadura e perfuração do ceco (CLP)

A fim de se investigar a relevância da CETP na sepse, animais transgênicos para a CETP humana e WT foram submetidos ao modelo experimental de sepse polimicrobiana, denominado ligadura e perfuração do ceco CLP (Cecal Ligation and Puncture) (**Figura 4**). Os camundongos foram pesados previamente e anestesiados por meio de injeção intramuscular de cloridrato de dihidrotiazina (Rompum®- 10 mg/kg de peso corporal) e cloridrato de cetamina (Ketamin® 60 mg/kg de peso corporal). Após a realização de tricotomia na região abdominal e assepsia local foi feita com álcool, os animais foram submetidos a uma laparotomia com incisão longitudinal e subsequente exposição do ceco. Este foi semi-ocluído com fio de seda, ligadura (1cm), na região próxima à válvula íleocecal. O ceco foi perfurado transversalmente com agulha de calibre 24G uma única vez, em seguida, foi levemente pressionado para promover o extravasamento do conteúdo fecal e recolocado na cavidade peritoneal, a qual foi suturada com fio de seda. Os animais foram observados por um período de 5 dias com intervalo de 8 horas para construção da curva de sobrevivência (Rittirsch, *et al.*, 2009).

Outros grupos de animais CETP e WT foram selecionados e submetidos à CLP, como descrito acima. Após 24 ou 48 horas da cirurgia foram eutanasiados para obtenção do sangue periférico, lavado peritoneal e fígado.

Figura 4. Esquema da ligadura e perfuração do ceco (CLP). O ceco dos camundongos foi exposto, em seguida foi feita ligadura de 1 cm, perfurou-se transversalmente o ceco com agulha de calibre 24G uma única vez. Figura adaptada de BURAS *et al.*, (2005).

4.6 Determinação da migração de leucócitos para cavidade peritoneal

Foi avaliada a migração de leucócitos para cavidade peritoneal após 24 ou 48 horas da CLP dos animais em estudo. As células foram obtidas após injeção de 6 mL de tampão fosfato sem EDTA, estéril, pH 7,4 na cavidade peritoneal. A contagem dos leucócitos totais no lavado peritoneal (linfócitos + neutrófilos) foi efetuada com auxílio do equipamento *Cell-Dyn*. Os resultados foram expressos como número de células $\times 10^3$ /cavidade animal.

4.7 Aferição dos mediadores Inflamatórios

A aferição das citocinas TNF- α , IL-6 e IL-10 no plasma e no sobrenadante do meio de cultura celular, foi realizada pelo método de ELISA após os tratamentos. Os kits foram adquiridos da R&D Systems, USA. As amostras foram processadas de acordo com as instruções do fabricante.

A densidade óptica das amostras foi determinada em leitor de ELISA (Genius Plus–Tecan) com filtro de 450nm.

4.8 Extração e avaliação da integridade do RNA

Após 48h da CLP, os fígados dos animais em estudo, foram retirados e armazenados em nitrogênio líquido. Posteriormente fragmentados em pulverizador de tecidos (*Mikro-Dismembrenator II B. Braun. Melsugen, RFA*) e adicionado Trizol (*Invitrogen, Eugene Orgeon, USA*) (1,0 mL) para armazenamento. A extração do RNA foi padronizada por meio do emprego de colunas RNeasy Mini Kit (*Qiagen, Hilden, Germany*), que permite extrair moléculas de RNA por meio da adesão à membrana de sílica da coluna.

Para avaliação da integridade do RNA foi utilizado kit RNA 6000 Nano (*Agilent Technologies, Waldbronn, Germany*), que se baseia na separação eletroforética do RNA em microchips e leitura do sinal de fluorescência no aparelho Agilent 2100 Bioanalyzer (*Agilent Technologies, Waldbronn, Germany*). Neste método a integridade do RNA é determinada pelo cálculo RIN (*RNA Integrity Number*). Este sistema visa eliminar a interpretação individual no controle de qualidade do RNA e baseia-se em “notas” de 1 a 10 que são dadas às amostras, sendo que 1 corresponde ao maior grau de degradação e 10 ao

maior grau de preservação do RNA. Todas as amostras utilizadas apresentaram RIN maior que 7, assegurando ótima qualidade.

4.9 Análise da expressão de RNAm de TLR4 e AOA_H hepáticos

A análise de expressão gênica no fígado por amplificação do cDNA em tempo real foram utilizadas sondas marcadas com FAM adquiridas no formato TaqMan Gene Expression Assays (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) identificadas pelos seguintes códigos:

TLR4: Mm00445273_m1

SR-B1: Mm00450234_m1

AOAH: Mm00600104_m1

β -actina: Mn00607939_s1

GAPDH: Mm99999915_g1

A PCR foi realizada utilizando-se uma solução denominada Gene Expression Master Mix (*Applied Biosystems, Foster City, CA, USA*). De acordo com o protocolo do produto, as temperaturas utilizadas na reação de PCR em tempo real foram: um ciclo de 2 min a 50°C; um ciclo de 10 min a 95°C e 40 ciclos intercalando 15s a 95°C e 1 min a 60°C.

Para padronização dos controles endógenos foram escolhidos 5 genes constitutivos (β -actina, PGK1, GAPDH, HPRT1 e 18s). Foram testadas 9 amostras.

O resultado da expressão gênica destas amostras foi analisado utilizando o programa DataAssist versão 3.0 (*Applied Biosystems, Foster City, CA, USA*), o qual é fundamentado nos conceitos estabelecidos por

Vandesompele *et al.*, (2002). Os genes cujas expressões menos variaram nas amostras analisadas foram β -actina e GAPDH, deste modo foram escolhidos com controles endógenos do presente estudo.

O método escolhido para o cálculo da quantificação relativa foi o Ct (*Cycle threshold*) comparativo ($\Delta\Delta Ct$) (Livak & Schmitgen, 2001) devido ao grande número de amostras e genes-alvo a serem analisados. Neste método não há necessidade de utilizar curva padrão em todas as placas, reduzindo consumo de tempo e reagentes. No entanto, para que este método possa ser utilizado é necessária a validação das eficiências dos ensaios dos genes-alvo e dos controles endógenos, que devem ser semelhantes. Desta forma, para cada gene em questão foi feita curva de diluição de 5 pontos a fim de verificar a linearidade e eficiência da amplificação. A eficiência é calculada de acordo com a inclinação da curva e deve ser de 100%, aceitando-se variação de $\pm 10\%$.

Para um ensaio de PCR em tempo real ter 100% de eficiência, a inclinação (*slope*) da curva deve ser próxima de -3,3 (Pfaffl, 2001).

As curvas também permitiram determinar a concentração ideal de cDNA a ser usada em cada ensaio (10 ng).

Em função do grande número de amostras e genes analisados, não foi possível realizar todas as reações de PCR ao mesmo tempo. Para minimizar a variação inter-ensaio, cada placa de reação continha uma amostra controle que esteve presente em todas as demais placas.

Todas as reações de PCR dos genes alvo sempre foram acompanhadas, na mesma placa, dos dois controles endógenos, prática ideal recomendada na metodologia de PCR em tempo real (Bustin *et al.*, 2009).

Primeiramente foi feita a normalização de dados brutos de expressão e, devido à utilização de dois normalizadores tentaram-se três tipos diferentes de normalização: Média geométrica do CT de genes normalizadores, normalização exclusiva com β -actina e normalização exclusiva com GAPDH.

Foram calculadas as expressões relativas dos genes utilizando como amostra referência controle (animal controle CETP não submetido à CLP), pois esta amostra está presente em todas as placas e Δ CTs calculados pelos métodos citados anteriormente. A expressão relativa foi determinada pelo método consagrado de $2^{-\Delta\Delta CT}$.

A normalidade dos dados foi verificada pela inspeção visual de gráficos tipo Q-Q plot e pelo teste de Shapiro-Wilk. A combinação dessas duas técnicas evidenciou que a normalização com β -actina foi o método mais consistente por seguir a distribuição normal em todos os genes estudados. Para não causar conflito com mudanças de normalizador para cada gene escolheu-se usar $\Delta\Delta CT$ obtido pela normalização com β -actina em todas as comparações.

As comparações entre os grupos CETP e WT após 48 horas de CLP, foram realizadas utilizando a quantificação relativa (RQ) pelo software (*StepOne Plus* versão 2.1) e, resumidamente, baseia-se nas seguintes fórmulas:

$$\Delta CT = CT_{\text{gene-alvo}} - CT_{\text{controle endógeno}}$$

Onde o CT gene-alvo e CT controle endógeno correspondem à média dos valores de CT das triplicatas. Em seguida utilizou-se o teste t de Student.

4.10 Determinação da expressão proteica de TLR4 e AOA por Western Blot

Após 48h da CLP, os fígados foram retirados, armazenados em nitrogênio líquido, e fragmentados em pulverizador de tecidos (*Mikro-Dismembrator II B. Braun. Melsugen, RFA*), logo após adicionou-se tampão tris (TBS) 1X acrescido de inibidores de protease (aprotinina 1,5 μ M; leupeptina 1 μ M; pepstatina 2 μ M e 0,1mM), centrifugadas e ressuspensas em SDS glicerol. As amostras foram mantidas a -70°C até seu processamento.

Quantidades iguais de proteína celular (40 μ g) foram aplicadas em gel de poliacrilamida 10%, e separadas por eletroforese (150 V, por 1h). Após transferência para membrana de nitrocelulose (346 mA, por 1h) e bloqueio de sítios não ocupados na mesma (solução de leite desnatado 5% em PBS acrescido de Tween 0,05%), as membranas foram incubadas com os seguintes anticorpos primários: anti-TLR4 1:1000 (*Abcam, Cambridge, MA, EUA*), anti-AOA 1:1000 (*Abcam, Cambridge, MA, EUA*) e β -actina (*Fitzgerald Industries International Inc, Concord, MA*) overnight. Ao final da incubação, as membranas foram lavadas 3 vezes por 10 min com TBS com Tween 20 (0,05%) e reagidas com anticorpo secundário conjugado à peroxidase. A visualização das bandas foi obtida após reação com ECL (*enhanced chemiluminescence – Pierce, Rockford, IL, EUA*) e a revelação da quimioluminescência foi executada com o aparelho ImageQuant 300 (*GE Healthcare*). As bandas foram avaliadas em pixels, pelo software de análise ImageQuant TL (*GE Healthcare*). Os resultados foram apresentados em unidades arbitrárias corrigidas pela expressão de β -actina.

Em algumas situações as mesmas membranas foram incubadas com mais de um anticorpo. Para tanto, ao final da revelação, a membrana foi lavada 5 vezes com água deionizada e foram adicionados 50 mL de NaOH 0,8 M. A membrana foi agitada vigorosamente por 5 min, o NaOH foi descartado e a membrana foi lavada com água deionizada por diversas vezes ao longo de 5 min. A membrana permaneceu em água por 1 h sob agitação lenta, foi lavada por 2 vezes com TBS-T e bloqueada com solução de leite desnatado (5% em PBS-T) por 30 min. Ao final do bloqueio a membrana foi incubada novamente com o novo anticorpo primário overnight (Castilho, 2012).

4.11 Cultura celular

Os macrófagos foram obtidos da cavidade peritoneal dos camundongos WT e CETP lavando-se o peritônio com 6 mL de uma solução de tampão fosfato (PBS - NaCl 150 mmol/L, Na₂HPO₄ 20mmol/L, NaH₂PO₄ 14 mmol/L, NaOH 1 mmol/L – pH 7,4), estéril, acrescido com penicilina G potássica e sulfato de estreptomicina (Gibco, Grand Island, NY, USA). As células coletadas em tampão fosfato foram centrifugadas a 500 x g, 4°C, por 2-3 min. Desprezou-se o sobrenadante e após a obtenção do botão celular, adicionou-se o meio de cultura RPMI contendo 10% de soro fetal bovino (FCS) e os antibióticos. As células foram cultivadas em placas de cultura de 10 mm na concentração de 1x10⁶ células/poço e mantidas em incubadora de CO₂ 5% a 37°C por 48 horas até atingirem confluência (Castilho, 2012).

4.12 Determinação da viabilidade celular pela liberação de Lactato Desidrogenase

Para determinar o possível efeito citotóxico do LPS e da CETP (*Roar Biomedical NY, USA*), ensaios de viabilidade celular foram executados baseados na liberação da enzima lactato desidrogenase (LDH) para o meio extracelular. LDH elevada pode refletir morte celular. Assim, A LDH foi avaliada no meio de cultura utilizando-se o kit *In Vitro Toxicology assay (Sigma-Aldrich)*. Ao final da incubação e tratamentos, alíquotas do meio de cultura foram removidas e centrifugadas a 250 g por 4 min, o sobrenadante foi transferido para tubos estéreis onde foram adicionados o substrato, o cofator e o corante da reação (1:1:1) em um volume 2X maior que o volume de meio. A solução foi incubada a TA por 25 min e a reação foi interrompida com a adição de 1/10 do volume de HCL para posterior leitura no espectrofotômetro. A leitura da absorbância foi feita a 490/690 nm. A liberação de LDH no meio de cultura não diferiu entre os tratamentos.

4.13 Análises por microscopia confocal

A CETP, por apresentar homologia com a LBP ou por razões ainda desconhecidas, pode competir com esta proteína na apresentação do LPS ao receptor TLR4. Na hipótese de que a CETP possa se ligar ao LPS, uma análise de microscopia confocal foi realizada na qual se utilizou, além da CETP, a LBP que sabidamente é capaz de ligar-se ao LPS.

Para tanto, placas de cultura de células, com doze poços, previamente acrescidas de lamínulas de vidro, com diâmetro de 13mm, foram semeadas e

cultivadas com macrófagos obtidos da cavidade peritoneal dos camundongos WT (de acordo com o item 4.11) por 48 horas em meio RPMI.

Posteriormente, as células foram incubadas por 4h com LPS-FITC (1 µg) (Sigma-Aldrich, MO, USA) na presença 1µg de CETP ou LBP recombinante como controle. Em seguida, foram lavadas 3 vezes com PFA 4% (diluído em PBS 1:1) e fixadas com PFA 4% (sem diluição) por 1 hora. Lavou-se novamente com PBS 3 vezes e adicionou-se triton 0,2% por 30 minutos. Lavou-se novamente com PBS 3 vezes.

O bloqueio com PBS albumina 1% (1g/100mL) a 37°C por 30 minutos. Em seguida foi feita marcação com os anticorpos primários: anti-CETP (1:200) (*Abnova, Walnut, CA, USA*), LBP (1:100) (*R&D Systems, USA*) e anti-CD68 (1:400) (*Serotec, EUA*) como marcador de macrófagos. As células foram incubadas overnight a 4°C. Logo após, foram lavadas com PBS por 3 vezes, marcadas com os respectivos anticorpos secundários: anti-camundongo Alexa-fluor 350 (1:200) (*Invitrogen, Eugene Orgeon, USA*), anti-cabra Cy3 (1:100) (*Abcam, Cambridge, MA, EUA*) e anti-CD68 (1:400).

As células foram incubadas em temperatura ambiente e após 1 hora, lavadas com PBS 3 vezes. Adicionou-se 50 µl de DAPI (*Invitrogen, Eugene Orgeon, USA*) e incubou-se por cerca de 20 minutos. As células foram novamente lavadas 2 vezes com PBS, e antes de retirar-se o PBS da última lavagem retirou-se as lamínulas de cada well com auxílio de uma pinça, e as mesmas foram fixadas sobre lâminas de hemograma com uma gota de glicerol + PBS.

Controle Branco foi realizado somente com o marcador nuclear DAPI (*Hoechst*) a fim de identificar toda a autofluorescência da amostra. O controle

negativo foi realizado sem os anticorpos primários, mas com todos os secundários com a finalidade de identificar qualquer marcação inespecífica devido às ligações cruzadas entre anticorpos, à partir destes parâmetros as amostras foram analisadas. Foram quantificados 3 campos aleatórios de tratamento com aumento de 600X. A detecção do sinal foi efetuada com scanner de microscopia confocal (*ZEISS - LSM 510 Meta Laser Scanning, Alemanha*).

A análise foi realizada no Laboratório de Biologia Vascular do Instituto do Coração (INCOR) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, com o auxílio técnico de Ana Lúcia Garippo e coordenado pelo Prof. Dr. Francisco Laurindo.

4.14 Análises por citometria de fluxo

A citometria de fluxo foi realizada com o objetivo de detectar e comparar a taxa de captação de LPS, os níveis de expressão de TLR4, a produção da subunidade p65 do NF- κ B (região fosforilada) e TNF- α , entre os macrófagos obtidos da cavidade peritoneal dos camundongos WT e CETP.

Inicialmente, realizou-se um protocolo de cultura celular utilizando-se duas concentrações de LPS (1 ou 2 μ g) (*Alexa fluor 488, E. coli Serotype O55:B5, Invitrogen Molecular Probes, Eugene Oregon, USA*) em diferentes intervalos de tempo (30 minutos, 2h, 4h, 24h e 48h).

Foram testadas também diferentes titulações do anticorpo anti-TLR4 (1:200; 1:100; 1:50) cujos fluorocromos utilizados foram PE (vermelho) e FITC (verde) da Santa Cruz *Biotechnology, Inc, CA, USA*.

A partir dos resultados encontrados (dados não demonstrados), passou-se a utilizar 1 µg de LPS e anticorpo anti-TLR4 (1:50) nas análises celulares em 24 horas.

Realizou-se, também, um teste e padronização da quantidade de CETP humana recombinante de duas empresas, a *Abnova, Walnut, (CA, USA)* e a *Roar Biomedical (NY, USA)*. A CETP recombinante da Abnova não apresentou atividade de transferência desta forma, utilizou-se nos experimentos seguintes apenas a da empresa Roar, que apresentou atividade de transferência de 42%, utilizando-se 0,5 µg da proteína, semelhantes ao encontrado no plasma dos camundongos transgênicos.

Os experimentos de captação celular do LPS, da expressão de TLR4 e p65 do NF-κB foram realizados na presença de diferentes concentrações de CETP recombinante da Roar: 0,1; 0,5 e 1,0 µg.

Após o estímulo com LPS na ausência ou presença CETP, retirou-se o meio de cultura no qual as células estavam inseridas, para futuras análises de citocinas inflamatórias, IL-6, IL-10 e TNF-α, pelo método de ELISA, mantidos a -70°C.

A forma de descolamento das células para a técnica de citometria de fluxo também foi padronizada, utilizando-se EDTA 1mM, Tripsina 0,05% + 1 mM de EDTA ou Tripsina 0,25% + 1 mM de EDTA. Resultados satisfatórios foram obtidos com a utilização da Tripsina 0,25%. Portanto, nos experimentos seguintes, as células foram tratadas com LPS, descoladas com tripsina 0,25% e incubadas por 40 minutos.

Após descolamento, adicionou-se 500 µL de meio de cultura e o volume foi transferido para um tubo de 1,5 mL. As células foram centrifugadas por 2

minutos a 4000 rpm a 4°C. Após formação do botão celular, descartou-se o sobrenadante, lavou-se com PBS e adicionou-se 200µL da solução de PBS contendo soro fetal bovino, e as células foram transferidas para a placa de citometria.

As células foram marcadas com os anticorpos monoclonais padronizados previamente no laboratório de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP.

Nas análises de superfície do macrófago, utilizou-se o anti F4/80 (PERCEP) e para TLR4 o anti-TLR4 (PE). Nas análises intracelulares para o anti-TNF- α (APC) utilizou-se da empresa Biolegend, (*San Diego, CA, USA*), diluídos a 1:100. Para marcação do NF- κ B utilizou-se o anti-phospho-NF- κ B p65 (APC) da empresa *Cell signaling Technology, Inc. (Boston, MA, USA)* diluído a 1:100.

Na sequência da marcação com os anticorpos de superfície as células foram incubadas por 30 minutos a 4°C. Em seguida, adicionou-se 200 µL de PBS contendo soro fetal bovino e centrifugou-se a 1500 RPM por 5 minutos. Descartou-se o sobrenadante e foi adicionado às células 200 µL de *Cyto Fix* (*BD Biosciences, San Jose, USA*) nos poços com marcação de superfície e *Cyto Fix/Cyto Perm* (*BD Biosciences, San Jose, USA*) nos poços a serem marcados com anticorpos intracelulares.

A placa foi colocada em geladeira por 20 minutos e em seguida centrifugada a 1500 RPM por 5 minutos. Nos poços contendo células com marcação de superfície, adicionou-se 200 µL de PBS contendo soro fetal bovino. As células foram transferidas para tubos de citometria.

Nas células que seguiriam para a marcação intracelular, adicionou-se 200 µL de tampão de permeabilização (*BD Biosciences, San Jose, USA*) e centrifugou-se a 1500 RPM por 5 minutos por 2 vezes.

As células foram incubadas com os anticorpos de marcação intracelular por 30 minutos a 4°C. Em seguida foram lavadas com tampão de permeabilização (*BD Biosciences, San Jose, USA*) e centrifugadas a 1500 RPM por 5 minutos.

Ao final, adicionou-se 200µL da solução de PBS contendo soro fetal bovino. As células foram transferidas para os tubos específicos para citômetro e lidas no citômetro FACSCanto II, com o software FACSDIVA (*BD Biosciences, San Jose, USA*). A fluorescência basal foi determinada usando células não marcadas, e a compensação foi feita com células marcadas em tubos com os respectivos fluorocromos individuais. Foram adquiridos 50.000 eventos e os resultados foram posteriormente analisados utilizando-se o software FlowJo (*Tree Star, San Carlo, CA*).

4.15 Análise estatística

Inicialmente, os dados contínuos de cada variável foram comparados com a curva normal por meio do teste de distância K-S e classificados em paramétricos e não paramétricos.

Os dados que apresentarem comportamento paramétrico foram representados pela média e desvio padrão da amostra e os grupos independentes foram comparados entre si utilizando-se o teste de Análise de Variância para medidas não repetidas (Anova) com pós-teste de *Student-Newman Keuls*.

Dados com comportamento não-paramétrico foram representados pela mediana e quartil inferior (percentil 25) e quartil superior (percentil 75). Os grupos independentes foram comparados entre si pelo teste de *Mann Whitney*. Em todo estudo foi considerado risco alfa menor ou igual a 5% de cometer erro tipo I ou de 1a espécie, e risco Beta menor ou igual a 20% de cometer erro tipo II ou de 2a espécie.

A curva de sobrevida foi expressa como porcentagem dos animais vivos após a CLP e a diferença entre elas obtida pelo teste de *Logrank*.

Para as análises supracitadas utilizou-se o programa *GraphPad Prisma* versão 4.0.

5. RESULTADOS

5.1. Resultados in vivo

Curva de sobrevida

Observou-se, ao longo dos 5 dias avaliados, que os animais CETP foram mais resistentes à sepse polimicrobiana por CLP comparados aos WT. A taxa de sobrevida foi 93,3% vs 60%, respectivamente. Não houve diferença entre os grupos *sham* operados (**Figura 5**).

Figura 5. Curva de sobrevida após CLP em camundongos CETP e WT. Após a CLP os animais foram observados por um período de 5 dias com intervalo de 8 horas. Teste estatístico: *Logrank* ($p=0,0267$).

Migração de neutrófilos e linfócitos para cavidade peritoneal

Considerando-se que os leucócitos desempenham um papel fundamental no processo de defesa e são extremamente importantes para o controle local do crescimento bacteriano. Avaliou-se a migração de leucócitos para cavidade peritoneal dos diferentes grupos de animais no lavado peritoneal, em 24 e 48 horas após a CLP.

Os neutrófilos dos animais WT, embora tenham migrado em maior quantidade no período de 24 horas comparado aos animais CETP, apresentaram redução na migração no período de 48 horas. Não houve diferença entre os períodos avaliados no grupo CETP quanto à migração dos neutrófilos (**Figura 6**).

Com relação aos linfócitos (**Figura 7**), observou-se nos animais WT maior migração destas células para o foco infeccioso, comparados aos animais CETP no período de 24 horas após a CLP. Entretanto, após 48 horas, houve aumento significativo de linfócitos nos animais CETP, o que não foi observado entre os animais WT.

Figura 6. Migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal em camundongos CETP e WT após 24 ou 48 horas da CLP. Migração de neutrófilos avaliada no lavado peritoneal dos animais. Contagem celular aferida no aparelho *Cell Dyn*. Gráfico representado por média ± DP. (n=3-6) Teste estatístico: *Mann Whitney*.

Figura 7. Migração de linfócitos para a cavidade peritoneal em camundongos CETP e WT após 24 ou 48 horas da CLP. Migração de linfócitos avaliada no lavado peritoneal dos animais. Contagem celular aferida no aparelho *Cell Dyn*. Gráfico representado por média ± DP. (n=3-6) Teste estatístico: *Mann Whitney*.

A migração de leucócitos para a cavidade peritoneal dos animais *sham* operados (CETP e WT) ficaram abaixo do limite detectável pelo equipamento *Cell Dyn*. Provavelmente, devido à baixa concentração de células.

Citocinas plasmáticas

Com intuito de determinar o perfil inflamatório dos animais após a CLP, as concentrações das citocinas IL-6 e IL-10 foram mensuradas no plasma dos camundongos 24 e 48 horas após a CLP. Pode-se observar na **Figura 8** uma redução significativa da concentração plasmática de IL-6 no grupo CETP no período de 48 horas comparado ao período de 24 horas, e também comparado ao grupo WT 48 horas. Não houve diferença entre os períodos no grupo WT.

Figura 8. Concentração plasmática de IL-6 de camundongos CETP e WT após 24 ou 48 horas da CLP. A concentração de IL-6 foi mensurada por kit de ELISA. Gráfico representado por média $\pm$ DP (n=6). Teste estatístico: *Mann Whitney*.

A concentração de IL-10 plasmática não diferiu entre os grupos CETP e WT (**Figura 9**).

Figura 9. Concentração plasmática de IL-10 de camundongos CETP e WT após 24 ou 48 horas da CLP. A concentração de IL-10 foi mensurada por kit de ELISA. Gráfico representado por média $\pm$ DP (n=6). Teste estatístico: *Mann Whitney*.

Com relação aos grupos *sham* operados (CETP e WT) não foi possível detectar as citocinas IL-6 e IL-10 no plasma, pois ficaram abaixo da sensibilidade do kit de ELISA utilizado. Observou-se o mesmo padrão para a concentração plasmática de TNF- α tanto nos grupos de animais *sham* operados quanto nos grupos WT e CETP após a CLP em 24 ou 48 horas.

Atividade da CETP

A atividade da CETP foi mensurada no período basal, 24 e 48 horas após a CLP (**Tabela 2**). Houve aumento da atividade da proteína após 48 horas comparando-se com a atividade basal e ao período de 24 horas.

Tabela 2. Atividade de CETP basal e após 24 ou 48 horas da CLP

	Atividade de CETP (% transferência¹⁴C-CE)
Basal	45,3 ± 7,8
24h	41,4 ± 4,7
48h	68,6 ± 5,9*

Dados representados por média ± DP. Teste estatístico: *Mann Whitney*.
 * $p < 0,01$ 48h vs basal e 24h.

Expressão hepática de RNAm de TLR4 e AOA^H após 48 horas da CLP.

Analisou-se a expressão gênica da AOA^H e do TLR4 apenas no período de 48 horas da CLP, tendo em vista a expressiva queda de neutrófilos observada nos animais WT (**Figura 6**), o aumento na migração de linfócitos nos animais CETP (**Figura 7**) e ainda, a diferença na concentração plasmática de IL-6 entre os grupos (**Figura 8**) no período de 48 horas.

Contudo, não houve diferença significativa com relação à expressão dos genes analisados (**Figuras 10 e 11**).

Figura 10. Análise da expressão hepática de RNAm do TLR4 em camundongos CETP e WT após 48 horas da CLP. O fígado dos animais CETP (n=6) ou WT (n=6) foi retirado após 48h da CLP. O RNA total foi extraído e a RT-PCR realizada utilizando-se cDNA. Gráfico representado por média $\pm$ EP. Teste estatístico: Teste T de *Student*.

Figura 11. Análise da expressão hepática de RNAm da AOA em camundongos CETP e WT após 48 horas da CLP. O fígado dos animais CETP (n=6) ou WT (n=6) foi retirado após 48h da CLP. O RNA total foi extraído e a RT-PCR realizada utilizando-se cDNA. Gráfico representado por média $\pm$ EP. Teste estatístico: Teste T de *Student*.

Expressão hepática da proteína AOA e TLR4

Uma vez que os resultados referentes à expressão de RNAm de TLR4 e AOA não apresentaram diferenças significativas, realizou-se a análise da expressão proteica no período de 48 horas após a CLP.

Observou-se nas **Figuras 12 e 13** que os animais CETP apresentaram menor expressão hepática da enzima AOA e também do receptor TLR4 comparados aos animais WT.

Figura 12. Expressão proteica de AOA no fígado de camundongos CETP e WT após 48 horas da CLP. O fígado dos animais CETP (n=5) ou WT (n=4) foi retirado após 48h da CLP. A proteína total foi extraída e 40 μ g foi aplicada no gel de poliácridamida a 10%, submetidas à eletroforese e transferidas para a membrana de nitrocelulose. Posteriormente as membranas foram incubadas com anticorpo anti-AOA (1:1000) e anticorpo secundário conjugado à peroxidase (1:2000). A visualização das bandas foi efetuada após reação com ECL e a revelação em câmara escura. Gráfico apresentado como média $\pm$ EP, representativo de 3 experimentos independentes. Teste estatístico: *Mann Whitney*.

Figura 13. Expressão proteica de TLR4 no fígado de camundongos CETP e WT após 48 horas da CLP. O fígado dos animais CETP (n=5) ou WT (n=4) foi retirado após 48h da CLP. A proteína total foi extraída e 40 µg foi aplicada no gel de poliácridamida a 10%, submetidas à eletroforese e transferidas para a membrana de nitrocelulose. Posteriormente as membranas foram incubadas com anticorpo anti-TLR4 (1:1000) e anticorpo secundário conjugado à peroxidase (1:2000). A visualização das bandas foi feita após reação com ECL e a revelação em câmara escura. Gráfico apresentado como média $\pm$ EP, representativo de 3 experimentos independentes. Teste estatístico: *Mann Whitney*.

5.2 Resultados in vitro

Considerando que os animais transgênicos para a CETP humana foram mais resistentes ao modelo experimental de sepse polimicrobiana, buscou-se avaliar, em macrófagos, a participação da CETP na resposta inflamatória

induzida pela captação do LPS e o processo de sinalização mediado pelo receptor TLR4.

5.2.1 Papel da CETP exógena

Macrófagos obtidos do peritônio de camundongos WT foram estimulados com LPS (1 $\mu\text{g/mL}$) na presença ou ausência de CETP humana recombinante.

Análises por microscopia confocal

Avaliou-se, inicialmente, a capacidade da CETP em se ligar ao LPS considerando sua homologia com a LBP.

Como esperado, pela análise da colocalização entre os marcadores, a microscopia confocal mostrou claramente uma ligação entre o LPS e a LBP nos macrófagos (**Figura 14**, painel A).

A CETP foi localizada no meio intracelular e também foi capaz de se ligar ao LPS (**Figura 14**, painel B).

Figura 14. Microscopia confocal: Colocalização entre o LPS e LBP ou CETP em macrófagos. (Ampliação de 600 X). Macrófagos de peritônio de camundongos WT foram estimulados com LPS (1 $\mu\text{g/mL}$) na presença das proteínas recombinantes, LBP ou CETP: (1 $\mu\text{g/mL}$) a 37°C por 4 horas. LPS, verde (FITC); núcleo, azul (DAPI); LBP, (amarelo); Macrófagos, vermelho (CD68); CETP, azul (somente na ausência de DAPI, pois seu anticorpo possui a mesma coloração); Merge: colocalização entre os marcadores.

Análises por citometria de fluxo

A partir das análises realizadas por citometria de fluxo, observou-se que a captação de LPS-Alexa488 foi menor nos macrófagos de animais WT tratados com 0,5 $\mu\text{g/mL}$ e 1,0 $\mu\text{g/mL}$ de CETP humana recombinante quando comparados aos macrófagos sem a adição da proteína (**Figura 15**).

A

B

Figura 15. Captação de LPS por macrófagos de peritônio de camundongos WT na ausência e presença de CETP humana recombinante. As células foram estimuladas com LPS-Alexa 488 (1µg/mL) e concentrações crescentes de CETP recombinante (0,1, 0,5 e 1,0 µg/mL) por 24 horas. A fluorescência basal foi determinada em células não marcadas, e a compensação feita com células marcadas com os respectivos fluorocromos no citômetro FACSCanto II. Foram analisados 50.000 eventos. **(A)** Gráficos em dot plot exemplificando a detecção da captação de LPS em macrófago (F4/80). Os números presentes nos quadrantes representam a porcentagem de células marcadas. **(B)** Gráfico apresentado como média $\pm$ EP, $n=4$, representativo de 3 experimentos. O grupo WT controle sem LPS (barra cinza) apresentou diferença significativa comparado aos demais grupos. Teste estatístico: *One Way ANOVA*, seguido de pós-teste *Newman-Keuls*.

Além disso, a expressão de TLR4 apresentou-se reduzida nos macrófagos estimulados com LPS (1µg/mL) e tratados com 0,5 µg/mL e 1,0 µg/mL de CETP humana recombinante (**Figura 16**).

A

Macrófagos WT

Macrófagos WT + 0,1 μ g de CETP Macrófagos WT + 0,5 μ g de CETP Macrófagos WT + 1,0 μ g de CETP

B

Figura 16. Expressão de TLR4 em macrófagos de peritônio de camundongos WT estimulados com LPS (1µg) na ausência e presença de CETP humana recombinante. As células foram estimuladas com LPS-Alexa 488 (1µg/mL) e concentrações crescentes de CETP recombinante (0,1, 0,5 e 1,0 µg/mL) por 24 horas. A fluorescência basal foi determinada em células não marcadas, e a compensação feita com células marcadas com os respectivos fluorocromos no citômetro FACSCanto II. Foram analisados 50.000 eventos. **(A)** Gráficos em dot plot exemplificando a detecção da expressão de TLR4 em macrófago (F4/80). Os números presentes nos quadrantes representam a porcentagem de células marcadas. **(B)** Gráfico apresentado como média $\pm$ EP, $n=4$, representativo de 3 experimentos. O grupo WT controle sem LPS (barra cinza) apresentou diferença significativa comparado aos demais grupos. Teste estatístico: *One Way ANOVA*, seguido de pós-teste *Newman-Keuls*.

O mesmo padrão foi observado na concentração de p-NF-kB p65 que se mostrou reduzida na presença de CETP (**Figura 17**).

A

B

Figura 17. Produção de p-NF-kB p65 em macrófagos de peritônio de camundongos WT estimulados com LPS (1µg) na ausência e presença de CETP humana recombinante. As células foram estimuladas com LPS-Alexa 488 (1µg/mL) e concentrações crescentes de CETP recombinante (0,1, 0,5 e 1,0 µg/mL) por 24 horas. A fluorescência basal foi determinada em células não marcadas, e a compensação feita com células marcadas com os respectivos fluorocromos no citômetro FACSCanto II. Foram analisados 50.000 eventos. **(A)** Gráficos em dot plot exemplificando a detecção de p-NF-kB p65 em macrófago (F4/80). Os números presentes nos quadrantes representam a porcentagem de células marcadas. **(B)** Gráfico apresentado como média $\pm$ EP, $n=4$, representativo de 3 experimentos. O grupo WT controle sem LPS (barra cinza) apresentou diferença significativa comparado aos demais grupos. Teste estatístico: *One Way ANOVA*, seguido de pós-teste *Newman-Keuls*.

Corroborando os resultados encontrados nas análises supracitadas, a concentração de IL-6 (**Figura 18**) apresentou-se inversamente proporcional à concentração de CETP no meio de cultura celular.

Figura 18. Concentração de IL-6 no meio de cultura celular após estímulo com LPS (1µg) na ausência e presença de CETP humana recombinante. As células foram estimuladas com LPS-Alexa 488 (1µg/mL) e tratadas com concentrações crescentes de CETP recombinante (0,1, 0,5 e 1,0 µg/mL) por 24 horas. A concentração de IL-6 no meio de cultura foi mensurada por kit de ELISA. Resultados apresentados como média $\pm$ DP, $n=4$, representativo de 3 experimentos independentes. O grupo WT controle sem LPS (barra cinza) apresentou diferença significativa comparado aos demais grupos. Teste estatístico: *One Way ANOVA*, seguido de pós-teste *Newman-Keuls*.

No entanto, as concentrações de TNF- α e IL-10 não apresentaram diferenças significativas entre os grupos analisados (**Figuras 19 e 20**).

Figura 19. Concentração de TNF- α no meio de cultura celular após estímulo com LPS (1 μ g) na ausência e presença de CETP humana recombinante. As células foram estimuladas com LPS-Alexa 488 (1 μ g/mL) e tratadas com concentrações crescentes de CETP recombinante (0,1, 0,5 e 1,0 μ g/mL) por 24 horas. A concentração de TNF- α no meio de cultura foi mensurada por kit de ELISA. Resultados apresentados como média $\pm$ DP, n=4, representativo de 3 experimentos independentes. O grupo WT controle sem LPS (barra cinza) apresentou diferença significativa comparado aos demais grupos. Teste estatístico: *One Way ANOVA*, seguido de pós-teste *Newman-Keuls*.

Figura 20. Concentração de IL-10 no meio de cultura celular após estímulo com LPS (1µg) na ausência e presença de CETP humana recombinante. As células foram estimuladas com LPS (1µg/mL) e tratadas com concentrações crescentes de CETP recombinante (0,1, 0,5 e 1,0 µg/mL) por 24 horas. A concentração de IL-10 no meio de cultura foi mensurada por kit de ELISA. Resultados apresentados como média $\pm$ DP, n=4, representativo de 3 experimentos independentes. O grupo WT controle sem LPS (barra cinza) apresentou diferença significativa comparado aos demais grupos. Teste estatístico: *One Way ANOVA*, seguido de pós-teste *Newman-Keuls*.

5.2.2 Papel da CETP endógena

Para avaliar o papel da CETP endógena, ou seja, como macrófagos que expressam ou não o gene da CETP humana respondem ao estímulo inflamatório. Macrófagos foram obtidos do peritônio de camundongos CETP e WT, tratados com LPS (1µg) por 24 horas, sem a adição de qualquer fonte exógena de CETP. Em seguida, realizou-se a análise por citometria de fluxo dos mesmos parâmetros acima citados.

Foi possível observar que após 24 horas de tratamento, os macrófagos de camundongos CETP apresentaram menor captação de LPS comparados aos macrófagos de camundongos WT, **Figura 21**.

A **B**

Figura 21. Captação de LPS por macrófagos de peritônio de camundongos CETP e WT. As células foram estimuladas com LPS-Alexa-488 (1µg/mL) por 24 horas. A fluorescência basal foi determinada em células não marcadas, e a compensação feita com células marcadas com os respectivos fluorocromos no citômetro FACSCanto II. Foram analisados 50.000 eventos. **(A)** Gráficos em dot plot exemplificando a detecção da captação de LPS-Alexa em macrófago (F4/80). Os números presentes nos quadrantes representam a porcentagem de células marcadas. **(B)** Gráfico apresentado como média $\pm$ EP, $n=4$, representativo de 3 experimentos. Teste estatístico: *One Way ANOVA*, seguido de pós-teste *Newman-Keuls*.

Entretanto, a expressão do receptor TLR4, ao contrário dos resultados in vivo e com a CETP exógena, não diferiu entre os macrófagos de animais CETP comparados aos WT após estímulo com LPS (**Figura 22**).

A

B

Figura 22. Expressão de TLR4 em macrófagos de peritônio de camundongos CETP e WT estimulados com 1 μ g de LPS por 24 horas. As células foram estimuladas com LPS-Alexa-488 (1 μ g/mL) por 24 horas. A fluorescência basal foi determinada usando células não marcadas, e a compensação foi feita com células marcadas com o respectivos fluorocromos no citômetro FACSCanto II. Foram analisados 50.000 eventos. **(A)** Gráficos em dot plot exemplificando a detecção da expressão de TLR4 e macrófago (F4/80). Os números presentes nos quadrantes representam a porcentagem de células marcadas. **(B)** Gráfico apresentado pela média $\pm$ EP, n=4, representativo de 3 experimentos independentes. O grupo WT controle sem LPS (barra cinza) apresentou diferença significativa comparado aos demais grupos. Teste estatístico: *One Way ANOVA*, seguido de pós-teste *Newman-Keuls*.

Com relação à ativação do NF- κ B, observou-se uma diminuição significativa no grupo CETP comparado ao WT (**Figura 23**).

A

B

Figura 23. Produção de p-NF- κ B p65 em macrófagos de peritônio de camundongos CETP e WT estimulados com LPS (1 μ g). As células foram estimuladas com LPS-Alexa-488 (1 μ g/mL) por 24 horas. A fluorescência basal foi determinada usando células não marcadas, e a compensação foi feita com células marcadas com o respectivos fluorocromos no citômetro FACSCanto II. Foram analisados 50.000 eventos. **(A)** Gráficos em dot plot representam a detecção da produção de p-NF- κ B p65 e macrófagos (F4/80). Os números presentes nos quadrantes representam a porcentagem de células marcadas. **(B)** Gráfico apresentado como média $\pm$ EP, n=4, representativo de 3

experimentos independentes. O grupo WT controle sem LPS (barra cinza) apresentou diferença significativa de ambos os grupos tratados com LPS. Teste estatístico: *One Way ANOVA*, seguido de pós-teste *Newman-Keuls*.

Apesar da elevação da IL-6 no meio de cultura celular após o tratamento com LPS, não foi observada diferença entre os grupos WT e CETP (**Figura 24**).

Figura 24. Concentração de IL-6 no meio de cultura celular de macrófagos de peritônio de camundongos CETP e WT estimulados com LPS (1µg). As células foram estimuladas com LPS-Alexa-488 (1µg/mL) por 24 horas. A concentração de IL-6 no meio de cultura foi mensurada por kit de ELISA. Resultados apresentados como média ± EP, n=4, representativo de 3 experimentos independentes. O grupo WT controle sem LPS (barra cinza) apresentou diferença significativa de ambos os grupos tratados com LPS. Teste estatístico: *One Way ANOVA*, seguido de pós-teste *Newman-Keuls*.

Como esperado, corroborando os resultados da avaliação do NF-κB, observou-se menor concentração de TNF-α nos macrófagos de animais CETP quando comparados aos WT, como mostra a **Figura 25**. O mesmo foi observado no meio de cultura celular, no qual a concentração de TNF-α

também foi menor no grupo CETP (**Figura 26**). No entanto, nas avaliações por citometria de fluxo, não foi possível detectar as concentrações de IL-6 e IL-10.

A

B

Figura 25. Concentração de TNF- α em macrófagos de peritônio de camundongos CETP e WT estimulados com LPS (1 μ g). As células foram estimuladas com LPS-Alexa-488 (1 μ g/mL) por 24 horas. A fluorescência basal foi determinada usando células não marcadas, e a compensação foi feita com células marcadas com os respectivos fluorocromos no citômetro FACSCanto II. Foram analisados 50.000 eventos. **(A)** Gráficos em dot plot representam a detecção da produção de TNF- α e macrófagos (F4/80). Os números presentes nos quadrantes representam a porcentagem de células marcadas. **(B)** Gráfico apresentado como média $\pm$ EP, $n=4$, representativo de 3 experimentos independentes. O grupo WT controle sem LPS (barra cinza) apresentou diferença significativa de ambos os grupos tratados com LPS. Teste estatístico: *One Way ANOVA*, seguido de pós-teste *Newman-Keuls*.

Figura 26. Concentração de TNF- α no meio de cultura celular de macrófagos de peritônio de camundongos CETP e WT estimulados com LPS (1 μ g). As células foram estimuladas com LPS-Alexa-488 (1 μ g/mL) por 24 horas. A concentração de TNF- α no meio de cultura foi mensurada por kit de ELISA. Resultados apresentados como média $\pm$ EP, $n=4$, representativo de 3 experimentos independentes. O grupo WT controle sem LPS (barra cinza) apresentou diferença significativa de ambos os grupos tratados com LPS. Teste estatístico: *One Way ANOVA*, seguido de pós-teste *Newman-Keuls*.

6. DISCUSSÃO

O cenário da sepse no mundo é crítico: cerca de 18 milhões de pessoas morrem de sepse por ano. No Brasil, este número é de aproximadamente 240 mil mortes - tornando-se um grave problema de saúde pública (Angus *et al.*, 2001; Perman *et al.*, 2012).

Diversos estudos vêm sendo realizados em busca de um melhor entendimento acerca da doença, bem como de futuras estratégias terapêuticas.

Na presente dissertação, buscou-se contribuir com o entendimento da resposta inflamatória induzida pela sepse, relacionando o metabolismo lipídico à resposta imunológica, uma vez que estudos mostraram que, na vigência da doença, ocorre redução na concentração plasmática das lipoproteínas, principalmente HDL, em parte, devido às alterações na atividade das proteínas plasmáticas que modulam o metabolismo destas lipoproteínas, como a CETP - proteína conhecida por promover a transferência de lípidos entre as lipoproteínas (Levels *et al.*, 2007, Quintão & Cazita, 2010).

Foi descrito que a CETP possui homologia estrutural com a LBP - proteína que atua na resposta imune inata ligando-se ao LPS, desencadeando a resposta inflamatória mediada pelo receptor TLR4 e culminando na ativação do fator de transcrição NF- κ B (Aderem *et al.*, 2000).

Dessa forma, estudo prévio do nosso grupo apontou pela primeira vez que a CETP pode influenciar a resposta inflamatória em modelo experimental de endotoxemia. Nesse estudo, camundongos transgênicos para CETP humana foram mais resistentes à inflamação comparados aos camundongos controles, após injeção intraperitoneal de LPS (Cazita *et al.*, 2008)- indicando

que a CETP provavelmente possui outras funções, além daquelas relacionadas ao metabolismo plasmático de lipoproteínas (Oliveira & de Faria, 2011).

Grion e colaboradores (2010) evidenciaram que em pacientes com sepse, a CETP está diminuída nos indivíduos que vão a óbito comparados aos sobreviventes.

Diante desses dados, o objetivo da presente pesquisa foi dar continuidade ao estudo anterior, buscando a melhor compreensão do papel da CETP durante a sepse.

Inicialmente, foram comparados camundongos transgênicos para CETP humana (CETP) e controles irmãos não transgênicos (WT) submetidos ao modelo de sepse polimicrobiana de ligadura e perfuração do ceco (CLP), avaliando a taxa de sobrevida e o perfil inflamatório entre os grupos.

O modelo CLP, utilizado neste estudo, causa peritonite polimicrobiana, realidade bem similar à conhecida em humanos (Dejager *et al.*, 2011).

Em seguida, analisou-se a resposta inflamatória em macrófagos de peritônio de camundongos estimulados com LPS na ausência ou presença da CETP exógena (CETP humana recombinante) ou endógena (macrófagos obtidos de animais CETP).

Os camundongos CETP apresentaram maior resistência à sepse induzida por CLP, com taxa de sobrevida de 93,3% vs 60% do grupo WT, confirmando os achados anteriores em modelo experimental de endotoxemia (Cazita *et al.*, 2008).

Além da maior sobrevida, observou-se que o grupo CETP apresentou aumento na migração de linfócitos para cavidade peritoneal em 48 horas ($p=0,023$) comparando-se ao período de 24 horas após a CLP. Em

contrapartida, os animais WT apresentaram redução da migração de neutrófilos ($p=0,009$) neste período, sem diferenças significativas na migração dos linfócitos.

Esses dados estão de acordo com estudos que mostram que os linfócitos na circulação periférica de pacientes com sepse podem sofrer aumento da apoptose, levando a uma profunda perda destas células associada a uma piora do quadro do paciente (Hotchkiss & Nicholson, 2006; Soriano *et al.*, 2013; Deng *et al.*, 2013).

Diante desses resultados, podemos inferir que a alta taxa de mortalidade, observada no grupo WT após a CLP, pode estar relacionada com a diminuição na migração dos neutrófilos para a cavidade peritoneal. Alves-Filho e colaboradores (2010) demonstraram que no processo séptico, é comum a diminuição da migração dos neutrófilos, o que está associado com a ineficiente depuração de bactérias, levando à sua disseminação e maior taxa de mortalidade.

A migração reduzida de neutrófilos para o foco infeccioso pode ainda, iniciar uma resposta inflamatória acentuada caracterizada pelo “sequestro” inadequado de neutrófilos para os órgãos, contribuindo para a falência do sistema imune e a exacerbação dos sintomas da doença (Mercer-Jones *et al.*, 1997).

Todavia, o mecanismo envolvido na diminuição da migração de neutrófilos observada na sepse ainda não está bem descrito, mas pode estar relacionado com a liberação excessiva de citocinas pró-inflamatórias (Wichtermann *et al.*, 1980; Baker *et al.*, 1983; Alves-Filho *et al.*, 2010).

Nesse sentido, observou-se uma queda acentuada na concentração de IL-6 no plasma dos animais CETP ($p=0,004$) no período de 48 horas após a cirurgia, o que não ocorreu no grupo WT - mais uma vez confirmando os achados no estudo da endotoxemia (Cazita *et al.*, 2008), observou-se ainda menor concentração de IL-6 no grupo CETP comparado ao WT no mesmo período.

Estudo mostra que a IL-6 está relacionada diretamente com o risco de morte de pacientes com sepse e que seu bloqueio protege contra a doença (Riedemann *et al.*, 2003), sugerindo que os animais CETP, por apresentarem menores concentrações plasmáticas de IL-6 em 48 horas e maior migração de linfócitos, resistem melhor à sepse induzida por CLP.

A concentração de IL-10, citocina anti-inflamatória, não diferiu entre os grupos após a CLP. Ainda assim, uma tendência de redução dessa citocina, no período de 48 horas ($p=0,057$), foi observada no grupo WT.

Dessa forma, tem-se mais um indício de que a maior migração de linfócitos, a redução de IL-6 plasmática e a não redução de IL-10 e maior sobrevida dos animais CETP podem estar interligadas, tendo como consequência a maior sobrevida dos animais CETP.

Além disso, a atividade da CETP foi maior no período de 48 horas após a cirurgia ($p<0,01$).

Diversas evidências indicam que o LPS bacteriano é removido da corrente sanguínea principalmente pelo fígado, porém os mecanismos de absorção hepática permanecem incertos.

Sabe-se que a maior parte do LPS livre é captado pelas células de Kupffer (KC), enquanto o LPS ligado as lipoproteínas parece ser depurado pelos hepatócitos (Shao *et al.*, 2012).

A capacidade do fígado para desacilar agregados de LPS livre ou complexados às lipoproteínas, principalmente a HDL, está intimamente ligada à ação enzimática da proteína aciloxiacilo hidrolase (AOAH). Esta enzima é produzida no fígado pelas KC e desempenha um papel importante na depuração de ambos os tipos de LPS.

Considerando que as diferenças significativas entre os grupos CETP e WT foram encontradas no período de 48 horas após a CLP, a expressão hepática da enzima AOAH e do receptor TLR4 foi avaliada neste período.

A partir dessa avaliação, observou-se que a expressão de RNAm dos genes estudados foi semelhante entre os grupos CETP e WT. Contudo, o conteúdo proteico da AOAH ($p=0,002$) e do receptor TLR4 ($p=0,032$) foi acentuadamente elevado no fígado dos animais WT.

Estudo prévio do nosso grupo (Cazita *et al.*, 2008b) demonstrou que a depuração plasmática do LPS (^3H) foi mais rápida nos animais CETP - sendo captado predominantemente pelo fígado - comparando-se aos animais WT em 24 horas. Ainda neste estudo, observou-se que o LPS foi transportado em maior quantidade para as partículas de LDL e HDL e em menores para as partículas de VLDL, o que pode ter contribuído para minimizar os efeitos adversos do LPS.

Nesse contexto, Shao e colaboradores (2007) afirmaram que a AOAH também atua sobre o LPS complexado à HDL. Sendo assim, podemos especular que o conteúdo proteico da AOAH foi menor no fígado do grupo

CETP, devido à atuação prévia da enzima sobre o LPS hepático. Entretanto, no grupo WT ela encontra-se ainda elevada neste período, devido à alta concentração de LPS que permanece no fígado destes animais.

Ainda segundo Shao (2007), a ação da AOA sobre o LPS *in vivo* ocorre lentamente, completando-se apenas entre dois a três dias após o estímulo, e o LPS que não sofre ação da AOA permanece estimulando a resposta inflamatória no baço e no fígado ativando a via de TLR4.

Alves-Filho e colaboradores (2006) evidenciaram o papel prejudicial do TLR4 no desenvolvimento da sepse induzida por infecção polimicrobiana, de modo que a sinalização mediada pelo TLR4 prejudica a migração de neutrófilos para o sítio de infecção.

Além disso, a redução da expressão de TLR4 no fígado melhora a regeneração desse órgão em ratos submetidos à sepse por CLP (Chen *et al.*, 2011).

Os resultados apresentados sugerem que a manutenção da migração de leucócitos para o foco infeccioso, após 48 h da sepse experimental, associada à redução de IL-6 plasmática e menor expressão hepática de TLR4, pode conferir proteção aos animais que expressam a CETP humana.

Pode-se especular que a presença de CETP reduz a interação do LPS com o TLR4 no fígado, podendo estimular a entrada de LPS por outros receptores do tipo *scavenger* via HDL e pelos receptores B-E e LRP, via VLDL e LDL no hepatócito - impedindo a ligação do LPS ao TLR4 e atenuando a resposta inflamatória.

Ao contrário do observado nos camundongos CETP, os WT apresentaram o quadro típico dos pacientes com sepse, com redução da

migração de leucócitos e aumento da expressão TLR4, apesar do aumento da expressão hepática de AOA. H.

Diante desses achados *in vivo*, buscou-se esclarecer melhor a participação da CETP na resposta inflamatória desencadeada pelo LPS e mediada pelo TLR4. Inicialmente investigamos a capacidade da CETP de se ligar diretamente ao LPS.

A análise por microscopia confocal, apesar de não se tratar de uma medida quantitativa e sim qualitativa, mostrou claramente que a CETP é capaz de ligar-se ao LPS, mesmo apresentando um padrão de ligação menor, quando comparado à ligação com a LBP. Tal fato vai ao encontro dos resultados de Clark e colaboradores (2010), os quais mostraram que a CETP se liga ao LPS, porém com uma afinidade menor comparada à LBP.

A LBP foi utilizada como controle positivo do experimento, uma vez que há vasta descrição na literatura sobre a sua capacidade de se ligar ao LPS e transferi-lo entre as lipoproteínas e/ou CD14 ativando a via do TLR4.

Nos resultados obtidos a partir da citometria de fluxo, observou-se que os macrófagos estimulados com LPS e tratados com CETP recombinante (0,5 e 1 µg/mL) apresentaram menor captação de LPS celular, menor expressão de TLR4, diminuição da ativação de NF-κB, e consequentemente, diminuição da secreção de IL-6 para o meio de cultivo celular.

As análises com a CETP endógena reforçaram os achados com as análises com a CETP exógena. Houve menor captação de LPS nos macrófagos obtidos dos animais CETP, menor ativação de NF-κB, além de menores concentrações de TNF-α, tanto nos macrófagos quanto no meio de cultura celular, comparados aos macrófagos dos animais WT.

Contudo, não observamos diferenças entre os macrófagos do grupo CETP e WT nas análises da expressão de TLR4 e da secreção de IL-6 no meio de cultura celular.

Os dados sugerem fortemente que a CETP em macrófagos, assim como no fígado (observado *in vivo*), impede a interação do LPS com o TLR4, reduzindo a resposta inflamatória nestas células, levando à diminuição da ativação de NF- κ B e, conseqüentemente, à diminuição da transcrição dos genes envolvidos na expressão de citocinas inflamatórias.

Diante dos resultados obtidos, concluímos que a CETP atua como agente modulador da resposta inflamatória, aumentando a taxa de sobrevivência dos animais submetidos a CLP (**Figura 27**) e atenuando a resposta inflamatória em macrófagos estimulados pelo LPS (**Figura 28**).

É importante ressaltar que inibidores de CETP têm sido desenvolvidos e testados por indústrias farmacêuticas, com o intuito de se elevar a HDL-C e, desse modo, diminuir os riscos cardiovasculares. No entanto, Sirtori (2011) relatou que o uso do Torcetrapib, além de aumentar a pressão arterial, também aumentou os índices de infecção dos pacientes e mortalidade por sepse.

Esses dados devem ser considerados nas doenças inflamatórias e nos futuros estudos relacionados à inibição da CETP, além de estabelecer novas perspectivas de tratamento da sepse.

Figura 27. Resultados encontrados nos experimentos *in vivo*. Camundongos transgênicos para CETP humana apresentaram maior taxa de sobrevivência devido à maior migração de leucócitos para a cavidade peritoneal (foco infeccioso), menor concentração de IL-6 plasmática e menor expressão hepática de TLR4 e da enzima AOA, comparados aos camundongos WT.

Figura 28. Resultados encontrados nos experimentos *in vitro*. Macrófagos WT na presença de CETP humana captam menos LPS, expressam menos TLR4, ativam menos NF-κB e, consequentemente, secretam menos citocinas, comparados aos macrófagos na ausência de CETP.

7. CONCLUSÃO

Os dados deste estudo reforçam o papel anti-inflamatório da CETP em resposta à sepse experimental induzida pela CLP e em macrófagos tratados com LPS.

8. REFERÊNCIAS BIBLOGRÁFICAS

Abbas, AK.; Lichtman, AH.; Pillai S. Cellular and molecular immunology. 7ª ed: Philadelphia: W. B: Elsevier; 2011.

Aderem A; Ulevitch RJ. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature*. 2000; 406: 782-787.

Albers JJ, Vuletic S, Cheung MC. Role of plasma phospholipid transfer protein in lipid and lipoprotein metabolism. *Biochim Biophys Acta*. 2012; 1821(3): 345-57.

Alves-Filho JC, de Freitas A, Russo M, Cunha FQ. Toll-like receptor 4 signaling leads to neutrophil migration impairment in polymicrobial sepsis. *Crit Care Med*. 2006; 34(2): 461-70.

Alves-Filho JC Spiller F, Cunha FQ. Neutrophil paralysis in sepsis. *Shock*. 2010; 34 Suppl 1: 15-21.

Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med*. 2001; 29(7): 1303-10.

Arai Y, Hirose N, Yamamura K, Nakazawa S, Shimizu K, Takayama M, Ebihara Y, Homma S, Gondo Y, Masui Y, Inagaki H. Deficiency of cholesteryl ester transfer protein and gene polymorphisms of lipoprotein lipase and hepatic lipase are not associated with longevity. *J Mol Med (Berl)*. 2003; 81(2): 102-9.

Arias-Vásquez A, Isaacs A, Aulchenko YS, Hofman A, Oostra BA, Breteler M, van Duijn CM. The cholesteryl ester transfer protein (CETP) gene and the risk of Alzheimer's disease. *Neurogenetics*. 2007; 8(3): 189-93.

Baker CC, Chaudry IH, Gaines HO, Baue AE. Evaluation of factors affecting mortality rate after sepsis in a murine cecal ligation and puncture model. *Surgery*. 1983; 94: 331-335.

Balakrishnan A, Marathe SA, Joglekar M, Chakravortty D. Bactericidal/permeability increasing protein: multifaceted protein with functions beyond LPS neutralization. *Innate Immun*. 2013; 19(4): 339-47.

Barlage S, Fröhlich D, Böttcher A, Jauhiainen M, Müller HP; Noetzel F, Rothe G, Schütt C; Linke RP, Lackner KJ, Ehnholm C, Schmitz G. ApoE-containing high density lipoproteins and phospholipids transfer protein activity increase in patients with a systemic inflammatory response. *J Lipid Res*. 2001; 42: 281-290.

Barter PJ, Caulfield M, Eriksson M, Grundy SM, Kastelein JJ, Komajda M, Lopez-Sendon J, Mosca L, Tardif JC, Waters DD, Shear CL, Revkin JH, Buhr KA, Fisher MR, Tall AR, Brewer B; ILLUMINATE Investigators. Effects of torcetrapib in patients at high risk for coronary events. *N Engl J Med*. 2007; 357(21): 2109-22.

Barter P, Rye K. Cholesteryl ester transfer protein inhibition to reduce cardiovascular risk: where are we now? *Trends in Pharmacological Sciences*. 2011; 32(12): 694-9.

Barter P, Rye K. Cholesteryl Ester Transfer Protein (CETP) Inhibition as a Strategy to Reduce Cardiovascular Risk. *J Lipid Res*. 2012; 53(9): 1755-66.

Barton, GM, Medzhitov R. Toll-like receptor signaling pathways. *Science*. 2003; 300(5625): 1524-5.

Barzilai N, Atzmon G, Schechter C, Schaefer EJ, Cupples AL, Lipton R, Cheng S, Shuldiner AR. Unique lipoprotein phenotype and genotype associated with exceptional longevity. *JAMA*. 2003; 290(15): 2030-40.

Beishuizen A, Vermes I, Haanen C. Endogenous mediators in sepsis and septic shock. *Adv Clin Chem*. 1998; 33:55-131.

Bernard AM, Bernard GR, The Immune Response: Targets for the Treatment of Severe Sepsis. *International Journal of Inflammation*. 2012; 2012: 697592.

Beutler B. Toll-like receptors: how they work and what they do. *Curr Opin Hematol*. 2002; 9(1): 2-10.

Bingle CD, Craven CJ. Meet the relatives: a Family of BPI- and LBP-related proteins. *Trends Immunol*. 2004; 25(2): 53-5.

Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger, RP, Fein AM, Knauss WA, Schein RM, Sibbald WJ. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians /Society of *Critical Care Medicine*. 1992; 101(6): 1644-1655.

Brown ML, Inazu A, Hesler CB, Agellon LB, Mann C, Whitlock ME, Marcel YL, Milne RW, Koizumi J, Mabuchi H. Molecular basis of lipid transfer protein deficiency in a family with increased high-density lipoproteins. *Nature*. 1989; 342(6248):448-51.

Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clin Chem*. 55(4): 611-622, 2009.

Buttenschoen K; Radermacher P, Bracht H. Endotoxin elimination in sepsis: physiology and therapeutic application. *Langenbecks Arch Surg.* 2010; 395(6): 597–605.

Buras JA, Holzmann B, Sitkovsky M. Animal models of sepsis: setting the stage. *Nat Rev Drug Discov.* 2005; 4(10): 854-65.

Calabrese V, Cighetti R, Peri F. Molecular simplification of lipid A structure: TLR4-modulating cationic and anionic amphiphiles. *Mol Immunol.* 2014. S0161-5890(14)00123-0.

Capri M, Salvioli S, Sevini F, Valensin S, Celani L, Monti D, Pawelec G, De Benedictis G, Gonos ES, Franceschi C. The genetics of human longevity. *Ann N Y Acad Sci.* 2006; 1067: 252-63.

Casquero AC, Berti JA, Salerno AG, Bighetti EJ, Cazita PM, Ketelhuth DF, Gidlund M, Oliveira HCF. Atherosclerosis is enhanced by testosterone deficiency and attenuated by CETP expression in transgenic mice. *J. Lipid Res.* 2006; 47: 1526–1534.

Castilho G. Inibição do estresse do retículo endoplasmático restaura o conteúdo de ABCA-1 e o efluxo de colesterol em macrófagos tratados com albumina modificada por glicação avançada [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2012.

Catapano AL, Pirillo A, Bonacina F, Norata GD. HDL in innate and adaptive immunity. *Cardiovasc Res.* 2014; 103(3): 372-83.

Cazita PM, Berti JA, Aoki C, Gidlund M, Harada LM, Nunes VS, Quintão EC, Oliveira HC. Cholesteryl ester transfer protein expression attenuates atherosclerosis in ovariectomized mice. *J Lipid Res.* 2003; 44(1): 33-40.

Cazita PM, Barbeiro DF, Moretti AI, Quintão EC, Soriano FG. Human CETP expression enhances the mouse survival rate in an experimental systemic inflammation model: a novel role for CETP. *Shock*. 2008 a; 30(5):590-5.

Cazita PM, Salerno AG, Ferreira FD, Nunes VS, Oliveira KS, Soriano FG, Quintão ECR. *Circulation*. 2008 b; 118:S_570

Cazita PM, Quintão ECR. Lipid transfer proteins: Past, present and perspectives. *Atherosclerosis*. 2010; 209(1): 1-9.

Cellini E, Nacmias B, Olivieri F, Ortenzi L, Tedde A, Bagnoli S, Petruzzi C, Franceschi C, Sorbi S. Cholesteryl ester transfer protein (CETP) I405V polymorphism and longevity in Italian centenarians. *Mech Ageing Dev*. 2005; 126(6-7): 826-8.

Chen J, Ren J, Zhang W, Li J. Open versus closed abdomen treatment on liver function in rats with sepsis and abdominal compartment syndrome. *J Trauma*. 2011; 71(5): 1319-25.

Chien JY, Jerng JS, Yu CJ, Yang PC. Low serum level of high-density lipoprotein cholesterol is a poor prognostic factor for severe sepsis. *Crit Care Med*. 2005; 33(8): 1688-93.

Clark RW, Cunningham D, Cong Y, Subashi TA, Tkalcevic GT, Lloyd D B, Boyd JG, Chrnyk BA, Karam GA, Qiu X, Wang IK, Francone OL. Assessment of cholesteryl ester transfer protein inhibitors for interaction with proteins involved in the immune response to infection. *J. Lipid Res*. 2010; 51: 967–974.

Dejager L, Pinheiro I, Dejonckheere E, Libert C. Cecal ligation and puncture: the gold standard model for polymicrobial sepsis? *Trends Microbiol*. 2011; 19(4): 198-208.

Deng M, Scott MJ, Loughran P, Gibson G, Sodhi C, Watkins S, Hackam D, Billiar TR. Lipopolysaccharide Clearance, Bacterial Clearance, and Systemic Inflammatory responses Are Regulated by Cell Type–Specific Functions of TLR4 during Sepsis. *J. Immunol.* 2013. 190(10): 5152-60.

Eckert M, Wittmann I, Röllinghoff M, Gessner A, Schnare M. Endotoxin-induced expression of murine bactericidal permeability/increasing protein is mediated exclusively by toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor inducing IFN-beta-dependent pathways. *J Immunol.* 2006; 176(1): 522-8.

Feulner JA; Lu M, Shelton JM, Zhang M, Richardson JA, Munford RS. Identification of Acyloxyacyl Hydrolase, a Lipopolysaccharide- Detoxifying Enzyme, in the Murine Urinary Tract. *Infect Immunology.* 2004; 72(6): 3171-3178.

Fidani L, Goulas A, Crook R, Petersen RC, Tangelos E, Kotsis A, Hardy J. Na association study of the cholesteryl ester transfer protein TaqI B polymorphism with late onset Alzheimer's disease. *Neurosci Lett.* 2004; 357(2): 152-4.

Friedman G, Jankowski S, Shahla M, Goldman M, Rose RM, Kahn RJ, Vincent JL. Administration of an antibody to E-selectin in patients with septic shock. *Crit Care Med.* 1996; 24(2): 229-33.

Friedman G, Silva E, Vincent JL. Has the mortality of septic shock changed with time. *Crit Care Med* 1998; 26(12): 2078-86.

Fortin CF, McDonald PP, Fülöp T, Lesur O. Sepsis, leukocytes, and nitric oxide (NO): an intricate affair. *Shock.* 2010; 33(4):344-52.

Francone OL, Royer L, Haghpasand M. Increased prebeta-HDL levels, cholesterol efflux, and LCAT-mediated esterification in mice expressing the human cholesteryl ester transfer protein (CETP) and human apolipoprotein A-I (apoA-I) transgenes. *J Lipid Res.* 1996 ; 37(6) : 1268-1277.

Frey EA, Miller DS, Jahr TG, Sundan A, Bazil V, Espevik T, Finlay BB, Wright SD. Soluble CD14 participates in the response of cells to lipopolysaccharide. *J Exp Med*. 1992; 176(6): 1665-71.

Gaofu Q, Jun L, Xin Y, Wentao L, Jie W, Xiuyun Z, Jingjing L. Vaccinating rabbits with a cholesteryl ester transfer protein (CETP) B-Cell epitope carried by heat shock protein-65 (HSP65) for inducing anti-CETP antibodies and reducing aortic lesions in vivo. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2005 ; 45(6): 591-8.

Gautier T, Klein A, Deckert V, Desrumaux C, Ogier N, Sberna AL, Paul C, Le Guern N, Athias A, Montange T, Monier S, Piard F, Jiang XC, Masson D, Lagrost L. Effect of plasma phospholipid transfer protein deficiency on lethal endotoxemia in mice. *J Biological Chemistry*. 2008; 283(27): 18702-10.

Gogos CA, Drosou E, Bassaris HP, Skoutelis A. Pro- versus anti-inflammatory cytokine profile in patients with severe sepsis: a marker for prognosis and future therapeutic options. *J Infect Dis*. 2000; 181(1): 176-80.

Gordon DJ, Probstfield JL, Garrison RJ, Neaton JD, Castelli WP, Knoke JD, Jacobs DR Jr, Bangdiwala S, Tyroler HA. High-density lipoprotein cholesterol and cardiovascular disease. Four prospective American studies. *Circulation*. 1989; 79(1): 8-15.

Gotto AM Jr, Cannon CP, Li XS, Vaidya S, Kher U, Brinton EA, Davidson M, Moon JE, Shah S, Dansky HM, Mitchel Y, Barter P; DEFINE Investigators. Evaluation of lipids, drug concentration, and safety parameters following cessation of treatment with the cholesteryl ester transfer protein inhibitor anacetrapib in patients with or at high risk for coronary heart disease. *Am J Cardiol*. 2014; 113(1): 76-83.

Gotto AM Jr, Kher U, Chatterjee MS, Liu Y, Li XS, Vaidya S, Cannon CP, Brinton EA, Moon JE, Shah S, Dansky HM, Mitchel Y, Barter

P; the DEFINE Investigators. Lipids Safety Parameters and Drug Concentrations After an Additional 2 Years of Treatment With Anacetrapib in the DEFINE Study *J Cardiovasc Pharmacol Ther.* 2014 b; 14. [Epub ahead of print].

Grion CM, Cardoso LT, Perazolo TF, Garcia AS, Barbosa DS, Morimoto HK, Matsuo T, Carrilho AJ. Lipoproteins and CETP levels as risk factors for severe sepsis in hospitalized patients. *Eur J Clin Invest.* 2010; 40(4): 330-8.

Groener JE, Van Rozen AJ, Erkelens DW. Cholesteryl ester transfer activity. Localization and role in distribution of cholesteryl ester among lipoproteins in man. *Atherosclerosis.* 1984; 50(3): 261-71.

Guo L, Song Z, Li M, Wu Q, Wang D, Feng H, Bernard P, Daugherty A, Huang B, Li X. A. Scavenger receptor BI protects against septic death through its role in modulating inflammatory response. *J Biol Chem.* 2009; 284(30): 19826-34.

Ha YC, Barter PJ. Differences in plasma cholesteryl ester transfer activity in sixteen vertebrate species. *Comp Biochem Physiol B,* 1982; 71(2): 265-269.

Hallman M, Ramet M, Ezekowitz, R. A. Toll-like receptors as sensors of pathogens. *Pediatr Res.* 2001; 50(3): 325-21.

Han J, Ulevitch RJ Limiting inflammatory responses during activation of innate immunity. *Nat Immunol.* 2005; 6(12):1198-205.

Hardardóttir, I, Grunfeld, C and Feingold, K. R. Effects of endotoxin on lipid metabolism. *Biochem. Soc. Trans.* 1995; 23: 1013–1018.

Hardardottir IH, Fuller J, Fielding C, Feingold K, Grünfeld C. Endotoxin and cytokines decrease serum levels and extra hepatic protein and mRNA levels of cholesteryl ester transfer protein in syrian hamsters. *J Clin Invest.* 1996; 97: 2585-2592.

Havel RJ, Eder HA, Bragdon JH. The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoprotein in human serum. *J Clin Invest.* 1955; 34(9): 1345-53.

Heumann D, Gallay P, Betz-Corradin S, Barras C, Baumgartner JD and Glauser MP. Competition between bactericidal/permeability-increasing protein and lipopolysaccharide-binding protein for lipopolysaccharide binding monocytes *J Infect Dis.* 1993; 167: 1351-1357.

Hirano K, Yamashita, S., Nakajima, N., Arai, T., Maruyama, T., Yoshida Y., Ishigami M., Sakai N., Kameda-Takemura K., and Matsuzawa Y. Genetic cholesteryl ester transfer protein deficiency is extremely frequent in the Omagari area of Japan: marked hyperalphalipoproteinemia caused by CETP gene mutation is not associated with longevity. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1997; 17, 1053–1059.

Hotchkiss KC, Chang PE, Swanson KW, Tinsley JJ, Hui P, Klender, S, Xanthoudakis S, Roy C, Black E, Grimm R, Aspiotis Y, Han DW, Nicholson DW, Karl IE. Caspase inhibitors improve survival in sepsis: a critical role of the lymphocyte. *Nat Immunol.* 2000; 1(6): 496-501.

Hotchkiss RS, Karl IE. The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med.* 2003;9;348(2): 138-50.

Hotchkiss, R.S. and Nicholson, D.W. Characterization and modulation of the immunosuppressive phase of sepsis. *Infect. Immun.* 2010; 78(4): 1582-92.

ILAS (Instituto Latino Americano da Sepse. Agosto de 2014. Disponível em: <http://www.ilas.org.br/upfiles/fckeditor/file/Relatorio%20Nacional%20fev%202013.pdf>.

Inazu A, Brown ML, Hesler CB, Agellon LB, Koizumi J, Takata K, Maruhama Y, Mabuchi H, Tall AR. Increased high-density lipoprotein levels caused by a

common cholesteryl-ester transfer protein gene mutation. *N. Engl. J. Med.* 1990; 323(18): 1234–1238.

Ince C, Sinnasappel M. Microcirculatory oxygenation and shunting in sepsis and shock. *Critical Care Medicine.* 1999; 27(7): 1369-1377.

Janssens S, Tschopp J. Signals from within: the DNA-damage-induced NF-kB response. *Cell Death Differ.* 2006; 13(5): 773-84.

Jiang XC, Agellon LB, Walsh A, Breslow JL, Tall A. Dietary cholesterol increases transcription of the human cholesteryl ester transfer protein gene in transgenic mice. Dependence on natural flanking sequences. *J Clin Invest.* 1992; 90(4): 1290-5.

Juan TS, Hailman E, Kelley MJ, Wright SD, Lichenstein HS. Identification of a domain in soluble CD14 essential for lipopolysaccharide (LPS) signaling but not LPS binding. *J Biol Chem.* 1995; 270(29): 17237-42.

Kang YH, Dwivedi RS; Lee CH. Ultrastructural and immunocytochemical study of the uptake and distribution of bacterial lipopolysaccharide. *Journal of Leukocyte Biology.* 1990; 48(4): 316-332.

Kang YH; Lee CH, Monroy RL, Dwivedi RS; Odeyale C, Newball HH. Uptake, distribution and fate of bacterial lipopolysaccharides in monocytes and macrophages: an ultrastructural and functional correlation. *Electron Microsc. Rev.* 1992; 5(2): 381-419.

Kawai T, Akira S. TLR signaling. *Cell Death Differ.* 2006; 13(5): 816-25.

King EG, Bauzá GJ, Mella JR, Remick DG. Pathophysiologic mechanisms in septic shock. *Lab Invest.* 2014; 94(1): 4-12.

Koropatnick TA, Kimbell J, Chen R, Grove JS, Donlon TA, Masaki KH, Rodriguez BL, Willcox BJ, Yano K, Curb JD. A prospective study of high-density lipoprotein cholesterol, cholesteryl ester transfer protein gene variants, and healthy aging in very old Japanese-american men.. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2008; 63(11): 1235-40.

Kourilsky P; Truffa-Bachi P. Cytokine fields and the polarization of the immune response. *Trends Immunol*. 2001; 22(9): 502-9.

Kumar A; Takada Y; Boriek AM; Aggarwal BB. Nuclear factor-kB: its role in health and disease. *J. Mol. Med*. 2004; 82: 434-448.

Kundu JK, Surh YJ. Inflammation: Gearing the journey to cancer. *Mutat. Res.*, 2008; 659(1-2):15-30.

Kung CT, Su CM, Hsueh-Wen, Cheng HH, Hsiao SY, Tsai TC, Tsai NW, Wang HC, Su YJ, Lin WC, Cheng BC, Chang YT, Chiang YF, Lu CH. The prognostic value of leukocyte apoptosis in patients with severe sepsis at the emergency department. *Clin Chim Acta*. 2014: S0009-8981(14)00413-6.

Leelahavanichkul A, Bocharov AV, Kurlander R, Baranova IN, Vishnyakova TG, Souza AC, Hu X, Doi K, Vaisman B, Amar M, Sviridov D, Chen Z, Remaley AT, Csako G, Patterson AP, Yuen PS, Star RA, Eggerman TL. Class B Scavenger Receptor Types I and II and CD36 Targeting Improves Sepsis Survival and Acute Outcomes in Mice. *J Immunol* 2012; 188(6): 2749-58.

Levels JHM, Pajkrt D, Schultz M, Hoek FJ, van Tol A, Meijers JC, van Deventer SJ. Alterations in lipoprotein homeostasis during human experimental endotoxemia and clinical sepsis. *Biochim Biophys Acta*. 2007; 1771(12): 1429-1438.

Lien E, Ingalls RR. Toll-like receptors. *Crit Care Med*. 2002; 30 (suppl): S1-S11.

Livak KJ, Schmitgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. *Methods*. 2001; 25: 402-408.

Marcel YL, Marcel YL, McPherson R, Hogue M, Czarnecka H, Zawadzki Z, Weech PK, Whitlock ME, Tall AR, Milne RW. Distribution and concentration of cholesteryl ester transfer protein in plasma of normolipemic subjects. *J Clin Invest*, 1990; 85:10-17.

Masucci-Magoulas L.; Moulin P; Jiang Xc; Richardson H; Walsh A; Breslow JI; Tall A. Decreased cholesteryl ester transfer protein (CETP) mRNA and protein and increased high density lipoprotein following lipopolysaccharide administration in human CETP transgenic mice. *J Clin Invest*. 1995; 95: 1587-1594.

Mcpherson R, Mann CJ, Tall AR, Hogue M, Martin L, Milne RW, Marcel YL. Plasma concentrations of cholesteryl ester transfer protein in hyperlipoproteinemia. Relation to cholesteryl ester transfer protein activity and other lipoprotein variables. *Arterioscler Thromb*. 1991; 11(4): 797-804.

Medzhitov R; Janeway, CJR. An ancient system of host defense. *Curr Opin Immunol*. 1998; 10(1): 12-15.

Medzhitov R; Janeway CJR. Innate immunity. *N Engl J Med*. 2000; 343(5): 338-44.

Mercer-Jones MA, Heinzelmann M, Peyton JC, Wickel D, Cook M, Cheadle WG. Inhibition of neutrophil migration at the site of infection increases remote organ neutrophil sequestration and injury. *Shock*. 1997;8: 193–199.

Morehouse LA, Sugarman ED, Bourassa PA, Sand TM, Zimetti F, Gao F, Rothblat GH, Milici AJ. Inhibition of CETP activity by torcetrapib reduces susceptibility to diet-induced atherosclerosis in New Zealand White rabbits. *J Lipid Res*. 2007; 48(6): 1263-72.

Moriyama Y, Okamura T, Inazu A, Doi M, Iso H, Mouri Y, Ishikawa Y, Suzuki H, Iida M, Koizumi J, Mabuchi H, Komachi Y. A low prevalence of coronary heart disease among subjects with increased high-density lipoprotein cholesterol levels, including those with plasma cholesteryl ester transfer protein deficiency. *Prev Med.* 1998; 27(5 Pt 1): 659-67

Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol.* 2008; 8(12): 958-69.

Murch O, Collin M, Hinds CJ, Thiemermann C. Lipoproteins in inflammation and sepsis. I. Basic Science. *Intensive Care Med.* 2007; 33 (1): 13-24.

Ng PC. Diagnostic markers of infection in neonates. *Arch Dis Child Fetal Neonatal.* 2004; 89(3): F229-35.

Ng TH, Britton GJ, Hill EV, Verhagen J, Burton BR, Wraith DC. Regulation of adaptive immunity; the role of interleukin-10. *Front Immunol.* 2013; 4: 129.

Niederman MS, Fein AM. Sepsis syndrome, the adult respiratory distress syndrome, and nosocomial pneumonia. A common clinical sequence. *Clin Chest Med.* 1990;11(4): 633-56.

Novotny AR, Reim D, Assfalg V, Altmayr F, Friess HM, Emmanuel K, Holzmann B. Mixed antagonist response and sepsis severity-dependent dysbalance of pro- and anti-inflammatory responses at the onset of postoperative sepsis. *Immunobiology.* 2012; 217(6): 616-21.

Okamoto H, Yonemori F, Wakitani K, Minowa T, Maeda K, Shinkai H. A cholesteryl ester transfer protein inhibitor attenuates atherosclerosis in rabbits. *Nature.* 2000; 406(6792): 203-7.

Oliveira HC, Chouinard RA, Agellon LB, Bruce C, Ma L, Walsh A, Breslow JL, Tall AR. Human cholesteryl ester transfer protein gene proximal promoter

contains dietary cholesterol positive responsive elements and mediates expression in small intestine and periphery while predominant liver and spleen expression is controlled by 5'-distal sequences. *J Biol Chem.* 1996; 271(50): 31831-31838.

Oliveira HC, de Faria EC. Cholesteryl ester transfer protein: the controversial relation to atherosclerosis and emerging new biological roles. *IUBMB Life.* 2011; 63(4): 248-57.

Opal SM, Esmon CT. Bench-to-beside review: functional relationships between coagulation and the innate immune response and their respective roles in the pathogenesis of sepsis. *Crit Care.* 2003; 7(1): 23-38.

Opal S. M. The host response to endotoxin, antilipopolysaccharide strategies and the management of severe sepsis. *Int. J. Med. Microbiol.* 2007;297(5): 365-77.

Ordovas JM, Cupples LA, Corella D, Otvos JD, Osgood D, Martinez A, Lahoz C, Coltell O, Wilson PW, Schaefer EJ. Association of Cholesteryl Ester Transfer Protein–TaqIB Polymorphism with Variations in Lipoprotein Subclasses and Coronary Heart Disease Risk The Framingham Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000; 20(5): 1323-9.

Osuchowski MF, Welch K, Siddiqui J, Remick DG. Circulating cytokine/inhibitor profiles reshape the understanding of the SIRS/CARS continuum in sepsis and predict mortality. *J Immunol.* 2006;177(3): 1967-74.

Park BS, Lee JO. Recognition of lipopolysaccharide pattern by TLR4 complexes. *Exp Mol Med.* 2013; 45: e66.

Perman SM, Goyal M, Gaieski,DF. Initial emergency department diagnosis and management of adult patients with severe sepsis and septic shock. *Scand J Trauma Resusc Emerg Med.* 2012; 20(41): 2-11.

Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 2001; 29:e45.

Pollack M, Ohi CA. Endotoxin-based molecular strategies for the prevention and treatment of gram-negative sepsis and septic shock. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1996; 216: 275-97.

Pugin J, Schürer-Maly CC, Leturcq D, Moriarty A, Ulevitch RJ, Tobias PS. Lipopolysaccharide activation of human endothelial and epithelial cells is mediated by lipopolysaccharide-binding protein and soluble CD14. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993; 90(7): 2744-8.

Rangel-Frausto, MS, Pittet D, Costigan M, Hwang T, Davis CS, Wenzel RP. The Natural history of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS): a prospective study. *JAMA.* 1995; 273: 117-123.

Rangel-Frausto MS. Sepsis: still going strong. *Arch Med Res.* 2005;36(6): 672-81.

Rao R, Albers JJ, Wolfbauer G, Pownall HJ. Molecular and macromolecular specificity of human plasma phospholipid transfer protein. *Biochemistry.* 1997 Mar 25;36(12):3645-53

Riedemann NC; Guo RF; Ward P. A Novel strategies for the treatment of sepsis. *Nat. Med.* 2003; 9: 517–524.

Riedemann NC, Neff TA, Guo RF, Bernacki KD, Laudes IJ, Sarma JV, Lambris JD, Ward PA. Protective effects of IL-6 blockade in sepsis are linked to reduced C5a receptor expression. *J. Immunol.* 2003 b; 170(1): 503–507.

Rittershaus CW, Miller DP, Thomas LJ, Picard MD, Honan CM, Emmett CD, Pettey CL, Adari H, Hammond RA, Beattie DT, Callow AD, Marsh

HC, Ryan US. Vaccine-induced antibodies inhibit CETP activity in vivo and reduce aortic lesions in a rabbit model of atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000; 20(9): 2106-12.

Rittirsch D, Huber-Lang MS, Flierl MA, Ward PA. Immunodesign of experimental sepsis by cecal ligation and puncture. *Nature Protocols*, 2009; 4(1): 31-36.

Rodríguez E, Mateo I, Infante J, Llorca J, Berciano J, Combarros O. Cholesteryl ester transfer protein (CETP) polymorphism modifies the Alzheimer's disease risk associated with APOE epsilon4 allele. *J Neurol.* 2006; 253(2): 181-5.

Rossol M, Heine H, Meusch U, Quandt D, Klein C, Sweet MJ, Hauschildt S. LPS-induced cytokine production in human monocytes and macrophages. *Crit Rev Immunol.* 2011; 31(5): 379-446.

Rothblat GH, Phillips MC. High-density lipoprotein heterogeneity and function in reverse cholesterol transport. *Curr Opin Lipidol.* 2010; 21(3): 229-38.

Russell JA. Management of sepsis. *N Engl J Med.* 2006; 355(16): 1699-713.

Ryan AJ; Flanagan SW; Moseley PI; Gisolfi CV. Acute heat stress protects rats against endotoxin shock. *J Appl Physiol.* 1992; 73(4): 1517-22.

Salerno AG, Silva TR, Amaral ME, Alberici LC, Bonfleur ML, Patrício PR, Francesconi EP, Grassi-Kassisse DM, Vercesi AE, Boschero AC, Oliveira HC. Overexpression of apolipoprotein CIII increases and CETP reverses diet-induced obesity in transgenic mice. *Int J Obes (Lond).* 2007; 31(10): 1586-95.

Salomão R, Martins PS, Brunialti MK, Fernandes Mda L, Martos LS, Mendes ME, Gomes NE, Rigato O. TLR signaling pathway in patients with sepsis. *Shock.* 2008; 30 supplement 1:73–77.

Salvo I, De Cian W, Musicco M, Langer M, Piadena R, Wolfler A, Montani C, Magni E. The Italian SEPSIS study: preliminary results on the incidence and evolution of SIRS, sepsis, severe sepsis and septic shock. *Intensive Care Med.* 1995; 21(2): S244-9.

Sanders AE, Wang C, Katz M, Derby CA, Barzilai N, Ozelius L, Lipton RB. Association of a functional polymorphism in the cholesteryl ester transfer protein (CETP) gene with memory decline and incidence of dementia. *JAMA.* 2010; 13;303(2): 150-8.

Schechter CB, Barzilai N, Crandall JP, Atzmon G. Cholesteryl ester transfer protein (CETP) genotype and reduced CETP levels associated with decreased prevalence of hypertension. *Mayo Clin Proc.* 2010; 85(6): 522-6.

Shao B, Lu M, Katz SC, Varley AW, Hardwick J, Rogers TE, Ojogun N, Rockey DC, Dematteo RP, Munford RS. A host lipase detoxifies bacterial lipopolysaccharides in the liver and spleen. *The Journal of Biological Chemistry.* 2007; 282(18): 13726-13735.

Shao B, Munford RS, Kitchens R, Varley AW. Hepatic uptake and deacylation of the LPS in bloodborne LPS-lipoprotein complexes. *Innate Immun.* 2012; 18(6): 825-33.

Schumann RR, Leong SR, Flaggs GW, Gray PW, Wright SD, Mathison JC, Tobias PS, Ulevitch RJ. Structure and function of lipopolysaccharide binding protein. *Science.* 1990; 249(4975):1429-31.

Sikora JP, Chlebna-Sokół D, Dabrowska I, Lipczyński D, Chrul S. Proinflammatory cytokine inhibitors, TNF-alpha and oxidative burst of polymorphonuclear leukocytes in the pathogenesis of sepsis in newborns. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2001; 49(2): 155-61.

Sirtori CR. Investigational CETP antagonists for hyperlipidemia and atherosclerosis prevention. *Expert Opin Investig Drugs.* 2011; 20(11): 1543-54.

Siveen KS, Kuttan G. Role of macrophages in tumour progression. *Immunol Lett.* 2009; 23(2): 97-102.

Skrupky LP, Kerby PW, Hotchkiss RS. Advances in the Management of Sepsis and in the Understanding of Key Immunologic Defects of the Disorder. *Anesthesiology.* 2011; 115(6): 1349-62.

Soriano FG, Barbeiro HV, Barbeiro DF. Inflammatory response: role of B1 cells. *Shock.* 2013; 39(1): 5-9.

Stafford JI; Neumann NF; Belosevic M. Macrophage-mediated innate host defense against protozoan parasites. *Crit Rev Microbiol.* 2002; 28: 187-248.

Stein O, Stein Y, Lipid transfer proteins (LTP) and atherosclerosis. *Atherosclerosis.* 2005;178 (.2): 217-30.

Srivastava SK, Ramana KV. Focus on Molecules: Nuclear factor-kappa B. *Exp Eye Res.* 2009 ; 88(1):2-3.

Sugano M, Makino N, Sawada S, Otsuka S, Watanabe M, Okamoto H, Kamada M, Mizushima A. Effect of antisense oligonucleotides against cholesteryl ester transfer protein on the development of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. *J Biol Chem.* 1998; 273(9): 5033-6.

Tall A, Granot E, Brocia R, Tabas I, Hesler C, Williams K, Denke M. Accelerated transfer of cholesteryl esters in dyslipidemic plasma. Role of cholesteryl ester transfer protein. *J Clin Invest.* 1987; 79(4):1217-25.

Teles JM, Silva E, Westphal G, Filho RC, Machado FR. Surviving sepsis campaign in Brazil. *Shock.* 2008; (30)Suppl 1:47-52.

Teramoto T, Takeuchi M, Morisaki Y, Ruotolo G, Krueger KA. Efficacy, Safety, Tolerability, and Pharmacokinetic Profile of Evacetrapib Administered as Monotherapy or in Combination With Atorvastatin in Japanese Patients With Dyslipidemia *Am J Cardiol*. 2014; 113(12): 2021-9.

Terasaka N, Wang N, Yvan-Charvet L, Tall AR. High-density lipoprotein protects macrophages from oxidized low-density lipoprotein-induced apoptosis by promoting efflux of 7-ketocholesterol via ABCG1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104: 15093–15098.

Thompson A, Di Angelantonio E, Sarwar N, Erqou S, Saleheen D, Dullaart RP, Keavney B, Ye Z, Danesh J. Association of cholesteryl ester transfer protein genotypes with CETP mass and activity, lipid levels, and coronary risk. *JAMA*. 2008; 299(23): 2777-88.

Tobias PS, Soldau K, Gegner JA, Mintz D, Ulevitch RJ. Lipopolysaccharide binding protein-mediated complexation of lipopolysaccharide with soluble CD14. *J Biol Chem*. 1995; 270(18): 10482-8.

Topley N; Mackenzie RK; Williams JD. Macrophages and mesothelial cells in bacterial peritonitis. *Immunobiology*. 1996; 195: 563-573.

Topley N, Liberek T, Davenport A, Li FK, Fear H, Williams JD. Activation of inflammation and leukocyte recruitment into the peritoneal cavity. *Kidney Int Suppl*. 1996 b ;56:S17-21.

Underhill DM, Ozinsky A. Phagocytosis of microbes: complexity in action. *Annu Rev Immunol*. 2002; 20: 825-52.

Vandesompele J, de Preter K, Pattyn F, Poppe B, van Roy N, de Paepe A, Speleman F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology*. 2002; 3(7): 0034.1 - 0034.11.

van Leeuwen HJ, Heezius EC, Dallinga GM, van Strijp JA, Verhoef J, van Kessel KP. Lipoprotein metabolism in patients with severe sepsis. *Crit Care Med*. 2003; 31(5): 1359-66.

Van Lieshout MH, van der Poll T, Van't Veer C. TLR4 inhibition impairs bacterial clearance in a therapeutic setting in murine abdominal sepsis. *Inflamm Res*. 2014; 63(11): 927-33.

Vasan RS, Pencina MJ, Robins SJ, Zachariah JP, Kaur G, D'Agostino RB, Ordovas JM. Association of Circulating Cholesteryl Ester Transfer Protein Activity With Incidence of Cardiovascular Disease in the Community. *Circulation*. 2009; 120(24): 2414-20.

Verhasselt V, Buelens C, Willems F, De Groote D, Haeflner-Cavaillon N, Goldman M. Bacterial lipopolysaccharide stimulates the production of cytokines and the expression of costimulatory molecules by human peripheral blood dendritic cells: evidence for a soluble CD14-dependent pathway. *J Immunol*. 1997; 158(6): 2919-25.

Vincent JL, Slotman G, Van Leeuwen PA, Shelly M, Nasraway S, Tenailon A, Bander J, Friedman G. IL-1ra administration does not improve cardiac function in patients with severe sepsis. *J Crit Care* 1999; 14(2): 69-72.

Vincent JL. Update on sepsis: pathophysiology and treatment. *Acta Clin Belg*. 2000; 55(2): 79-87.

Vincent JL, Sakr Y, Sprung CL, Ranieri VM, Reinhart K, Gerlach H, Moreno R, Carlet J, Le Gall JR, Payen D. Sepsis in European intensive care units: results of the SOAP study. Sepsis Occurrence in Acutely Ill Patients Investigators. *Crit Care Med* .2006; 34(2): 344-53.

Vishnyakova TG, Bocharov AV, Baranova IN, Chen Z, Remaley AT, Csako G, Eggerman TL, Patterson AP. Binding and internalization of lipopolysaccharide by Cla-1, a human orthologue of rodent scavenger receptor B1. *J Biol Chem.* 2003; 278(25): 22771-80.

Wang SC, Klein RD, Wahl WL, Alarcon WH, Garg RJ, Remick DG, Su GL. Tissue coexpression of LBP and CD14 mRNA in a mouse model of sepsis. *J Surg Res.* 1998; 76(1): 67-73.

Wang N, Lan D, Chen W, Matsuura F, Tall AR. ATP-binding cassette transporters G1 and G4 mediate cellular cholesterol efflux to highdensity lipoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101(26): 9774 –9779.

Werling D, Jungi TW. Toll-like receptors linking innate and adaptive immune response. *Vet Immunol Immunopathol.* 2003; 91(1): 1-12.

Wichtermann KA, Baue AE, Chaudry IH. Sepsis and septic shock-a review of laboratory models and a proposal. *J. Surg. Res.* 1980; 29: 189 -201.

Wright SD, Ramos RA, Tobias PS, Ulevitch RJ, Mathison JC. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science.* 1990; 249(4975): 1431-3.

Wu A, Hinds CJ, Thiernemann C. High-density lipoproteins in sepsis and septic shock: metabolism, actions, and therapeutic applications. *Shock.* 2004; 21(3): 210-221.

Xu D, Komai-Koma M; Liew FY. Expression and function of Toll-like receptor on T cells. *Cell Immunol,* 2005; 233: 85-89.

Zhong S, Sharp DS, Grove JS, Bruce C, Yano K, Curb JD, Tall AR. Increased coronary heart disease in Japanese-American men with mutation in the

cholesteryl ester transfer protein gene despite increased HDL levels. *J Clin Invest.* 1996; 97(12): 2917-23.

Zweigner J, Schumann RR, Weber JR. The role of lipopolysaccharide-binding protein in modulating the innate immune response. *Microbes Infect.* 2006; 8(3): 946-52.