Marcela Helena Gambim

**Geração de espécies reativas por exossomos
plaquetários: um possível novo mecanismo de
disfunção vascular na sepse**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Doutor em Ciências

Área de Concentração: Processos Inflamatórios e
Alérgicos

Orientador: Prof. Dr. Mariano Janiszewski

**São Paulo
2009**

Marcela Helena Gambim

**Geração de espécies reativas por exossomos
plaquetários: um possível novo mecanismo de
disfunção vascular na sepse**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Doutor em Ciências

Área de Concentração: Processos Inflamatórios e
Alérgicos

Orientador: Prof. Dr. Mariano Janiszewski

**São Paulo
2009**

Este trabalho foi realizado no
Laboratório de Biologia Molecular
LIM/17 da Disciplina de Reumatologia
da Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais Antonio Gambim e Maria Helena dos Reis Gambim, amores da minha vida, pelo incentivo na concretização deste, mesmo que isso tenha ocasionado distância física entre nós, preocupações, noites mal dormidas e muita saudade, enfim, pelo amor incondicional.

Em especial, ao meu companheiro Carlos Augusto Guimarães Fonseca, por seu amor, seu apoio, seu companheirismo, seu incentivo, sua paciência e compreensão. Agradeço em especial por nossa casa e pelos momentos felizes que me tornam uma pessoa completa e realizada.

Agradecimentos

Agradeço a todos que contribuíram direta e indiretamente para a realização deste trabalho. Algumas menções especiais:

À Deus, por me permitir mais uma vida terrena, mais uma oportunidade de evolução espiritual.

À minha família, constante fonte de amor, apoio e estímulo em minha vida, em especial à minha irmã Rafaela Cristina Gambim, pelos e-mails enviados, que me mantiveram próxima da minha família e sempre me motivaram.

À querida amiga Ana Patrícia do Nascimento, o elo entre eu e a Faculdade de Medicina. Agradeço pela ajuda, pela oportunidade, por ceder sua casa, ser muito mais que amiga, uma mãe. Por ser tão gentil e tão generosa comigo.

À Profa. Dra. Eloísa Bonfá, titular da Disciplina de Reumatologia, que me permitiu a realização deste trabalho.

Ao Dr. Mariano Janiszewski, meu orientador. Agradeço pela oportunidade, orientação, paciência, dedicação, incentivo, otimismo, amizade e pelos ensinamentos.

À Profa. Dra Lúcia Rossetti Lopes, docente do Departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas da USP, por auxiliar no design do estudo, coordenação deste e análise dos dados, bem como, por abrir as portas do seu laboratório para execução de parte dos experimentos.

À Dra Vilma dos Santos Trindade Viana, pesquisadora do Departamento de Reumatologia da FMUSP, minha inspiração profissional. Agradeço pela oportunidade, pelos valiosos ensinamentos profissionais e de vida, pela amizade, pelo apoio e incentivo constante.

À todas as biólogas dos laboratórios da Disciplina de Reumatologia da FMUSP, em especial à Elaine Pires Leon pela amizade e paciência, à quem devo todo o aprendizado de bancada; à Cleonice Bueno, pela amizade sincera; à Margarete Borges Galhardo Vendramini, pelo sorriso contagiante, que me dá forças, e pela amizade; à Solange Carrasco, pela valiosa amizade, pelos ensinamentos e oportunidades.

À Maria de Fátima Correia da Silva, secretária da Disciplina de Reumatologia da FMUSP, por ser sempre tão solícita e cuidar dos documentos relacionados à pós-graduação por mim.

Ao biólogo Sidney V. Filho, do Instituto de Ciências Biomédicas da USP, ao pesquisador Alípio de Oliveira do Carmo e à pesquisadora Luciana Marti, do Instituto de Pesquisa do Hospital Albert Einstein, pelo auxílio nos experimentos.

Às minhas amigas Viviane Scrivani e Nancy Canavesi, pela amizade incondicional, pelo apoio e incentivo sempre.

A todos os pacientes sépticos e parentes, bem como, todos os doadores de sangue do grupo controle que permitiram a realização deste trabalho e contribuíram para a evolução da ciência.

“A gente deve ter sempre em mente o que espera da vida.

A vida é para nós o que permitimos que ela seja”.

Esta dissertação ou tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A.L. Freddi, Maria F.Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2ª ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

Sumário

Lista de abreviaturas

Resumo

Summary

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Sepsis: clínica e epidemiologia.....	2
1.2 Fisiopatologia da sepsis.....	4
1.2.1 LPS e inflamação.....	8
1.3 Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio na sepsis.....	13
1.3.1 NADPH oxidases.....	17
1.3.2 NO sintases (NOS).....	21
1.3.3 Sinalização redox.....	25
1.4 Disfunção endotelial na sepsis.....	31
1.5 Apoptose de células endoteliais na sepsis.....	34
1.5.1 Vias da apoptose.....	38
1.5.2 Apoptose induzida por NO e seus congêneres.....	41
1.6 Exossomos.....	46
1.6.1 A via endossomal.....	47
1.6.2 Composição molecular dos exossomos.....	49
1.6.3 Função dos exossomos nos diferentes tipos celulares.....	52
2. OBJETIVOS.....	58
3. MÉTODOS.....	60
3.1 Casuística.....	61
3.2 Reagentes específicos.....	62
3.3 Cultura de células endoteliais aórticas de coelho.....	65
3.4 Obtenção dos exossomos.....	66
3.4.1 Isolamento de Exossomos Plaquetários de Pacientes Sépticos.....	66
3.4.2 Obtenção de Exossomos Plaquetários de Voluntários Saudáveis.....	67
3.4.2.1 Separação das plaquetas.....	67
3.4.2.2 Estimulação das plaquetas a produzirem exossomos: criação de um modelo semelhante aos exossomos plaquetários de pacientes sépticos.....	67
3.4.2.3 Isolamento dos exossomos.....	68
3.5 Obtenção de corpos apoptóticos.....	68
3.6 Caracterização dos exossomos.....	69
3.6.1 Citometria de Fluxo.....	69
3.6.2 Microscopia eletrônica.....	70
3.7 Detecção de espécies reativas.....	71
3.8 Imunodetecção de enzimas.....	75
3.8.1 Separação dos leucócitos.....	75
3.8.2 Preparo do Lisado de células endoteliais.....	76
3.8.3 “Western Blotting”.....	76
3.9 Investigação de Apoptose em células endoteliais.....	78
3.9.1 Microscopia de fluorescência.....	78
3.9.2 Detecção colorimétrica de Caspase-3.....	79
3.10 Análise Estatística.....	80
4. RESULTADOS.....	81
4.1 Dados demográficos e características dos pacientes e controles.....	82
4.2 Caracterização dos Exossomos.....	83
4.2.1 Quantificação de Proteínas.....	83

4.2.2 Citometria de Fluxo.....	83
4.2.3 Microscopia eletrônica.....	84
4.3 Detecção de Espécies Reativas.....	85
4.4 Expressão protéica nos exossomos.....	92
4.5 Quantificação de Apoptose.....	94
5. DISCUSSÃO.....	97
6. CONCLUSÕES.....	104
7. REFERÊNCIAS.....	107
Apêndice	

Lista de abreviaturas

ACD	anticoagulante citrato dextrose
AP-1	fator de transcrição nuclear envolvido em proliferação e transformação celular
APAF-1	fator 1 de ativação de protease apoptótica
APCs	células apresentadoras de antígenos
Bak	proteína pró-apoptótica
BASES	estudo epidemiológico brasileiro de sepse
Bax	proteína pró-apoptótica
Bcl-2	proteína anti-apoptótica
CARD	domínio de recrutamento da caspase
CARS	síndrome da resposta anti-inflamatória compensatória
Cit <i>c</i>	citocromo <i>c</i>
c-jun	fator de transcrição
DAF	4,5 -diaminofluoresceína diacetato
dATP	deoxiATP
DCHF	2',7'-dihidrodiclorofluoresceína diacetato
DCs	células dendríticas
DGK- α	diacilglicerol quinase- α
DISC	complexo de sinalização induzido pela morte
D-NAME	N _w -Nitro-D-arginina metil ester
ECs	células endoteliais
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
EEs	endossomos primários
Erk	quinase regulada por estímulos extracelulares

FAD	flavina adenina dinucleotídeo
FADD	domínio de morte associado ao Fas
Família Bcl-2	família de proteínas indutoras e repressoras de morte por apoptose
FasL	Fas ligante
FDC	células dendríticas foliculares
FITC	fluorocromo isotiocianato de fluoresceína
FMN	flavina mononucleotídeo
Fos	família de proteínas que dimeriza com Jun para produzir AP-1
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio
HEPES	tampão N-2-hidroxietilpiperazina – N'- 2 etano – sulfonato, tampão orgânico não baseado em bicarbonato
HSPs	proteínas ativadas por choque térmico
ICAM-1	molécula de adesão intercelular-1
IECs	células epiteliais intestinais
IL-1ra	receptor agonista da IL-1
ILVs	vesículas intralumiais
IM	membrana mitocondrial interna
IRF3	fator 3 de regulação do interferon
IRF5	fator 5 de regulação do interferon
JNK	quinase c-Jun NH2-terminal
LBP	proteína de ligação ao LPS
LEs	endossomos tardios
L-NAME	N ^G -Nitro-L-arginina metil éster

L-NMA	L ^G - Metil-L-arginina acetato
L-NMMA	N ^G -monometil-L-arginina
L-NNA	N ^G -nitro-L-arginina
LPS	lipopolissacarídeo
MAPK	proteínas quinases ativadas por mitógenos
MD-2	co-receptor do TLR4
MnTBAP	substância mimética de superóxido dismutase [Mn (III) tetrakis (4-ácido benzóico) cloreto de porfirina]
MVBs	corpos multivesiculares
MyD88	proteína citosólica ativada pelo Toll
NADP ⁺	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato em sua forma oxidada
NADPH	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato em sua forma reduzida
NF-κB	fator de transcrição nuclear - kappa B
NK	células natural killer
NO	óxido nítrico
NONOato	dietilamina-NONOato (espécie química doadora de NO)
NOS	óxido nítrico sintase
cNOS	NOS constitutiva
eNOS ou NOS tipo III	isoforma endotelial da NOS
iNOS ou NOS tipo II	isoforma induzível da NOS
nNOS ou NOS tipo I	isoforma neuronal da NOS
NOX	família das NADPH oxidases

Nox2	subunidade gp91 ^{phox} da NADPH oxidase de fagócitos
Nox 1	isoforma da subunidade gp91 ^{phox}
O ₂ ⁻	superóxido
OH [•]	radical hidroxila
OM	membrana mitocondrial externa
ONOO ⁻	superóxido
PAF	fator ativador de plaquetas
PAMP's	padrões moleculares associados a patógenos
PDI	isomerase de dissulfetos protéicos
PDGF	fator de crescimento derivado da plaqueta
PE	fluorocromo ficoeritrina
Phox	identificador das subunidades da NADPH oxidase de fagócitos (“ ph agocyte ox idase”)
PMSF	fenilmetilsulfonilfluoreto, inibidor de proteases
PTP	poro de transição da permeabilidade
RP105	proteína de superfície expressa em linfócitos B que se associa ao TLR4 no reconhecimento de LPS
SH	grupo tiol
SIRS	resposta inflamatória sistêmica
SOD	superóxido dismutase
TBS	tampão tris salina
TBS-T	tampão TBS com tween
TGF-beta	fator de crescimento e transformação-beta
TIR	domínio do receptor Toll/IL-1

TLR	receptor do tipo Toll
TNF- α	fator de necrose tumoral - alfa
TRAF-6	fator-6 associado ao receptor de TNF
VCAM-1	molécula de adesão vascular-1
VSMCs	células musculares lisas vasculares

Resumo

Gambim MH. *Geração de espécies reativas por exossomos plaquetários: um possível novo mecanismo de disfunção vascular na sepse* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2009. 121p.

Sepse, a resposta do organismo a uma infecção, está associada a altas taxas de mortalidade. A razão pela qual um mecanismo protetor resulta num quadro clínico fatal permanece inexplicada. Em trabalho prévio nosso grupo demonstrou que exossomos de origem plaquetária são os mais frequentes em plasma de pacientes com choque séptico e que estes podem induzir apoptose em células musculares lisas vasculares e células endoteliais em cultura. Demonstramos ainda que tais exossomos possuíam uma fonte enzimática de ROS, uma NADPH oxidase cuja atividade poderia estar associada à indução da apoptose (Janiszewski et al., 2004). No presente trabalho, nós buscamos criar um modelo de geração ex vivo de exossomos similares aos encontrados em pacientes sépticos e identificar possíveis vias responsáveis pela liberação destes e seus efeitos. Choque séptico é uma condição relacionada com exposição a lipopolissacarídeo (LPS) e geração de alta quantidade de trombina, $\text{TNF}\alpha$ e espécies reativas de nitrogênio. Através de citometria de fluxo revelamos que plaquetas humanas expostas ao doador de NO dietilamina-NONOato e ao LPS geraram exossomos similares àqueles encontrados em pacientes com choque séptico, expondo alta quantidade de tetraspaninas CD9, CD63 e CD81 mas pouca fosfatidilserina. Por outro lado, plaquetas expostas à trombina ou $\text{TNF}\alpha$ liberaram partículas com características claramente distintas, com alta exposição de fosfatidilserina e baixa de tetraspaninas. Assim como os exossomos sépticos, os exossomos obtidos pela exposição de NO e LPS geraram radical superóxido e NO, como demonstrado pela quimioluminescência da lucigenina (5 μM) e celenterazinina (5 μM) e pela fluorescência da 4,5-diaminofluoresceína (10mM) e 2',7'-diclorofluoresceína (10mM). A análise por Western Blot nos permitiu identificar as subunidades Nox1, Nox2 e p22^{phox} da NADPH oxidase e a isoforma induzível da enzima NO sintase (NOS) nesses exossomos. Como esperado, inibidores da NOS e da NADPH oxidase reduziram significativamente os sinais fluorescentes e quimioluminescentes. Em adição, as células endoteliais em cultura expostas aos exossomos gerados por dietilamina-NONOato e LPS sofreram significativo aumento da taxa de apoptose quando comparadas àquelas expostas a exossomos controle. A inibição da NADPH oxidase assim como da NOS reduziu expressivamente tal efeito. Adição de urato (1mM), mostrou efeito aditivo sobre a inibição do sinal fluorescente, assim como redução adicional da taxa apoptótica, sugerindo papel importante do radical peroxinitrito. Nós propomos, assim, que exossomos derivados de plaquetas podem representar papel adicional no já complexo cenário da sinalização vascular redox. Nesse sentido, uma abordagem baseada em exossomos pode fornecer novas ferramentas para o entendimento e até tratamento da disfunção vascular na sepse.

Summary

Gambim MH. *Generation of reactive oxygen species by platelet-derived exosomes: a possible novel mechanism of vascular dysfunction in sepsis* [thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2009. 121p.

Sepsis, the body's response to infection, is associated with high mortality rates. Why a protective mechanism turns into a deadly clinical picture is a matter of debate, and goes largely unexplained. In previous work we demonstrated that platelet-derived exosomes are found in the plasma of septic patients with septic shock and can induce endothelial and vascular smooth muscle cell apoptosis in culture through an enzymatic superoxide source (Janiszewski et al., 2004). In this work we sought to create a model for *ex vivo* generation of exosomes, and to identify the pathways responsible for ROS release by exosomes and their effects. Septic shock is a condition related to exposure of lipopolysaccharide (LPS), generation of high amounts of thrombin, TNF α and nitrogen reactive species. Through flow cytometry we demonstrated that human platelets exposed to the NO-donor diethylamine-NONOate, and to LPS, generated exosomes similar to those found in the blood of septic shock patients, with high exposure of the tetraspanin CD9, CD63, and CD81, but little phosphatidylserine. On the other hand, platelets exposed to thrombin or TNF α released particles with clearly distinct characteristics, such as high phosphatidylserine and low tetraspanin. Like the septic exosomes, the exosomes obtained by NO and LPS exposure generated superoxide radical and NO, as disclosed by lucigenin and coelenterazine chemiluminescence and by 4,5-diaminofluorescein and 2',7'-dichlorofluorescein fluorescence. Western Blot analysis revealed the presence of Nox1, Nox2 and p22phox NADPH oxidase subunits and the inducible isoform of NO synthase (NOS) in these exosomes. As expected, NOS inhibitors or NADPH oxidase inhibitors significantly reduced the fluorescence and chemiluminescent signals. In addition, endothelial cells exposed to NO or LPS generated exosomes underwent apoptotic death, while control exosomes had no effects on apoptosis. NADPH oxidase as well as NOS inhibition significantly reduced apoptosis rates. Concomitant generation of NO and superoxide suggests biological effects of the highly reactive radical peroxynitrite. In fact, the peroxynitrite scavenger urate (1 mM) showed an additive effect on fluorescent signal inhibition, as well as on endothelial apoptosis rate reduction. We thus propose that platelet-derived exosomes may be another class of actors in the complex play known as 'vascular redox signaling'. In this sense, an exosome-based approach can provide novel tools for further understanding and even treating vascular dysfunction related to sepsis.

1. Introdução

1.1 Sepses: clínica e epidemiologia

Sepses é uma das principais causas de morte em doentes graves e se desenvolve como resultado da resposta do organismo a uma infecção. A interação patógeno-hospedeiro resulta nessa síndrome clínica complexa, freqüentemente fatal, na qual mecanismos moleculares protetores aparentam sair do controle e se tornam danosos ao hospedeiro. O estágio final dos pacientes sépticos é invariavelmente acompanhado por mudanças hemodinâmicas intensas, especialmente, o colapso intratável da microcirculação, a falta de resposta aos vasopressores ou à ressuscitação volêmica, coagulação intravascular disseminada, culminando com falência múltipla de órgãos e morte. O mecanismo exato pelo qual pacientes sépticos morrem ainda é pouco conhecido. Necropsias não evidenciam lesões que justificam a morte ou que não poderiam ter sido contornadas por tratamento de suporte. A realidade, na maioria das vezes, é que o paciente se deteriora progressivamente até a parada cardíaca, ou quando os médicos decidem interromper a progressão dos esforços, habitualmente, após um longo período de internação na unidade de terapia intensiva (UTI), quando o indivíduo se encontra em insuficiência de múltiplos órgãos, sem expectativas de melhora ou de recuperação de qualidade de vida aceitável (Hotchkiss e Karl, 2003).

Em 1992, a sepses foi definida pelo “American College of Chest Physicians” e pela “Society of Critical Care Medicine” como uma resposta sistêmica à infecção, manifestada pela presença de dois ou mais dos sintomas: a) alteração de temperatura, acima de 38°C ou abaixo de 36°C; b) aumento de freqüência cardíaca, acima de 90 batimentos por minuto; c) aumento de freqüência respiratória, acima de 20 respirações por minuto ou PaCO₂ menor que 32 mmHg; d) contagem de leucócitos

no sangue acima $12000/\text{mm}^3$ ou menor que $4000/\text{mm}^3$ ou mais do que 10% de neutrófilos imaturos; na presença de infecção altamente suspeita ou documentada (Bone et al., 1992).

A sepse pode evoluir para quadros clínicos com gravidade variável. Na sua representação mais intensa, encontramos a sepse grave, representada pelo quadro séptico e a presença de disfunção de pelo menos um órgão e o choque séptico que nada mais é do que a sepse grave com hipotensão (pressão arterial sistêmica abaixo de 90 mmHg) irresponsiva a hidratação vigorosa ou com outra evidência de falência circulatória, como hiperlactatemia (Nguyen et al., 2006; Remick, 2007).

Apesar do desenvolvimento crescente de diversos métodos diagnósticos e terapêuticos, as taxas de mortalidades globais da sepse permanecem inaceitavelmente altas, variando, conforme o estudo, de 20 a 80% (Zanon et al., 2008). Sepse e choque séptico juntos representam a causa mais importante de morte em UTIs de adultos, superando as doenças cardiovasculares (Nguyen et al., 2006). Dados dos Estados Unidos indicam que ocorrem aproximadamente 751 000 casos de sepse por ano (3 casos/1000 pessoas) (Remick, 2007). No Brasil, dados do “Brazilian Sepsis Epidemiological Study” (BASES) mostram que a sepse é o maior problema de saúde pública em UTIs brasileiras, com uma alta incidência (cerca de 57 pacientes-dia por 1000), altas taxas de mortalidade (33,9% para sepse, 46,9% para sepse grave e 52,2% para choque séptico) e altos custos (Silva et al., 2004). Cerca de 15% dos leitos das UTIs são ocupados por paciente com sepse grave, em sua maior parte homens (em torno de 58%), com idade ao redor de 60 anos, correspondendo a 400 000 pacientes por ano (Sogayar et al., 2008). Um estudo observacional multicêntrico, realizado em pacientes sépticos de 21 UTIs de hospitais públicos e privados do Brasil, no período

de outubro de 2003 a março de 2004, estimou uma média de custo de US\$ 9632 por internação, com um custo médio diário de US\$ 934 por paciente (Sogayar et al., 2008). É interessante notar que, nesse estudo, pacientes que não sobrevivem ao evento séptico consomem significativamente mais recursos diariamente e na totalização de sua internação do que pacientes que sobrevivem, ainda que estas durem significativamente menos. A análise conjunta destes dados nos dá a dimensão dos enormes custos sociais e econômicos que a sepse representa, em vidas perdidas, em perda de capacidade produtiva e em dispêndio direto.

Qualquer microorganismo pode causar sepse (bactéria, vírus, fungos ou protozoários), porém as bactérias são os agentes etiológicos mais comuns (O'Brien et al., 2007). Em 20 a 30% dos pacientes, um sítio de infecção não é determinado e mesmo quando um local é fortemente suspeito, as culturas se demonstram, não raro, estéreis e os resultados dos estudos microbiológicos, questionáveis (Nguyen et al., 2006; O'Brien et al., 2007). Infecções respiratórias e intra-abdominais são os locais mais comuns de infecção (Sessler e Shepherd, 2002; O'Brien et al., 2007). Até o presente momento, além do uso de agentes antimicrobianos e do suporte inespecífico da vida, através do uso, por exemplo, de drogas vasoativas, ventilação mecânica e métodos dialíticos, pouco mais pode ser feito.

1.2 Fisiopatologia da sepse

Quando a invasão microbiana ocorre, a primeira linha de defesa do hospedeiro é realizada pela imunidade inata através de uma rápida reação inflamatória mediada principalmente por monócitos, neutrófilos e células endoteliais (ECs). Uma série de

substâncias quimiotáticas para neutrófilos tais como fragmentos do complemento, IL-8, peptídeos quimiotáticos e leucotrienos aumenta o número dessas células, rapidamente, no sítio da lesão. Os neutrófilos são as células fagocíticas recrutadas mais precocemente, seguidos pelos monócitos. Componentes bacterianos estimulam diretamente o aumento na expressão de moléculas de adesão no endotélio contribuindo para o recrutamento de leucócitos (Vasselon e Detemers, 2002). Integrinas participam regulando o tráfego de leucócitos. Adicionalmente a esta rápida resposta um tanto inespecífica, ocorre estímulo, ainda, para a síntese e liberação de citocinas consideradas pró-inflamatórias, como o TNF- α e IL-1 (Vasselon e Detmers, 2002; O'Brien et al., 2007). Estas citocinas estimulam a liberação de outros mediadores inflamatórios como espécies reativas de oxigênio ("reactive oxygen species"- ROS), óxido nítrico (NO), metabólitos do ácido araquidônico (prostaglandinas, leucotrienos e fator ativador de plaquetas (PAF)), peptídeos vasoativos (bradicinina, angiotensina, peptídeo intestinal vasoativo), uma variedade de produtos derivados do complemento, assim como outras citocinas (por exemplo, IL-6) que amplificam a resposta à infecção (Nguyen et al., 2006). Alterações endoteliais, por fim, induzidas pelos mediadores inflamatórios, promovem a expressão de moléculas que favorecem um estado pró-coagulante, o qual pode ter um papel na contenção local do patógeno no sítio da infecção.

Uma intrincada rede de mediadores pró e anti-inflamatórios regula a produção e liberação de citocinas ao longo do tempo, procurando manter a resposta inflamatória sob controle. É um sistema delicado de equilíbrio, que deve ser ao mesmo tempo letal e efetivo contra agentes patogênicos, sem promover dano colateral excessivo ao organismo invadido. Em alguns pacientes, entretanto, esse equilíbrio, por razões

ainda não bem esclarecidas não se estabelece e, neste estágio o controle é perdido, ocorrendo uma intensa reação inflamatória. As consequências da disseminação da inflamação inicialmente local são alterações e lesões orgânicas distantes do sítio infeccioso original: vasodilatação disseminada, depressão miocárdica, conseqüente perda das condições hemodinâmicas adequadas, coagulação intravascular disseminada e lesão isquêmica de múltiplos órgãos, enfim, o quadro conhecido como sepse grave e choque séptico (Figura 1) (Bone, 1991; Pinsky et al., 1993; Dembic, 2000).

Figura 1. SIRS e CARS na sepse. A resposta inflamatória do hospedeiro pode ser vista como um balanço entre mediadores inflamatórios (referidos como resposta inflamatória sistêmica (SIRS) e mediadores anti-inflamatórios (referidos como resposta anti-inflamatória compensatória (CARS)). Mediadores pró-SIRS como TNF α , interleucina -1 (IL-1), IL-6 e IL-12 ativam o sistema imunoinflamatório do hospedeiro, que pode então ser inativado através da expressão de mediadores ditos anti-inflamatórios ou pró-CARS, incluindo o receptor agonista da IL-1 (IL-1ra), bem como as interleucinas IL-4, IL-10 e IL-13. Durante o desenvolvimento do choque séptico, a expressão regulada de mediadores de SIRS e CARS é perdida, resultando numa resposta inflamatória exagerada e disfuncional. TGF β , fator de crescimento e transformação-beta, TNF α , fator de necrose tumoral-alfa. Adaptado de Buras et al., 2005.

1.2.1 LPS e inflamação

Os mecanismos que controlam a ativação antígeno-específica do sistema imune começaram, recentemente, a ser melhor compreendidos. Os mecanismos de reconhecimento específico, componentes da resposta inata, têm sido caracterizados como uma via de controle da imunidade adquirida. Esses mecanismos são deflagrados por receptores de membrana celular, que, por sua vez, são ativados por moléculas comuns a diversos antígenos, porém não produzidos pelo hospedeiro, e que têm sido designados na literatura como PAMP's ("pathogen-associated molecular patterns" – padrões moleculares associados a patógenos) (Cinel e Dellinger, 2007). Entre eles, são conhecidos o lipopolissacarídeo (LPS), o ácido lipoteicóico (presente na membrana de bactérias gram positivas), peptidoglicanos, fragmentos de DNA bacteriano, fragmentos de DNA e/ou RNA viral, flagelina, zimosan, taxol, etc. Diversos receptores foram nos últimos anos encontrados, capazes de reconhecer essas moléculas e ativar, assim, a resposta inata. A família mais bem estudada é a dos receptores "Toll-like" (TLR) (Triantafilou M e Triantafilou K, 2002).

TLRs são proteínas transmembrânicas, compondo, de acordo com as mais recentes evidências, uma família de 11 receptores em humanos e 13 em camundongos (Hurst e von Landenberg, 2008), com seqüências ricas em leucina na sua porção extracelular, assim como uma porção citoplasmática que é homóloga à do receptor de IL-1, sendo, assim, capaz de desencadear sinalização intracelular (Sandor e Buc, 2005a,b). São expressas em células do sistema imune tais como macrófagos (Hornung et al., 2002), neutrófilos (Hayashi et al., 2003), eosinófilos (Nagase et al.,

2003), basófilos (Sabroe et al., 2002), mastócitos (Sandor e Buc, 2005a,b) células dendríticas (DCs) (Jarrossay et al., 2001), células B (Hornung et al., 2002), células Natural Killer (NK) (Schröder e Bowie, 2005) e em muitos outros tipos celulares incluindo ECs (Satta et al., 2008), adipócitos (Kanczkowski et al., 2008), miócitos (de Kleijn e Pasterkamp, 2003) e plaquetas (Shiraki et al., 2004).

LPS é um componente da membrana celular de bactérias gram-negativas. No plasma, o LPS se une a uma proteína carreadora denominada LBP (“LPS binding protein”) e, na membrana celular, se liga ao receptor CD14, em células mielóides. Entretanto, devido à presença no soro de CD14 solúvel, células que não expressam CD14 também podem responder ao LPS, tais como ECs e epiteliais. CD14 não ativa, entretanto, sinalização intracelular, necessitando se acoplar ao TLR4, o qual tem uma longa porção intracelular. MD-2 foi identificada como uma molécula que se associa com a porção extracelular do TLR4 e aumenta a responsividade ao LPS. Outra proteína de superfície celular, RP105, também está envolvida no reconhecimento do LPS. RP105 é expressa, preferencialmente, em linfócitos B e associa-se, funcionalmente, ao TLR4 para o reconhecimento do LPS. Portanto, diversos componentes estão implicados no reconhecimento de LPS, indicando que esse receptor funcional forma um grande complexo (Triantafilou M e Triantafilou K, 2002; Takeda et al., 2003; Miyake, 2004).

Após o reconhecimento do LPS, TLR4 é capaz de ativar vias de sinalização distintas que envolvem diferentes cofatores e moléculas adaptadoras e culmina na ativação de diferentes fatores de transcrição que intermedeiam diversas respostas imunes (Figura 2) (Kawai e Akira, 2006; Gay e Gangloff, 2007). A ativação do fator de transcrição nuclear kappa B (NF- κ B) resulta na transcrição de genes codificadores

de citocinas e quimiocinas, além de induzir a expressão de diversas outras proteínas relacionadas a estresse (Macdonald et al., 2003; Victor et al., 2004). Outro fator de transcrição gênica associado a respostas inflamatórias e de reparos é ativado, o AP-1. O fator 5 de regulação do interferon (IRF5) também é ativado (Akira et al., 2001 ; Liew et al., 2005) e é essencial para a indução de uma série de genes pró-inflamatórios, incluindo IL-6, IL-12 e TNF, mas não interferon (IFN) (O'Neill e Bowie, 2007). Por fim, a ativação do fator 3 de regulação do interferon (IRF3), induz produção de interferon e moléculas co-estimulatórias (Frantz et al., 2007).

Figura 2. Vias de sinalização do receptor Toll-like. LPS entregue pelo CD14 ao TLR4/MD-2 inicia uma cascata de sinalização através do domínio TIR e das moléculas adaptadoras MyD88, TIRAP, TRIF e TRAM, que podem ativar algum dos fatores de transcrição NFκB, IRF5, AP1 e/ou IRF3. AP1, proteína ativadora 1; IκB, inibidor do fator nuclear κB; IKKα, quinase α do IκB; IKKβ, quinase β do IκB; IKKγ, quinase γ do IκB; IRAK1, quinase 1 associada ao receptor de IL-1; IRAK4, quinase 4 associada ao receptor de IL-1; IRF3, fator 3 regulatório do interferon; IRF5, fator 5 regulatório do interferon; JNK, quinase c-jun N-terminal; LPS, lipopolissacarídeo; MyD88, proteína de resposta primária a diferenciação mielóide; NFκB, fator nuclear κB; RIP1, proteína 1 de interação com o receptor; TAB1, proteína 1 de ligação à TAK-1; TAB2-3, proteínas 2 e 3 de ligação à TAK-1; TAK1 (M3K7), quinase 1 ativada pelo fator de crescimento e transformação β; TBK1, proteína serina-treonina quinase; TIRAP, proteína adaptadora contendo domínio TIR; TLR4, receptor Toll-like 4; TRAF6, fator 6 associado ao receptor do fator de necrose tumoral; TRAM, molécula adaptadora relacionada à TRIF; TRIF, adaptador contendo domínio TIR indutor de interferon β; Ub, ubiquitina; UB2V1, variante 1 da enzima E2 conjugada a ubiquitina; UBE2N, enzima E2N conjugada à ubiquitina. Adaptado de Frantz et al., 2007.

A transcrição induzida pelo fator AP-1 é tipicamente realizada pelas proteínas c-Fos e c-Jun e está implicada em linfócitos, por exemplo, na expressão do gene IL-2 e outros genes imunologicamente relevantes. Muitos estímulos diferentes, relacionados ao estresse oxidativo, por exemplo, baixas concentrações de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), luz ultravioleta (UV), radiação γ e IL-1 levam a ativação de AP-1. Os RNAs mensageiros (mRNAs) de c-FOS e c-Jun são induzidos por pequenas quantidades de H_2O_2 , superóxido (O_2^-) e NO (Wulf, 2002).

Sabe-se que NF- κ B regula a transcrição de mais de 150 genes, particularmente os relacionados a atividade pró-inflamatória, tais como IL-1 β e TNF- α , moléculas de adesão, NO sintase (NOS) e componentes do complemento (Gullo et al., 2005; Cinel e Dellinger, 2007; O' Brien et al., 2007). Dessa forma, o NF- κ B é um participante central na modulação da expressão de muitos mediadores imunoregulatórios envolvidos na sepse. Adicionalmente, NF- κ B responde diretamente ao estresse oxidativo em células eucariotas (Macdonald et al., 2003; Vitor et al., 2004), podendo ser ativado por concentrações micromolares de H_2O_2 (Wulf, 2002).

Assim, ROS, amplificam a resposta imune ao estimular fatores de transcrição responsáveis pela expressão de citocinas inflamatórias.

O TNF- α é produzido por monócitos, macrófagos, neutrófilos, ECs, células NK e linfócitos T, sendo a primeira citocina liberada em resposta a injeção de endotoxina por monócitos e macrófagos (Beutler e Cerami, 1989) atingindo níveis séricos máximos 1 a 2 horas após sua infusão (Blackwell e Christman, 1996; Wen-Jye e Wen-Chen, 2005). Outros estímulos provocam sua liberação: o próprio TNF- α num ciclo de realimentação positiva, IL-1, IL-6, IL-12, interferon- γ (IFN- γ), PAF e C5a (componente do sistema complemento) (Cerami, 1992). Por outro lado, IL-4, IL-10,

IL-13, TGF- β , corticoesteróides e substâncias que aumentam o AMP cíclico intracelular, tais como a prostaglandina E2, inibidores da fosfodiesterase e agonistas β 2 adrenérgicos são estímulos inibitórios (Hehlhans e Pfeffer, 2005). Por sua vez, TNF- α induz a liberação de IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, PAF, eicosanóides, antagonista do receptor de IL-1 e receptor de TNF solúvel (Dinarello, 1997). A vasta maioria dos ligantes da família TNF é expressa por células do sistema imune tais como, células B, células T, NK, monócitos e células dendríticas. No entanto, os receptores da família TNF também são expressos por células não imunes, dentre elas, as plaquetas (Danese, 2005). TNF- α é um potente ativador de macrófagos e neutrófilos e induz as ECs à proliferação, à produção de IL-1 e exposição de moléculas de adesão. Adicionalmente, quando infundido em modelos animais leva a hipotensão, aumento da permeabilidade vascular, acúmulo de neutrófilos nos pulmões, anorexia, diminuição do fluxo sanguíneo esplâncnico, dano à mucosa intestinal, hiperglicemia, alterações no perfil lipídico, acidose, estado de hipercoagulabilidade e, por ação direta no hipotálamo, hiperpirexia (Bellomo, 1992; Dinarello, 1997).

1.3 Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio na sepse

Sepse leva a ativação de diversos tipos celulares, como os macrófagos, neutrófilos, ECs e epiteliais. Essa seqüência de eventos pode desencadear também a liberação de ROS. Tal como os mediadores inflamatórios clássicos, ROS são importantes para o controle dos patógenos, mas podem gerar lesão em órgãos distantes do foco inicial e mesmo morte.

Essencial à sobrevivência dos organismos aeróbicos, o oxigênio molecular (O_2) serve comoceptor final dos elétrons transportados pelo complexo nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH) desidrogenase mitocondrial durante o processo de fosforilação oxidativa para geração de adenosina trifosfato (ATP). Na situação ideal o O_2 recebe quatro elétrons do complexo enzimático citocromo *c* oxidase, originando água. O oxigênio, por ter a particularidade de ser uma molécula com dois elétrons desemparelhados e de spins iguais em sua última camada, para ser reduzido necessita receber seus elétrons um a um. Dessa forma, metabólitos parcialmente reduzidos e altamente reativos, freqüentemente referidos como ROS, podem ser formados durante esse processo (Figura 3) (Thannickal e Fanburg, 2000).

Estima-se que 95 a 98% do oxigênio total consumido pelas células sofra redução completa na mitocôndria, neutralizando a reatividade dos metabólitos intermediários com a entrada dos quatro elétrons. Entretanto, uma pequena fração desse oxigênio (2 a 5%) é reduzida univalentemente, dando início à formação de ROS (Magder, 2006; Orrenius, 2007) tornando tais espécies químicas altamente reativas e potencialmente tóxicas.

Figura 3. Redução tretravalente do oxigênio molecular (O_2) na mitocôndria até formação de água (H_2O). Várias espécies reativas de O_2 são formadas no processo. e^- , elétron. Adaptado de Cohen, 1989.

Existe uma infinidade de reações possíveis subsequentes à formação das ROS pela redução parcial do oxigênio. Abaixo, a título de ilustração, expomos algumas dessas reações e algumas de suas implicações.

Superóxido (daqui a diante representado pela sigla $O_2^{\cdot -}$) pode ser formado tanto ao acaso na cadeia oxidativa quanto por via enzimática. Classificamente, considera-se a maior fonte de superóxido o complexo nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidase de fagócitos profissionais (Babior, 1999). O radical superóxido formado pode servir como matéria prima para a geração de uma ampla variedade de outras espécies reativas. Na presença de isoformas da enzima superóxido dismutase (SOD), abundante em praticamente todos compartimentos

celulares e orgânicos, o O_2^- pode ser convertido a H_2O_2 (Equação 1) (Fialkow, 2007).

O excesso de H_2O_2 é normalmente convertido inofensivamente à água pela ação da catalase (Equação 2), glutational peroxidase e outras peroxidases (Gutteridge e Mitchell, 1999). No entanto, na ausência destas enzimas ou na baixa eficiência dessa reação, parte do H_2O_2 pode ser liberado para a célula.

Na ausência de íons de metais de transição, H_2O_2 é razoavelmente estável. No entanto, na presença destes, H_2O_2 pode formar o radical $OH^\bullet$. Em nosso organismo, os metais de transição mais importantes para a ocorrência dessa reação são, cobre (Cu^{+2}) e ferro (Fe^{+2}) (Mackdonald et al., 2003). A reação do Fe^{+2} com o H_2O_2 (reação de Fenton) (Fenton, 1894) pode ser representada de maneira simplificada na Equação 3.

O radical $OH^\bullet$ também pode ser formado pela reação do O_2^- com H_2O_2 na presença de íons Cu^{2+} ou Fe^{2+} , na chamada reação de Haber-Weiss (Reação 4) (Haber e Weiss, 1934).

H_2O_2 permite, ainda, que os neutrófilos oxidem íons cloreto, através da enzima mieloperoxidase, em ácido hipocloroso (Equação 5) que, por sua vez, se dissocia em íon hipoclorito, (Equação 6), um potente microbicida, promovendo, assim, atividade citotóxica adicional (Macdonald et al., 2003).

Graças a sua reatividade, ROS têm o potencial de se combinar avidamente com diferentes componentes celulares, sejam eles ácidos nucleicos, lipídios, proteínas ou carboidratos e, assim, alterá-los. Intuitivamente, portanto, ROS geradas fora de estrito controle podem levar a lesão celular. Com o intuito de controlar e dirigir a reatividade das ROS, durante o processo evolutivo células desenvolveram mecanismos específicos para dirigir modificações das ROS a espécies mais estáveis. Há sistemas enzimáticos como a SOD, que catalisa a dismutação do radical O_2^- à espécie menos reativa H_2O_2 , ou a catalase, que reduz H_2O_2 a água, descritas anteriormente, ou há ainda sistemas seqüestradores como o ascorbato (vitamina C), e o α -tocoferol (vitamina E), que ao se combinarem com ROS promovem seu “clearance” (Mackdonald 2003; Victor, 2004).

Das diversas fontes de ROS existentes no tecido vascular, duas merecem maior atenção pela sua importância demonstrada em estudos nas últimas 2 décadas, as NADPH oxidases e as NO Sintases (Cai e Harrison, 2000; Griendling et al., 2000; Li e Shah, 2004; Rhay e Shah, 2005).

1.3.1 NADPH oxidases

As NADPH oxidases são um grupo de enzimas associadas à membrana plasmática encontradas numa variedade de células de origem mesodérmica. A enzima estudada mais minuciosamente é a NADPH oxidase dos leucócitos, que é encontrada em fagócitos profissionais e linfócitos B (Babior, 1999).

As NADPH oxidases catalizam a produção de O_2^- pela redução de um elétron do oxigênio, usando NADPH como doador de elétron:

Esse sistema é responsável pelo “burst” respiratório dos neutrófilos. Esse termo descreve o fenômeno no qual, durante a fagocitose de microorganismos, células fagocíticas demonstram um aumento explosivo (daí o termo burst, explosão) no consumo de oxigênio, acompanhado da rápida geração em elevado fluxo (mmol/l/s) de radical superóxido atingindo concentrações de equilíbrio em torno de 5 microM por causa da rápida taxa de dismutação sob as condições locais (Hampton et al.; 1996, Hampton et al., 1998; Segal 2005). Em combinação com a mieloperoxidase esse sistema parece representar a primeira e mais importante linha de defesa dos neutrófilos contra os patógenos ambientais.

Desde os primeiros achados sugerindo a existência de tal enzima em neutrófilos, no início da década de 1970, tem-se aprendido muito sobre a oxidase leucocitária. Pesquisas mostram que a enzima compreende cinco componentes: $p40^{phox}$ (phox de “phagocyte oxidase”-oxidase fagocítica), $p47^{phox}$, $p67^{phox}$, $p22^{phox}$ e $gp91^{phox}$ (subunidade catalítica). Na célula em repouso, três dos cinco componentes, $p40^{phox}$, $p47^{phox}$ e $p67^{phox}$, existem no citosol como um complexo. Os outros dois componentes, $p22^{phox}$ e $gp91^{phox}$, são encontrados na membrana, onde eles ocorrem como uma flavo-hemoproteína heterodimérica conhecida como citocromo b_{558} . A separação desses dois grupos de componentes pela distribuição em compartimentos subcelulares distintos garante que a oxidase é inativa na célula em repouso (Babior, 1999; Li and Shah, 2004; Ray e Shah, 2005).

Quando a célula em repouso é exposta a uma ampla variedade de estímulos, o componente citosólico $p47^{\text{phox}}$ é fosforilado e o complexo citosólico inteiro migra para a membrana, onde ele se associa com o citocromo b_{558} para montar a oxidase ativa (Figura 4). A oxidase montada é, então, capaz de transferir elétrons do substrato para o oxigênio. A ativação requer a participação, não somente das subunidades, mas de duas proteínas de baixo peso molecular ligadas ao nucleotídeo guanina: Rac2, que na célula em repouso está localizada no citoplasma, e Rap1A, que está localizada nas membranas. Durante a ativação, Rac2 liga-se a guanosina trifosfato (GTP) e migra para a membrana junto com o complexo citosólico (Babior, 1999; Li and Shah, 2004).

Figura 4. Ativação da NADPH oxidase leucocitária. Nas células em repouso, as subunidades da oxidase são distribuídas entre o citosol ($p40^{\text{phox}}$, $p47^{\text{phox}}$, $p67^{\text{phox}}$ e Rac2) e as membranas (Rap1A e citocromo b_{558} , um complexo de $p22^{\text{phox}}$ e $gp91^{\text{phox}}$). Rac2 e Rap1A são proteínas de baixo peso molecular ligadas ao nucleotídeo guanina que participam de outros processos além da ativação da oxidase. As outras cinco proteínas são exclusivas da NADPH oxidase. Quando a célula é ativada, $p47^{\text{phox}}$ é fosforilado e as subunidades citosólicas migram para a membrana, onde elas se ligam ao citocromo b_{558} para montar a oxidase ativa. Adaptado de Babior, 1999.

NADPH oxidases também são expressas em células não-fagocíticas. Nessas células a enzima produz ROS de uma forma regulada e em taxas menores do que os fagócitos. As NADPH oxidases vasculares parecem ser essenciais na resposta fisiológica das células vasculares, incluindo vasomotricidade em resposta ao fluxo (Laurindo et al., 1994), crescimento, migração e modificação da matriz extracelular (Griendling et al., 2000; Chlopicki, 2004). Elas também estão ligadas à hipertensão e a estados patológicos associados com crescimento vascular descontrolado e inflamação, como a arterosclerose e vasculopatia diabética. (Griendling et al., 2000).

As NADPH oxidases vasculares dividem algumas, mas não todas as características da enzima neutrofílica. As cardiovasculares são enzimas de baixa produção e liberação lenta. Estimativas da produção de O_2^- na célula vascular sugere que a capacidade dessas enzimas é cerca de 1/3 da neutrofílica. Além disso, a enzima vascular parece ter uma atividade constitutiva moderada que está ausente nos fagócitos. As cinéticas da ativação sob estimulação celular também são únicas; O_2^- é produzido em minutos a horas nas ECs, células musculares lisas vasculares (VSMCs) e fibroblastos em contraste com a liberação quase instantânea vista nos neutrófilos (Griendling et al., 2000; Chlopicki et al., 2004).

Muitos esforços têm sido direcionados para identificar quais subunidades da enzima estão presentes nas células cardiovasculares. Usando técnicas moleculares, RNA mensageiro para gp91^{phox}, p22^{phox}, p47^{phox}, p67^{phox} foi demonstrado em ECs e células adventícias. VSMCs e células mesangiais parecem expressar p22^{phox}, p47^{phox}, mas não gp91^{phox}. O fato de algumas células não-fagocíticas expressarem p22^{phox} na ausência de gp91^{phox} introduziu a idéia de que poderia existir isoformas da gp91^{phox} que carregam uma função semelhante nessas células (Griendling et al., 2000). Com a

recente expansão da informação disponível no genoma, muitos homólogos da subunidade gp91^{phox} em células não-fagocíticas foram identificados e eles constituem, atualmente, a família NOX (família das NADPH oxidases). A família NOX tem, atualmente, sete membros: NOX1 à NOX5; DUOX1 e DUOX2 que funcionam numa variedade de tecidos (Lambeth, 2002; Krause, 2004; Donkó et al., 2005).

1.3.2 NO sintases (NOS)

As NOS catalizam a biossíntese do NO num processo que envolve a oxidação do aminoácido L-arginina através da redução do O₂ molecular (Figura 5), gerando L-citrulina além do NO. A reação requer o aminoácido L-arginina, oxigênio molecular e NADPH como substratos e tetrahydrobiopterina (BH₄), flavina adenina dinucleotídeo (FAD), flavina mononucleotídeo (FMN) e heme como cofatores (Geller, 1998). A síntese enzimática de citrulina pode ser inibida por análogos da L-arginina tais como N^G-monometil-L-arginina (L-NMMA), N^G-nitro-L-arginina (L-NNA) e N^G-nitro-L-arginina-metil-éster (L-NAME). Estes inibidores têm grande importância na pesquisa dos prováveis efeitos do NO nos tecidos, uma vez que a substituição do substrato habitual (L-arginina) pelos análogos irá inibir a produção de NO e seus efeitos conseqüentes. Vale salientar que a D-arginina não substitui a L-arginina nesta reação para formação do NO (Geller, 1998; Andrew e Mayer, 1999).

Figura 5. Reação catalisada pela NO sintase. A figura indica a clássica reação química de formação do NO, em que a L-arginina é transformada em um intermediário, a N^G-hidroxi-L-arginina com a presença de NADPH sendo necessário mais NADPH e O₂ para a formação de L-citrulina e NO. NADPH, nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato. Adaptado de Andrew e Mayer, 1999.

A NOS contém dois domínios funcionais distintos. Um N-terminal oxigenase, onde se ligam o cofator BH₄, a L-arginina e o grupo heme e o C-terminal redutase com sítios de ligação para NADPH e flavinas, entre outros (Figura 6). Durante a síntese de NO, a NOS recebe e estoca elétrons para transformar os co-substratos O₂ e L-arginina em NO e L-citrulina. Os elétrons são doados pela NADPH no domínio redutase e são subsequentemente doados para o grupo heme no domínio oxigenase, resultando na formação dos produtos citrulina e NO (Govers e Rabelink, 2001).

Sob certas condições, NOS pode gerar ao invés de NO, o radical O₂⁻, um processo conhecido como desacoplamento da NOS. A ausência do co-fator BH₄ parece ser o principal responsável pelo desacoplamento da NOS endotelial (eNOS), no entanto, seu exato papel no controle da atividade catalítica não é completamente entendido e ainda controverso. Apesar disso, a enzima ainda é capaz de receber e

estocar elétrons em seu domínio redutase, doando-os um a um ao seu substrato O_2 . Conseqüentemente, em seu estado desacoplado, a NOS gera superóxido ao invés de NO (Govers e Rabelink, 2000; Li and Shah, 2004; Bevers et al., 2006; Sullivan e Pollock, 2006).

Figura 6. Esquema da estrutura da NOS. Estão indicados as extremidades amina NH_2 (N) e carboxila $COOH$ (C), as regiões envolvidas na ligação dos substratos e co-fatores, os domínios oxigenase e redutase e a direção intramolecular do fluxo dos elétrons. Arg, arginina; BH_4 , tetrahidrobiopterina; CaM, calmodulina; FAD, flavina adenina dinucleotídeo; FMN, flavina mononucleotídeo; NADPH, nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato; Zn, zinco. Adaptado de Govers e Rabelink, 2001.

Há três principais isoformas da enzima NOS que diferem na sua dependência de íons cálcio (Ca^{2+}), assim como, na sua expressão e atividade. Duas das enzimas NOS sintetizam NO de maneira dependente de cálcio e estão presentes constitutivamente sendo comumente referidas como NOS constitutivas (cNOS). Uma das enzimas cNOS foi localizada primeiramente em neurônios (nNOS ou NOS-I) e a outra identificada inicialmente em ECs (eNOS ou NOS-III). Em baixos níveis NO gerado por uma cNOS atua como uma molécula mensageira ativando a guanilato ciclase, levando a um aumento na concentração intracelular da guanosina-3',5' monofosfato cíclica (cGMP). eNOS desenvolve um papel central na regulação do tônus vascular. NOS neuronal atua como um neurotransmissor também via ativação da guanilato

ciclase com importantes funções no sistema nervoso central incluindo um papel na formação da memória. As duas enzimas cNOS contrastam com a terceira isoforma, NOS induzível (iNOS ou NOS-II), que não é expressa tipicamente nas células em repouso e precisa ser induzida por certas citocinas, LPS e outros agentes inflamatórios, cuja atividade é independente de Ca^{2+} . A expressão de iNOS após estimulação com citocina e/ou LPS foi descrita em muitos tipos celulares, tais como ECs e imunes (Geller, 1998; Andrew e Mayer, 1999; Fialkow et al., 2007). A grande quantidade de NO produzido pelos macrófagos tem importante função microbicida. No sistema imune, NO reduz a adesão dos neutrófilos e a ativação dos linfócitos.

Embora o NO seja geralmente considerado uma molécula sinalizadora e capaz de ativar a guanilato ciclase, é importante considerar outros efeitos fisiológicos *in vivo*. NO pode se difundir a partir do local de sua geração e reagir com diversas outras biomoléculas. Muitos dos seus efeitos tóxicos já relatados são provavelmente mediados por seus produtos de oxidação e não por ele próprio. NO pode ser convertido em muitos outros derivados mais reativos, conhecidos coletivamente como espécies reativas de nitrogênio (RNS). Em altas concentrações, NO reage diretamente com oxigênio para produzir NO_2 , que rapidamente reage com outro NO para formar N_2O_3 . NO_2 pode oxidar ou nitrar (adicionar um grupo NO_2^+) uma variedade de moléculas (incluindo tirosina), enquanto N_2O_3 pode nitrosar/nitrosilar (adicionar grupo NO^+) grupos aminas ou tióis (SH). NO reage com O_2^- para produzir peroxinitrito (ONOO^-), um potente oxidante, que pode oxidar/nitrar outras moléculas ou decair e produzir outras espécies também altamente reativas (possivelmente o radical $\text{OH}^\bullet$ e NO_2). NO pode indiretamente (possivelmente via N_2O_3) nitrosar tióis (resíduos de cisteínas em cadeias peptídicas, por exemplo) originando S-nitrosotióis

(SNO) (por exemplo, S-nitroso-glutationa e S-nitroso albumina (Brown e Borutaite, 2002).

Proteínas S- nitrosadas podem ter suas funções alteradas (Brown e Borutaite, 2002; Ottaviano et al., 2008). Quando grupos SH presentes nas proteínas são nitrosados, a formação de SNO pode resultar em significativa modificação estrutural. Tal alteração pode, então, levar a conseqüente ganho, perda ou modificação da função da respectiva proteína. Desse modo, entendemos como RNS podem agir patologicamente alterando biomoléculas, e também como parte de mecanismo de sinalização celular, modulando a atividade enzimática.

1.3.3 Sinalização redox

Sinalização redox pode ser definida como a transdução de sinais intra ou intercelulares mediada por reações de transferência de elétrons envolvendo intermediários como ROS/RNS, equivalentes redutores (p.ex., o íon H^+) e metais de transição. Estes intermediários interagem com alvos celulares efetores específicos sensíveis à mudança redox, bem como com moléculas ou enzimas antioxidantes (Fedoroff, 2006).

Estudos demonstram que, ROS/RNS podem ativar várias cascatas de sinalização (Figura 7), como a ativação de MAPK (Erk1/2, p38, Jnk), ativação de fatores de transcrição (NF-kB, AP-1, p53), metaloproteinases de matriz e inativação de fosfatases específicas regulando, dessa forma, função de células e sistemas, como o vascular (Wulf, 2002; Fialkow, 2007; Valko et al., 2007).

Figura 7. Sumário de algumas vias de sinalização envolvendo geração de ROS pelas NADPH oxidases vasculares. Múltiplos agonistas vasoativos e forças hemodinâmicas ativam NADPH oxidase por vias de sinalização que incluem rac/ras, metabólitos do ácido aracdônico e ceramida. Produção de O_2^- e seu metabólito H_2O_2 , leva à ativação de quinases redox-sensíveis e potencialmente à inativação de fosfatases específicas para modular a expressão gênica. O impacto biológico da ativação da NADPH oxidase envolve adesão e migração de monócitos/macrófagos, hipertrofia das células musculares lisas vasculares (VSMCs), proliferação e sobrevivência dos diferentes tipos de células vasculares, apoptose, inflamação e remodelamento da matriz extracelular. H_2O_2 , peróxido de hidrogênio; IL-1, interleucina-1; JNK, quinase c-Jun NH2-terminal; MAPK, proteínas quinases ativadas por mitógenos; O_2^- , superóxido; PAF, fator ativador de plaquetas; PDGF, fator de crescimento derivado da plaqueta; PKC, proteína quinase C; PMA, acetato de forbol miristato; PP2B, proteína fosfatase 2B; PTP1B, proteína tirosina fosfatase 1B; TGF- β , fator de crescimento e transformação-beta; TNF- α , fator de necrose tumoral- α . Adaptado de Griendling, 2000.

Apenas mais recentemente começou-se a discutir a maneira pela qual ROS e RNS poderiam ativar tais vias de sinalização, com a demonstração de que seriam capazes de modificar a estrutura e função de proteínas de maneira seletiva e específica. Assim, pôde-se começar a entender como ocorrem, em nível molecular, a regulação da transdução de sinal e expressão gênica. Nesse sentido, dados obtidos de estudos estruturais revelaram que resíduos de cisteína presentes nas proteínas têm papel amplo e fundamental na maneira como proteínas respondem à ação de ROS e RNS (Buttner e Paget, 2003). A principal característica deste resíduo aminoácido é a presença do grupo tiol, que pode encontrar-se alternadamente e de maneira reversível entre o estado reduzido (CysS-H) ou oxidado (como dissulfeto CysS-S, como S-nitrosotiol CysS-NO, como sulfenamida CysS-NH-R, ou ácido sulfênico CysS-OH), funcionando como um “redox-sensitive-switch” (Jaffrey et al., 2001; Barford, 2004; Mannick e Schonhoff, 2004). A alternância do estado redox desses grupos pode ser convertida em modificação estrutural e, portanto, funcional da proteína (Figura 8).

Figura 8. Modificação oxidativa de proteínas. Formação de pontes dissulfeto intramoleculares podem alterar a atividade protéica por modificações estruturais. Para a proteína bacteriana de resposta ao estresse oxidativo - OxyR, essa modificação leva a sua ativação. A forma oxidada de OxyR se liga a região promotora de genes alvos e ativa a transcrição por contato proteína-proteína com RNA polimerase. Genes ativados por OxyR têm funções antioxidantes. SH, grupo tiol na forma reduzida; S-S, ponte dissulfeto. Adaptado de Thannickal e Fanburg, 2000.

Além disso, células possuem diversos sistemas enzimáticos como tiorredoxinas (a tiorredoxina em si, a isomerase de dissulfetos protéicos – PDI -, entre outras), glutarredoxinas e peroxirredoxinas que permitem redução de grupos tiólicos oxidados, possibilitando, portanto, o retorno do estado oxidado ao reduzido. Janiszewski et al. (2000) mostraram que a preservação de cisteínas em seu estado reduzido é essencial para a manutenção da atividade NADPH oxidase em VSMCs. Adicionalmente, demonstraram a existência de uma íntima relação espacial e

funcional entre as NADPH oxidases vasculares e a PDI, sugerindo que esta possa atuar como uma proteína regulatória da oxidase vascular (Janiszewski et al., 2005). Estudos recentes sugerem que efetivamente a PDI não só é fundamental na atividade NADPH vascular como também na atividade da NADPH oxidase fagocítica (Laurindo et al., 2008; comunicação pessoal, Professora Lúcia Rossetti Lopes).

Portanto, a existência de resíduos de cisteínas acessíveis e sensíveis à modificação redox, pode fornecer um mecanismo simples e rápido de regulação ou modificação da transdução de sinais biológicos. Entretanto, não só resíduos de cisteína representam pontos de modificação química que sujeitam proteínas e enzimas a mecanismos regulatórios (ou não) dependentes do estado redox local. Resíduos de histidina, tirosina, triptofano e metionina são possíveis alvos do radical ONOO^- (Alvarez e Radi, 2003). Como vimos, ONOO^- é formado principalmente pela reação limitada por difusão entre os radicais NO e superóxido. É um radical mais reativo que seus precursores e um potente oxidante capaz de modificar definitivamente diversos resíduos aminoácidos.

É evidente a importância fisiológica de ROS/RNS na imunidade inata e na sinalização celular. Entretanto, a produção exacerbada de ROS/RNS ou um déficit nos sistemas antioxidantes pode resultar naquilo que se define como estresse oxidativo/nitrosativo (Crimi, 2006; Mackdonald, 2003; Victor et al., 2004). Existe um aparente paradoxo, em que espécies químicas possam ser agentes de sinalização fisiológica e também patologicamente tóxicas (McCord, 2000). Estresse oxidativo pode ser visto, de maneira ampla, como um desequilíbrio entre geração dessas espécies químicas altamente reativas e a atividade dos respectivos sistemas de contenção. Dessa maneira ou a capacidade de prevenir a lesão celular mediada pelas

ROS fica comprometida ou a sinalização celular/tecidual decorrente da geração de ROS transcorre fora da normalidade. Esse aparente paradoxo entre toxicidade e sinalização, pode derivar primeiramente do falso conceito de que reatividade seja sinônimo de toxicidade (Maccord, 2000). O ânion cianeto, por exemplo, não é particularmente reativo, mas é significativamente tóxico, pois bloqueia a transferência de elétrons num ponto crucial da fosforilação oxidativa, o complexo citocromo c oxidase. Em segundo lugar, o paradoxo pode derivar de um problema relacionado a concentrações: por exemplo, o radical livre NO gerado em baixas concentrações pela eNOS induz vasodilatação dependente do endotélio, mas produzido em taxas elevadas por macrófagos pela iNOS é um poderoso microbicida (Nathan, 1992). Da mesma maneira, a NADPH oxidase fagocítica gera grandes quantidades de superóxido quando leucócitos são ativados, mas evidências apontam na direção de oxidases de membrana de células vasculares análogas às primeiras, mas com produção sutil de superóxido e com função sinalizadora nos vasos (Babior, 1999; Griendling et al, 2000). Um terceiro conceito é o da compartimentalização. Espécies reativas podem apresentar funções definidas dentro de compartimentos celulares, mas sua geração em microambiente inadequado, pode causar transtornos ou ser lesiva. Exemplo disso é a geração de NO limitada aos "lipid-rafts" na membrana celular endotelial com função sinalizadora local, comparada à geração "exagerada" e difusa de NO durante um processo inflamatório. Por fim, um quarto conceito envolve modificações moleculares. Oxidação irreversível da molécula alvo é comum durante o estresse oxidativo. Em contraste, sinalização redox envolve reações freqüentemente reversíveis (Forman et al., 2004). Neste contexto, em adição

à toxicidade química, é possível definir "toxicidade biológica" derivada de disfunções pontuais de vias de sinalização redox (Azevedo et al, 2000).

1.4 Disfunção endotelial na sepse

É provável que a disfunção endotelial seja um evento chave na patogênese da sepse. ECs estão entre as primeiras células do corpo que entram em contato com as moléculas do patógeno circulante e, assim, podem: 1) contribuir ativamente para o desencadeamento da resposta imunológica e 2) ao interagirem diretamente com mediadores inflamatórios em possível desequilíbrio, podem ter suas funções danificadas (Volk e Kox, 2000).

Sob estimulação por várias citocinas, incluindo IL-1, TNF- α e também sobre interação com outros mediadores, tal como complemento ativado, as funções do endotélio podem ser alteradas. Essas mudanças são conhecidas como ativação. Elas incluem mudanças no balanço hemostático; aumento da expressão de moléculas de adesão e tráfico de leucócitos; alteração do tônus vasomotor; perda da barreira funcional; aumento da produção de mediadores inflamatórios (incluindo agentes quimioatraentes) e morte celular programada (Hack e Zeerleder, 2001). Evidências indicam que a geração de espécies ROS e RNS nas ECs e no meio adjacente também exerce um papel na ativação endotelial (Alom-Ruiz, 2008).

Normalmente o endotélio possui propriedades anticoagulantes/antitrombóticas expressando, por exemplo, proteínas inibidoras do fator tecidual, trombomodulina, NO e prostaciclina. NO derivado do endotélio é secretado de maneira controlada, sob taxas baixas, inibe agregação plaquetária e diminui a expressão de moléculas pró-

inflamatórias pelo endotélio (Matsuda e Hatori, 2007). Durante a patogênese da sepse, estimuladas por $\text{TNF-}\alpha$, IL-1 e/ou endotoxina, as ECs adquirem uma função pró-coagulante e pró-trombótica, pela liberação de PAF, de tromboplastina, do inibidor do ativador do plasminogênio, além da diminuição da expressão de trombosmodulina, do NO e da prostaciclina (Hack e Zeerleder, 2001; Boos et al., 2006). O objetivo fisiológico e evolutivo dessa mudança, destinada a ocorrer localmente e não sistematicamente, seria, teoricamente, o de cercar o processo infeccioso. Entretanto, na sepse grave, o desequilíbrio entre atividades pró-coagulantes e anticoagulantes promove a coagulação intravascular por microtrombos e, conseqüentemente, condições de hipóxia no tecido, contribuindo decisivamente para a disfunção orgânica (Peters et al., 2003).

Sob condições fisiológicas, o endotélio dificilmente expressa moléculas de adesão. Sob estimulação com uma variedade de agonistas, como LPS e citocinas (TNF , $\text{IL-1}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$) isso muda dramaticamente: as células expressam P selectina, E-selectina, ICAM-1 e VCAM-1. Essas alterações resultam na adesão dos leucócitos às ECs, aumento da rolagem dos leucócitos sobre o endotélio, seguida por forte aderência e finalmente migração destes para dentro dos tecidos, tais eventos constituem os primeiros passos na inflamação crônica (Hack e Zeerleder, 2001). Estudos sugerem que a ativação da NADPH oxidase pela angiotensina II aumenta a expressão de VCAM e da proteína quimioatraente de monócitos-1 (MCP-1) em ECs (Kunsch e Medford, 1999; Alom-Ruiz, 2008).

Na sepse, o aumento de ROS como o radical O_2^- , diminui a disponibilidade de NO (Cai e Harrison, 2000; Taniyama e Griendling, 2003; Li e Shah, 2004), possivelmente pela rápida reação do radical O_2^- com NO para formar ONOO^- . Tal

redução na biodisponibilidade do NO reduz os efeitos benéficos deste, aumentando a coagulação e a expressão de moléculas de adesão (Matsuda e Hattori, 2007). O aumento da expressão de moléculas de adesão atrai monócitos, que migram para os tecidos e se tornam macrófagos, que produzem mais ROS.

O endotélio produz um número de compostos que regulam o tônus vascular e, portanto, tem uma grande influência na pressão sanguínea. Esses compostos podem ser grosseiramente divididos em vasodilatadores (NO e prostaciclina) e vasoconstritores (superóxido, endotelina, tromboxano A₂ e PAF). A produção desses agentes é modificada enormemente sobre estimulação com mediadores inflamatórios. A produção de NO pode ser regulada por dois diferentes mecanismos, dependendo do tipo de NOS que esteja primariamente ativada. Sob condições normais, ECs expressam a eNOS, gerando NO sob taxas baixas e estritamente controlada por padrão de fluxo sanguíneo e por peptídeos vasoativos, como angiotensina II. Alguns mediadores inflamatórios como bradicinina, histamina e também trombina, através da ligação a receptores específicos, podem induzir um aumento intracelular de íons cálcio e certo aumento na síntese de NO via eNOS. A liberação desses agentes “in vivo” causa uma rápida diminuição na pressão sanguínea. Por outro lado, sob estimulação com TNF- α ou IL-1, ECs passam a expressar iNOS. Essa enzima produz grandes quantidades de NO de uma maneira independente de cálcio. Muitas linhas de evidência sugerem que a hiperprodução de NO pela iNOS possa contribuir para a hipotensão, cardiodepressão e hiporreatividade vascular no choque séptico (Wort e Evans, 1999; Hack e Zeerleder, 2001; Peters et al., 2003).

Outra característica central do endotélio na sepse é o aumento da permeabilidade ou a perda da sua função de barreira, permitindo o extravasamento de fluido e conseqüente edema tecidual. ROS (como H_2O_2), e outros mediadores (trombina, histamina e $TNF-\alpha$) danificam as junções intercelulares do endotélio, comprometendo a adesão célula-célula e contribuindo, com o aumento da permeabilidade vascular (Lum e Roebuck, 2001). A redistribuição do fluido do compartimento intravascular para o extravascular pode levar a hipovolemia, hemoconcentração e estase do fluxo sanguíneo, bem como ocasionar edema em pulmões, rins e cérebro dos pacientes sépticos.

As ECs estão constantemente percebendo e respondendo a alterações no ambiente extracelular. A ativação ocorre como uma resposta adaptativa e normalmente, mecanismos locais e sistêmicos de “feedback” negativo são ativados, impedindo que a ativação endotelial atinja sítios distantes. A compartimentalização da resposta imune inata limita o dano colateral e preserva a integridade do endotélio não envolvido. Na sepse, o termo disfunção endotelial é usado quando a resposta se generaliza, escapa das checagens e balanços locais bem desenvolvidos, resultando em uma resposta inflamatória desregulada e não direcionada, representando uma desvantagem para o hospedeiro (Aird, 2003).

1.5 Apoptose de células endoteliais na sepse

Apoptose é um processo regulado homeostaticamente que normalmente ocorre em organismos saudáveis para eliminar células disfuncionais, infectadas ou excessivas. A hipótese explorada na sepse é que a ativação imune excessiva causaria

desregulação do processo apoptótico nos mais variados tecidos orgânicos, entre eles o endotélio vascular (Papathanassoglou et al., 2000).

Diversos estudos “in vitro” sugerem que uma ampla variedade de estímulos ditos sépticos induzem apoptose de ECs. Desta feita, a apoptose poderia ser mais um mecanismo importante de lesão vascular (Figura 9) (Winn e Harlan, 2005). No entanto, faltam evidências sólidas “in vivo”. Há enormes desafios na tentativa de examinar a apoptose de ECs usando modelos “in vivo”. ECs mortas se destacam muito cedo da membrana basal, entram na circulação e são rapidamente eliminadas pelos macrófagos, parte da razão pela qual tem sido difícil documentar o processo apoptótico endotelial na sepse (Hotchkiss e Karl, 2004).

Figura 9. Apoptose endotelial. Diversos estímulos podem induzir apoptose de células endoteliais. Durante o processo de apoptose, as proteínas das junções aderentes das células endoteliais são degradadas com interrupção da função de barreira exercida pelo endotélio, podendo desencadear extravasamento vascular, extravasamento de proteínas do plasma e exposição da matriz subendotelial pró-trombótica. Células endoteliais apoptóticas são pró-coagulantes e pró-adésivas. Assim, a apoptose endotelial pode ser um mecanismo importante de injúria vascular e disfunção. Fas/FasL, Fas/Fas ligante; LPS/TLR-4, lipopolisacarídeo/Receptor Toll-like-4; NF-kB, fator nuclear kB; OxLDL, lipoproteína de baixa densidade oxidada; TNF/TNFR-1, fator de necrose tumoral/receptor do fator de necrose tumoral-1. Adaptado de Winn e Harlan, 2005.

Certos patógenos são capazes de induzir apoptose de ECs “in vitro”. A incubação de ECs em cultura com LPS parece induzir apoptose em alguns, mas não em todos os estudos. Hoyt et al. (1995), Barnnerman et al. (1998) e Frey e Finlay (1998) relataram que a incubação “in vitro” de ECs bovinas e ovinas com LPS induzia apoptose. No entanto LPS falhou em induzir apoptose em ECs humanas

cultivadas (Pohlman e Harlan, 1989; Hu et al., 1998). A cascata séptica envolve outros mediadores que podem induzir apoptose endotelial, incluindo TNF- α , IL-1, IFN, ROS e hipóxia (Aird, 2003).

As alterações funcionais associadas à apoptose endotelial envolvem uma rede complexa de eventos interdependentes. Essas mudanças podem estar diretamente ligadas a algumas manifestações da sepse (Štefanec, 2000). ECs apoptóticas liberam IL-1: (1) IL-1 pode aumentar a apoptose de ECs adjacentes; (2) IL-1 ativa ECs vizinhas através da ativação de NF-kB. Enquanto a ativação de NF-kB pode proteger as ECs da apoptose em um ambiente que provavelmente é predominantemente pró-apoptótico, também leva a expressão e liberação de moléculas de adesão para as células inflamatórias e produção de citocinas inflamatórias.

A superfície das células apoptóticas exibe atividade aumentada do pró-coagulante fator tecidual, exposição aumentada de fosfatidilserina (um fosfolípide ligante e ativador de plaquetas) assim como uma expressão reduzida de trombomodulina, sulfato de heparan e do inibidor do fator tecidual, levando ao aumento da formação de trombina. Ambas, plaquetas ativadas e trombina podem aumentar a inflamação e eventos pró-apoptóticos através da ativação de leucócitos e ECs. Além disso, a perda de ECs por esse processo pode expor a matriz subendotelial trombogênica. Como as células apoptóticas se tornam pró-adesivas para plaquetas e leucócitos, elas podem promover a coagulação “in situ”, antes da fagocitose pelos macrófagos ou desprendimento, ou na circulação, uma vez desprendidas (Winn e Harlan, 2005).

Portanto, a apoptose de ECs acaba por se constituir em mais um mecanismo possível de aumento ou aceleração dos processos deletérios decorrentes da perda de controle do processo envolvido na resposta à infecção.

1.5.1 Vias da apoptose

Nas últimas duas décadas ocorreu notável progresso na compreensão de vias que regulam a apoptose. A maioria das alterações morfológicas observadas durante a apoptose é causada por uma série de proteases, conhecidas como caspases, que são ativadas especificamente em células em apoptose. Estas enzimas possuem um resíduo de cisteína no sítio ativo e clivam substratos que possuem resíduos de ácido aspártico em sequências específicas. Há duas vias principais envolvidas na ativação das caspases: uma via mediada pela caspase-8 iniciada por um receptor de morte (conhecida como via extrínseca) e uma via mediada pela caspase-9 iniciada pela mitocôndria (conhecida como via intrínseca) (Figura 10). Ambas caspase-8 ou caspase-9 podem ativar caspase-3, que é uma protease apoptótica crucial na via final comum da morte celular programada. A caspase-8 pode ser ativada por um número de ligantes, incluindo TNF e CD95L (também conhecido como FasL). O antígeno Fas (CD95), um receptor pertencente à superfamília de receptores de membrana TNF é o primeiro componente da via a receber o sinal de morte. Fas é expresso em uma variedade de tipos celulares, incluindo timócitos, células B ativas, monócitos, macrófagos, neutrófilos, assim como uma variedade de células não imunes no fígado, pulmão e coração. Quando Fas se liga ao seu ligante, FasL, ele trimeriza e cria um

“complexo de sinalização induzido pela morte” (DISC) que recruta uma proteína adaptadora conhecida como domínio de morte associado ao Fas (FADD). FADD pode recrutar pró-caspase 8 ao DISC, causando a sua ativação, que pode clivar e ativar caspase-3. A via mitocondrial mediada pela caspase-9 pode ser ativada por diversos estímulos, incluindo ROS e RNS, radiação e agentes quimioterápicos. A mitocôndria libera compostos apoptogênicos, como o citocromo *c* (cit *c*) no citosol, através da formação de poros específicos ou da ruptura da sua membrana externa (OM). Uma vez no citosol, na presença de ATP (e mais eficientemente na presença de deoxiATP, dATP) cit *c* se liga ao seu companheiro citosólico fator 1 de ativação de protease apoptótica (Apaf-1) e induz a oligomerização do complexo APAF-1-cit *c*. Esse complexo enzimático multimérico, denominado, apoptossomo, é suficiente para recrutar a pró-caspase-9 ao complexo e induzir sua ativação de pró-caspase-9. A caspase-9 ativada cliva e ativa caspase-3 (Hotchkiss et al., 2002; Jiang e Wang, 2004; Hotchkiss e Nicholson, 2006; Matsuda e Hattorri, 2007). A ativação da caspase-3 em resposta aos sinais pró-apoptóticos resulta em uma série de eventos proteolíticos, que levam a morte celular. Um evento é um efeito “feedback” sobre a mitocôndria levando a formação de mais poros na membrana. Um segundo evento é o deslocamento de caspase-3 para dentro do núcleo, resultando na quebra do DNA.

O entendimento da via particular da apoptose induzida pela sepse é importante porque pode fornecer pistas dos prováveis fatores responsáveis especificamente pelo início do suicídio celular e pode fomentar o desenvolvimento de mais um alvo terapêutico.

Figura 10. Principais vias envolvidas na iniciação da apoptose. Há duas vias de morte - uma via extrínseca (receptor de morte) e uma via intrínseca (mitocondrial). A via extrínseca é mediada pela caspase-8 enquanto a intrínseca é mediada pela caspase-9. FADD é uma proteína adaptadora que acopla os receptores de morte, como o CD95, à caspase-8. Citocromo c é liberado da mitocôndria e junto com o APAF-1 e pró-caspase-9 forma o apoptossomo. Esse complexo ativa caspase-3. O resultado final é a ativação de uma cascata de proteases que desmontam a célula. APAF-1, fator 1 de ativação de protease; CD95L, ligante do CD95; Cit c, citocromo c; FADD, domínio de morte associado ao Fas. Adaptado de Hotchkiss e Nicholson, 2006.

1.5.2 Apoptose induzida por NO e seus congêneres

Recentes estudos mostram que espécies reativas podem ser indutoras de apoptose seja por induzir perturbações na função da membrana, no citoesqueleto, na transdução de sinal, na mitocôndria, na síntese protéica ou na integridade do DNA. Muito progresso foi feito no entendimento da morte mediada por essas espécies químicas, no entanto, pouco se sabe em relação aos efetores da apoptose provocada pelas espécies reativas.

NO pode promover a apoptose em algumas células, no entanto, inibe a apoptose em outras. Essa aparente incongruência ou complexidade parece estar relacionada à taxa de produção de NO e da sua interação com moléculas biológicas como ferro, tióis, proteínas e outras ROS (Chung et al., 2001). A produção duradoura de NO atua como um modulador pró-apoptótico. A apoptose induzida pelo NO é mediada por caspases (como a caspase-3) e é bloqueada por inibidores das caspases. Cit *c* é geralmente liberado, sugerindo que a apoptose induzida por NO é normalmente mediada pela mitocôndria; mas em alguns tipos celulares, ativação precoce de caspase-8 ou caspase-2 é observada, indicando que a apoptose induzida por NO pode ser disparada por mecanismos não mitocondriais (Brown e Borutaite, 2002). Como NO e seus derivados induzem apoptose é ainda pobremente caracterizado, mas vias principais podem incluir: 1) **aumento da expressão de proteínas pró-apoptóticas (como a Bax e Bak), e diminuição da expressão de proteínas anti-apoptóticas (como a Bcl-2)**; A família Bcl-2, presente na superfície citoplasmática de muitas organelas, incluindo a mitocôndria, retículo endoplasmático e o núcleo é uma família de proteínas indutoras e repressoras de morte por apoptose (Borner, 2003). O

principal mecanismo pelo qual a família de proteína Bcl-2 regula a apoptose é provavelmente controlando a liberação de cit *c*. Os membros da família Bcl-2, como Bcl-2 e Bcl-XL inibem a apoptose, prevenindo a liberação de cit *c*. Por outro lado, Bax, Bid e Bak são proteínas pró-apoptóticas, desencadeando a liberação de cit *c* (Hengartner, 2000; Grivicich, 2007). 2) **oxidação de fosfolipídios mitocondriais**; o cit *c* está normalmente ligado a membrana mitocondrial interna (IM) em associação com o fosfolipídio aniônico cardiolipina. A cardiolipina está presente somente na mitocôndria e é encontrada primariamente na IM. O tratamento de células com NO pode causar degradação induzida pela oxidação da cardiolipina (provavelmente devido à peroxidação induzida por ONOO⁻ ou NO₂) que está associada com inibição irreversível da cadeia respiratória e apoptose. Estudos mostram que a oxidação da cardiolipina diminui sua afinidade de ligação ao cit *c*, e mais recentemente, que a modificação oxidativa da cardiolipina facilita a mobilização do citocromo *c* da IM (Brown e Borutaite, 2002; Orrenius, 2007; Ott et al., 2007); 3) **abertura do PTP**; NO e seu derivado ONOO⁻ inibem a respiração mitocondrial em diversos pontos através da nitrosação ou oxidação de proteínas que compõem a cadeia respiratória. (Brown, 1999). A subsequente diminuição do potencial da membrana mitocondrial favorece a abertura de poros não específicos na membrana mitocondrial (conhecidos como PTP, poro de transição da permeabilidade) (Ott et al., 2007) (Figura 11). Muitos sinais como o aumento do Ca⁺² citosólico ou exposição à ROS também promovem abertura do PTP (Brown, 1999; Brookes et al., 2004; Garrido et al., 2006). Estudos recentes mostram que peroxinitrito pode oxidar grupos tióis (-SH) de proteínas sensores na mitocôndria, ativando o PTP (Belizário et al., 2007). Como resultado, a força osmótica dirige a água para a matriz, causando distensão da IM e

eventualmente ruptura da membrana mitocondrial externa (OM), promovendo a liberação de proteínas pró-apoptóticas presentes no espaço intermembranoso, incluindo o cit *c* (Garrido, 2006; Grivich, 2007).

Figura 11. Os dois modelos não exclusivos de liberação de citocromo *c*. De acordo com o primeiro modelo a abertura de PTP permite que pequenos solutos e água entrem na matriz mitocondrial. O inchaço osmótico resultante leva a ruptura de ambas as membranas mitocondriais (interna e externa) e, conseqüentemente, liberação de proteínas pró-apoptóticas, incluindo o citocromo *c*. Um modelo alternativo sugere que membros pró-apoptóticos da família Bcl-2, como BAX e BAK criam poros na membrana mitocondrial externa, sem afetar diretamente a membrana interna e a matriz mitocondrial. Cit *c*, citocromo *c*; IM, membrana mitocondrial interna; IMS, espaço intermembranoso; OM, membrana mitocondrial externa; PTP, poros de transição da permeabilidade; ROS, espécies reativas de oxigênio. Adaptado de Garrido et al., 2006.

Muito mais recentemente, evidências sugerem que a geração de RNS a partir de uma NOS mitocondrial (uma NO sintase análoga a nNOS (NOS I), presente na membrana interna da mitocôndria voltada à matriz intramitocondrial e responsável pela

regulação das taxas de respiração celular) esteja também diretamente relacionadas ao controle do ciclo celular. Assim, a apoptose poderia ser determinada não só pela geração exógena à mitocôndria de RNS, mas também pela geração interna de RNS (Ghafourifar e Cadenas, 2005; Carreras e Poderoso, 2007; Parihar et al., 2008). **4) distúrbio na homeostasia de íons Ca^{+2}** ; Em adição a produção de ATP nas células aeróbicas, a mitocôndria desenvolve um papel crucial na homeostase de Ca^{+2} intracelular. A mitocôndria pode absorver e reter Ca^{+2} , no entanto, a capacidade de retenção é limitada. Se o cálcio acumulado excede certos níveis de concentração, ele é subsequente liberado da mitocôndria. Tem sido demonstrado que pró-oxidantes (por exemplo, NO e NOO^-) estimulam a liberação de cálcio da mitocôndria (Brown, 1999) pela oxidação de tióis de membrana críticos. Esse efluxo de Ca^{+2} pode ocasionar um aumento geral da permeabilidade mitocondrial (PTP inclusive) e estimular várias enzimas catabólicas dependentes de Ca^{+2} (fosfolipases, nucleases) que promovem o desmontamento da célula (apoptose), bem como ativar as NOS dependentes de Ca^{+2} gerando mais RNS (Ritcher et al., 1996; Ritcher, 1998; Carreras e Poderoso, 2007; Orrenius, 2007; Ott, 2007); **5) mutações no DNA levando ao acúmulo de p53**; A proteína de supressão de tumor p53 é conhecida como um regulador da resposta celular ao dano no DNA. Normalmente as células expressam p53 em baixos níveis. Irradiação ou exposição a agentes que danificam o DNA como NO e ONOO^- , resultam num acúmulo de p53. A superexpressão de p53 bloqueia a proliferação celular ou induz apoptose, no caso de dano severo no DNA (Messmer e Brune, 1995; Brüne et al., 1999). O acúmulo da proteína p53 promove uma diminuição na expressão de Bcl-2, e/ou um aumento na expressão de Bax, conseqüentemente, liberação do cit c e ativação de caspases (Carreras e Poderoso,

2007). **6) ativação de vias de MAPK;** Em resposta a sinais apoptóticos, Bax, é redistribuído do citosol para a OM, tal deslocamento pode, aparentemente, ser mediado por MAP quinase p38 ativada por NO. Assim, NO ativa p38 e esta promove o deslocamento da Bax para a OM que, por sua vez, leva à formação de poros e a liberação de cit *c* (Ghatan et al., 2000). A figura 12 sumariza as principais vias pelas quais NO pode induzir a apoptose.

Figura 12. Possíveis vias que levam a morte celular apoptótica induzida por NO. Cit *c*, citocromo *c*; MAPK, proteínas quinases ativadas por mitógenos; NO, óxido nítrico; PTP, poro de transição da permeabilidade; RNS, espécies reativas de nitrogênio; ROS, espécies reativas de oxigênio. Adaptado de Brown e Borutaite, 2002.

Por outro lado, NO em concentrações baixas ou fisiológicas pode exercer atividade antiapoptótica através da expressão de genes protetores como as proteínas de choque térmico (do inglês “heat shock proteins” (HSPs)), Bcl-2 e inibição de caspases por S-nitrosilação do tiol do resíduo de cisteína (Chung, 2001; Brow e Borutaite, 2002; Kim et al., 2002). Todas as caspases contêm cisteína no seu sítio catalítico. Evidência de S-nitrosilação de caspase-3 e caspase-1 foi identificada “in vivo” (Rössig, 1999; Chung, 2001). Através da inibição da atividade caspase pela S-nitrosilação, NO parece inibir a apoptose em hepatócitos e ECs, inibindo a ativação proteolítica da enzima, assim como, suprimindo diretamente a atividade caspase (Chung, 2001). A superexpressão da HSP70 induzida pelo NO previne a apoptose bloqueando a formação de um apoptossomo funcional e conseqüentemente a ativação da pró-caspase-9 (Chung et al., 2001; Brown e Borutaite, 2002; Garrido et al., 2003).

1.6 Exossomos

Um estudo realizado anteriormente em nosso laboratório (Janiszewski et al. 2004), que investigava as propriedades pró-apoptóticas do plasma séptico, encontrou micropartículas no plasma de pacientes com choque séptico internados em UTI. Esse estudo sugeriu que tais micropartículas seriam originadas por plaquetas e que causariam apoptose de ECs e VSMCs de maneira dependente da geração de radical superóxido. Adicionalmente algumas outras características encontradas nessas micropartículas permitiu classificá-las como exossomos. Evidenciou-se assim, a necessidade de caracterizar melhor esse possível mecanismo fisiopatológico.

Exossomos são partículas com diâmetro entre 50 a 100nm produzidas pelo sistema endocítico-lisossomal de diversos tipos celulares.

1.6.1 A via endossomal

Células eucarióticas estão em contato com o ambiente recebendo sinais como citocinas, absorvendo nutrientes e secretando proteínas para o espaço extracelular. Para absorver e secretar, cada célula tem uma rede complexa de vesículas dentro dela. Usando esses compartimentos, as células não só absorvem macromoléculas do meio externo (endocitose) como também liberam proteínas ou carboidratos recém sintetizados (exocitose) (Keller et al., 2006).

A via endocítica compreende um sistema de compartimentos heterogêneos que consiste de endossomos primários (“early endosomes”, EEs), endossomos tardios (“late endosomes”, LEs) e lisossomos. Os EEs são os principais sítios de entrada do material endocitado. Os LEs recebem hidrolases lisossomais recém sintetizadas diretamente da rede trans-Golgi. Os lisossomos são os próximos compartimentos no trato endocítico e junto com os LEs constituem o principal sítio de degradação lipídica e protéica. Um subgrupo de LEs contém pequenas vesículas intraluminais (ILVs) sendo freqüentemente referidos como corpos multivesiculares (MVBs) (Figura 13) (Denzler et al., 2000; Stoorvogel et al., 2002).

Uma vez formados, os MVBs têm como destino os seguintes processos: dirigem proteínas para serem degradadas através da fusão com lisossomos; servem como sítios de armazenamento ou fundem-se com a membrana plasmática liberando as ILVs no meio extracelular, as quais passam, então, a se chamar exossomos (Figura

12) (Keller et al., 2006). A denominação exossomos se deve ao fato de que são estruturas similares aos endossomos com a diferença de que estes carregam material para dentro das células enquanto que os exossomos carregam para fora (Johnstone, 2005).

Figura 13. Diferentes destinos e funções das vesículas internalizadas. (A) Degradação lisossomal: alguns receptores de superfície como o EGFR são internalizados após ligação do ligante e ativação. A degradação do receptor através dos lisossomos funciona para diminuir a sinalização do receptor. (B) Compartimento de estoque MHCII: antígenos são apreendidos dentro de vesículas e degradados em pequenos peptídeos que se ligam a moléculas MHCII no compartimento de estoque do MHCII (MHCII). Após a entrega dos MHCII carregados à superfície celular, eles podem ser reconhecidos por células TCD4+. (C) Liberação dos exossomos: MVBs podem fundir com a membrana plasmática e liberar vesículas internas (exossomos) no meio extracelular. EE, endossomo primário; EGF, fator de crescimento epidermal; EGFR, receptor do fator de crescimento epidermal; MHCII, Complexo de Histocompatibilidade Principal Classe II; MVBs, corpos multivesiculares. Adaptado de Keller et al., 2006.

Há muitas evidências na literatura demonstrando a secreção de exossomos a partir de MVBs. Exossomos isolados de sobrenadantes de cultura de vários tipos celulares têm uma composição similar, se não idêntica, às vesículas dos MVBs. Do mesmo modo, muitos dos marcadores de membrana plasmática estão ausentes nos exossomos, excluindo a possibilidade de representarem pedaços de membrana plasmática. Além disso, a fusão dos MVBs com a membrana plasmática pode ser observada por microscopia eletrônica (Stoorvogel et al., 2002).

1.6.2 Composição Molecular dos exossomos

A disponibilidade de preparações de exossomos altamente purificados tem permitido a análise de seus componentes através de técnicas como western blotting, citometria de fluxo, microscopia imuno-eletrônica e espectroscopia de massa. Basicamente, a composição protéica dos exossomos depende das células que lhe deram origem. A compilação de dados obtidos de exossomos secretados por DCs, linfócitos B, células epiteliais intestinais (IECs) e em outros tipos celulares demonstram uma composição protéica comum, bem como a presença de proteínas específicas de cada tipo celular (Figura 14) (Stoorvogel et al., 2002; Février e Raposo, 2004).

As proteínas comuns a todos os tipos de exossomos estão mais provavelmente implicadas na sua biogênese e, talvez em algumas de suas funções ainda desconhecidas. Elas incluem proteínas componentes do citoesqueleto (actina, tubulina, proteínas de ligação à actina), bem como anexinas e proteínas Rab (possuem atividade GTP-ase que se associam com membranas). Estas últimas

provavelmente estão associadas a transporte e fusão de membranas intracelulares. Exossomos apresentam, também, um enriquecimento no seu conteúdo de colesterol, esfingomielina e do glicolípido GM3 característicos da manutenção de microdomínios de membrana (como rafts), importante na interação com células-alvo (Stoorvogel et al, 2002; Théry, 2002; Février e Raposo, 2004; Li et al, 2006). Exossomos são constituídos, ainda, por moléculas envolvidas na transdução de sinal (proteínas-quinase, proteínas G heterotriméricas) e por HSPs como HSC70 (proteína cognata da HSP70) e HSP90. As chaperonas estão associadas à apresentação de antígenos, na medida em que podem se ligar a peptídeos antigênicos e participar na interação destes com as moléculas do sistema MHC. Exossomos também contêm moléculas MHC classe I e, por fim, entre as proteínas mais comuns e mais abundantes encontram-se as tetraspaninas, cujos membros CD3, CD63, CD9, CD81 e CD82 encontram-se virtualmente presentes em todos os tipos de exossomos. Embora sua função não seja completamente conhecida, acredita-se que façam parte de outro tipo de microdomínio de membrana diferente dos domínios lipídicos, estejam envolvidas em interação com integrinas e moléculas MHCII e colaborem em muitas das funções de ativação celular dos exossomos (Stoorvogel et al, 2002; Théry, 2002; Février e Raposo, 2004; Li et al, 2006).

Os exossomos também contêm proteínas envolvidas em funções celulares específicas. Exossomos de células apresentadoras de antígenos (APCs) contêm grandes quantidades de MHCII, assim como os de DCs contêm CD86, molécula bastante associada a funções estimuladoras de linfócitos T. É descrito ainda, uma grande quantidade de moléculas provavelmente associadas ao endereçamento dos exossomos às células alvo. Dentre estas, destacam-se as cadeias alfa e beta das

integrinas (integrina $\beta 2$ em células T e $\alpha 1\beta 1$ em reticulócitos), membros da família das imunoglobulinas (como as ICAM1), CD54 em células B e p-selectina em plaquetas, o que habilita os exossomos como veículos acelulares de ativação imunológica (Azevedo, 2004; Stoorvogel et al, 2002; Théry et al., 2001; Février e Raposo, 2004; Li et al, 2006).

Figura 14. Representação esquemática da composição protéica de exossomos produzidos por células dendríticas. A estrutura proposta de um exossomo – como uma vesícula que é delimitada por uma bicamada lipídica, que contém citosol proveniente da célula que o originou e expõe domínios extracelulares de várias proteínas transmembrânicas em sua superfície. As proteínas estão arranjadas em categorias de acordo com suas funções conhecidas nas células. Adaptado de Théry, 2002.

A análise lipídica de exossomos de mastócitos e DCs sugere que uma das marcas dos exossomos, quando comparado à membrana celular seja o aumento da

movimentação transmembrana dos fosfolípidios (um processo chamado flip-flop) o que poderia levar a habilidade dos exossomos em fundirem com outras membranas (Février e Raposo, 2004).

1.6.3 Função dos exossomos nos diferentes tipos celulares

A primeira descrição de exossomos foi realizada por Pan e Johnstone (1983) durante o processo de eliminação do receptor de transferrina por reticulócitos em maturação. Durante o processo de maturação do reticulócito para eritrócito maduro o receptor de transferrina é incorporado aos endossomos, dirigido aos MVBs e transferido para os exossomos, sendo então secretados para o meio extracelular. Assim, em reticulócitos, os exossomos funcionariam como um sistema de eliminação de proteínas consideradas obsoletas (Couzin, 2005; Johnstone, 2005; Johnstone, 2006).

A população celular mais bem estudada em relação à capacidade de produção de exossomos são as APCs. A primeira descrição de produção de exossomos por APCs foi realizada por Raposo et al (1996). Esses autores demonstraram que clones de células B eram capazes de secretar exossomos indutores de proliferação “in vitro” de clones de células TCD4⁺ humanas. Em outro estudo, demonstrou-se que, de forma semelhante, exossomos derivados de DCs carregados com antígenos específicos seriam capazes de induzir atividade de células TCD4⁺ (via MHCII) e TCD8⁺ (via MHCI) (Denzer et al., 2000; Stoorvogel et al., 2002; Théry, 2002; Février e Raposo, 2004; Johnstone, 2005). Além disso, estudos sugerem que exossomos secretados por IECs, apesar da falta de moléculas

coestimulatórias, induzem respostas imunes humorais (Février e Raposo, 2004). Um aspecto interessante dos exossomos é que eles parecem transferir complexos MHC-peptídeo entre as DCs. Essa transferência resulta na amplificação da resposta imune como resultado de um aumento no número de células transportando complexos MHC-peptídeo (Février e Raposo, 2004). Por outro lado, a habilidade dos exossomos em transferir peptídeo para outra célula pode também ter consequências deletérias. É proposto que proteínas priônicas possam ser transmitidas a células sãs por exossomos. A rota para liberação dos prions via exossomos permite transmissão sem contato célula a célula (Couzin, 2005; Johnstone, 2006). Da mesma forma, exossomos poderiam oferecer uma rota alternativa para disseminação de vírus. Estudos propõem que vírus envelopados, como o HIV, evoluíram para explorar a via dos MVBs para gerar partículas virais. Tais vírus são considerados pelo hospedeiro como ILVs e liberados como exossomos. Assim, os vírus se escondem em exossomos secretados por células infectadas (Denzer et al., 2000; Février e Raposo, 2004; Couzin, 2005; Johnstone, 2006).

Uma outra característica interessante dos exossomos é que eles podem ser transferidos entre diferentes tipos de DCs e linfócitos B (Février e Raposo, 2004). Esses estudos mostram a transferência de exossomos de linfócitos B para superfície de células dendríticas foliculares (FDC) nos centros germinativos. As FDC são células acessórias do sistema imune envolvidas na diferenciação dos linfócitos B em plasmócitos ou em linfócitos B de memória, e não produzem exossomos e nem tem capacidade de sintetizar MHCII por si só, precisando então adquirir estas moléculas a partir de células doadoras. A presença de partículas com características de exossomos ricas em MHCII na superfície dessas células, bem como a capacidade

demonstrada de exossomos oriundos de linfócitos B de se ligarem especificamente e unicamente a elas sugere que as FDC poderiam funcionar como alvo fisiológico dos exossomos (Denzer et al., 2000; Stoorvogel et al., 2004).

Exossomos também têm sido associados à indução de respostas anti-tumorais. Zitvogel et al. (1998) demonstraram, pela primeira vez, que exossomos derivados de DCs sensibilizadas com peptídeos tumorais foram capazes de ativar respostas anti-tumorais mediadas por células T citotóxicas, levando a regressão de tumores estabelecidos em camundongos. Células tumorais também têm capacidade de secretar exossomos, os quais contêm e transferem antígenos tumorais para as DCs. As DCs, por sua vez, processam os antígenos tumorais e os apresentam em moléculas MHC I, ativando respostas antitumorais TCD8⁺ específicas (Wolfers et al., 2001). Dessa forma, exossomos derivados de tumor, assim como os exossomos derivados de DCs, podem ser utilizados como veículos acelulares de antígenos tumorais para estimulação de respostas imunes antitumorais “in vivo”. Essa é a gênese dos estudos que tentam utilizar os exossomos como imunoterapia para o tratamento do câncer (Azevedo, 2004; Cho et al., 2005; Le Pecq, 2005; Li et al., 2006; Mignot et al., 2006).

Recentemente foi demonstrado que exossomos podem induzir tolerância imunológica. IECs em condições inflamatórias, secretam exossomos carregando moléculas MHC II na circulação. Esses exossomos são, juntos com as células TCD4⁺ regulatórias, essenciais para a indução e manutenção de tolerância periférica a antígenos exógenos do conteúdo intestinal. Por razões óbvias, exossomos derivados de IECs são chamados de tolerossomos. Acredita-se que, da mesma maneira, exossomos derivados de DCs “in vivo” auxiliam na manutenção da autotolerância na

apresentação de autoantígenos à células TCD8⁺ (Stoorvogel et al., 2002; Li et al., 2006).

Por fim, as plaquetas também secretam exossomos. Plaquetas são fragmentos celulares originados de megacariócitos da medula óssea que circulam na corrente sanguínea em um estado não-adesivo. Após lesão vascular, as plaquetas passam a exibir propriedades de adesão ao endotélio, agregação e liberação de substâncias a partir de seus grânulos (alfa e densos). A ativação plaquetária é desencadeada por adesão à superfície (colágeno) ou agonistas específicos (trombina) e levam a liberação de glicoproteínas tais como fator de Von Willebrand e fibrinogênio (Denzer et al., 2000).

Plaquetas ativadas secretam dois tipos de partículas diferentes (Heijnen et al., 1999; Denzer et al., 2000; Janiszewski et al., 2004). Partículas maiores, também denominadas genericamente micropartículas, são derivadas do brotamento da membrana plasmática, medem entre 100 e 1000 nm, expressam grandes quantidades de anexina V em sua superfície e são capazes de induzir intensa ativação da cascata de coagulação. Por outro lado, a ativação plaquetária induz a liberação de exossomos pela fusão dos grânulos alfa e pela fusão dos MVBs com a membrana plasmática. Tais exossomos expressam fracamente anexina V em sua superfície e têm pouca capacidade de ligação ao Fator X da coagulação e à protrombina, indicando assim uma baixa atividade pró-coagulante. Exossomos derivados de plaquetas são ricos em CD63 e são provavelmente liberados nos sítios de injúria vascular podendo funcionar no ambiente direto de adesão plaquetária. Eles também estão presentes em sítios de contato entre plaquetas e outros neutrófilos o que sugere um papel na sinalização heterotípica (Denzer et al., 2000).

No presente momento, há muitas considerações que argumentam a favor de manter uma nomenclatura separada entre vesículas brotadas diretamente da superfície celular daquelas originadas por invaginação de um compartimento intracelular que subseqüentemente funde com a membrana plasmática (Johnstone et al., 2006; Toth et al., 2007). Na literatura, há uma ampla variedade de descrição de vesículas formadas sob muitas condições, originárias de muitos tipos celulares. Para prevenir a confusão, é útil aplicar requisitos para definir o termo exossomos, um termo que inclua sua origem em MVBs, tamanho (50 a 100nm) e forma (semelhante a pires) característicos, bem como proteínas específicas como as tetraspaninas, proteínas ligadas a membrana e chaperonas que são características permanentes dessa partícula. É importante ressaltar também que exossomos não devem ser confundidos com corpos apoptóticos, formados pela vesiculação direta da membrana plasmática durante o processo apoptótico e que expõem grandes quantidades de fosfatidilserina.

Ainda não há indicações experimentais de como os exossomos interagem com suas células alvo. Diferentes modelos de interação podem ser previstos para diferentes tipos celulares e podem estar diretamente relacionado às suas funções. Exossomos poderiam se fundir com a membrana plasmática ou eles poderiam ser endocitados através de um modo ainda desconhecido de internalização. Exossomos são freqüentemente liberados como pequenos agregados que poderiam ser absorvidos pelas células vizinhas via um mecanismo fagocítico. Não se exclui que exossomos possam meramente atacar a superfície celular, conferindo novas propriedades à célula alvo (Février e Raposo, 2004).

Como citamos, em trabalho anterior, nosso grupo demonstrou que os exossomos de origem plaquetária são os mais freqüentes em plasma de pacientes com choque séptico e que esses exossomos podem induzir apoptose de células endotéliais em cultura. Nesse mesmo estudo demonstramos ainda que tais exossomos possuem uma fonte enzimática de ROS, uma NADPH oxidase cuja atividade poderia estar associada à indução da apoptose (Janisweski et al., 2004).

No presente estudo, confirmamos os dados preliminares de que pacientes sépticos apresentam exossomos plaquetários circulantes. Nossos objetivos principais foram caracterizar sua geração de ROS e RNS quanto à fonte e quanto aos efeitos sobre ECs. Por fim, procuramos identificar qual estímulo associado à sepse poderia se relacionar à liberação dos exossomos pelas plaquetas.

2. Objetivos

2.1 Identificar qual estímulo associado à sepse poderia desencadear a liberação de exossomos plaquetários.

2.2 Identificar as possíveis fontes enzimáticas de produção de ROS e RNS em exossomos derivados de plaquetas.

2.3 Caracterizar a participação dos exossomos plaquetários na apoptose de células vasculares associada ao choque séptico em humanos.

2.4 Criar um modelo fidedigno de obtenção de exossomos plaquetários associados à sepse para permitir estudos subsequentes.

3. Métodos

3.1 Casuística

Doze pacientes internados na Unidade de Terapia Intensiva do Hospital Israelita Albert Einstein, São Paulo, Brasil, com diagnóstico precoce (24 horas) de choque séptico, definido de acordo com o critério do American College of Chest Physicians and the Society of Critical Care Medicine (Bone et al., 1992) foram incluídos no estudo. Esses pacientes não usavam nenhuma droga antiplaquetária ou anti-inflamatória. Os critérios para admissão foram os seguintes:

- Evidência de infecção, definida pela necessidade de uso de terapia (não profilaxia) com antibióticos, definida pelo médico responsável pelo paciente.

- Critérios de Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica (SIRS) (dois ou mais dos seguintes): 1) Hipotermia (temperatura corpórea menor do que 36° C) ou febre (acima de 38° C); 2) taquicardia (frequência cardíaca acima de 90 bpm); 3) taquipnéia (frequência respiratória acima de 20 ipm ou pCO₂ abaixo de 32 mmHg), leucocitose ou leucopenia (leucometria maior que 12.000/mm³ ou menor que 4.000/mm³ ou mais que 10% de formas jovens no sangue periférico).

- Choque séptico: Pressão arterial sistólica menor que 90 mmHg e/ou pressão arterial média menor que 65 mmHg, apesar de ressuscitação volêmica adequada e, portanto, com necessidade de uso de drogas vasoativas.

Dez indivíduos saudáveis doaram sangue para realização de experimentos controle. Estes indivíduos não tomaram nenhuma medicação que interferisse na função plaquetária dentro de 2 semanas, tais como anti-inflamatórios ou ácido acetilsalicílico.

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP/aprovação nº 110/06) e foi obtido consentimento informado por escrito dos responsáveis pelos pacientes.

3.2 Reagentes específicos

Todos os reagentes utilizados nos experimentos foram adquiridos da empresa Sigma-Aldrich Chemical Co. (EUA), a não ser quando especificados de outra origem. Foram sempre diluídos e estocados conforme as orientações do fabricante.

Substrato da NADPH oxidase

NADPH (0,1 a 0,3 mM)

A NADPH oxidase catalisa a produção do radical superóxido (O_2^-) pela redução de um elétron de oxigênio, utilizando NADPH como o doador essencial de elétrons.

Inibidor da NADPH oxidase

gp91 ds-tat

O gp91 ds-tat é um peptídeo quimérico que consiste de um fragmento do peptídeo tat do vírus HIV, que permite sua integração à célula alvo, e um fragmento da gp91^{phox}. capaz de impedir a associação entre as subunidades gp91^{phox} (e suas subunidades homólogas nox) e p47^{phox} da enzima NADPH oxidase. A associação entre essas subunidades é um dos primeiros passos na ativação da enzima, dessa

forma, o peptídeo gp91 ds-tat, atua como inibidor altamente específico das várias isoformas da enzima (Rey et al., 2001; Brandes, 2003).

gp91 ds-tat scrambled

O gp91 ds-tat scrambled é um peptídeo similar ao descrito acima, com a diferença que seus aminoácidos estão arranjos de maneira randômica. É o controle negativo do composto original.

Seqüestradores de superóxido

Superóxido Dismutase (SOD, 500 UI/ml, Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, Indiana, EUA)

A Superóxido Dismutase é a enzima responsável pela dismutação de duas moléculas de superóxido em uma de peróxido de hidrogênio, permitindo que outras enzimas promovam a degradação deste – por exemplo, a catalase. Inibe assim os efeitos que são exclusivos do superóxido. Por ser um composto enzimático de alto peso molecular, sua administração exógena, principalmente em culturas celulares, não permite sua incorporação às células.

Mimético de SOD [Mn (III) tetrakis (4-ácido benzóico) cloreto de porfirina (MnTBAP, 10µM Oxis Research, Portland, Oregon, EUA)]

É uma molécula orgânica capaz de retirar radical superóxido do meio, convertendo-o em peróxido de hidrogênio, mimetizando assim, a função da enzima superóxido dismutase. É permeável à membrana celular, atingindo os espaços intracelulares após administração exógena.

Doador de NO

Dietilamina NONOato (NONOato, 0,5 mM)

É um complexo de dietilamina com óxido nítrico (NO) utilizado para gerar liberação “controlada” de NO na solução. Considera-se que tal composto seja capaz de liberar NO de maneira efetiva (1,5M de NO/M de NONOato) de 1 a 5 minutos no máximo, em condições fisiológicas (Disponível em: <http://www.caymanchem.com/app/template/Product.vm/catalog/82100/a/z>).

Substrato da NOS

L-arginina

A enzima NO sintase sintetiza o radical NO a partir da L-arginina, oxigênio e NADPH, formando L-citrulina como subproduto.

Inibidores da NOS

L-NAME (1 μ M)

L-NMA (5 mM)

São análogos da L-arginina capazes de inibir a produção de NO.

D-NAME

Isômero inativo do L-NAME (inibidor da NOS). Utilizado nos experimentos como controle negativo do L-NAME, garantindo, assim, a especificidade dos resultados.

Seqüestrador de Peroxinitrito

Urato

O urato é oxidado pelo peroxinitrito a alantoina, aloxana e aminocarbonila. Ao reagir com o radical peroxinitrito, o urato origina espécies não reativas, atuando, dessa forma, como um seqüestrador natural do radical peroxinitrito. Inexiste um seqüestrador específico para radical tão ativo.

3.3 Cultura de células endoteliais aórticas de coelhos

As células endoteliais aórticas de coelhos (REC) foram gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. José Eduardo Krieger, do Laboratório de Cardiologia Molecular do Instituto do Coração da FMUSP. Esta é uma linhagem celular estabelecida por seleção clonal e caracterizada por Venter e Buonassisi (1976) e é amplamente utilizada nos laboratórios do InCor, FMUSP e ICB-USP.

O cultivo de células REC se deu de modo habitual para células de mamíferos. Elas foram mantidas em frascos de cultura contendo meio F-12 (HAM) suplementado com 10% (v/v) de soro bovino fetal inativado por calor (Invitrogen Brasil Ltda, São Paulo). Permitiu-se o crescimento celular até confluência em torno de 80%, quando então, vinte e quatro horas antes de serem processadas, as células foram privadas do soro fetal bovino, mantidas em meio suplementado apenas com 1% (v/v) deste. Assim, garante-se que todas as células deixem de proliferar e fiquem homogêneas em quiescência.

3.4 Obtenção de Exossomos

3.4.1 Isolamento de Exossomos Plaquetários de Pacientes Sépticos

De cada paciente foram coletados 40 ml de sangue em amostra única para separação e isolamento de exossomos. Cada amostra foi coletada em tubos estéreis de centrifugação contendo anticoagulante citrato dextrose (ACD; 3,8 mM de ácido cítrico, 7,5 mM de citrato trisódio, 125 mM de dextrose; 1,8 ml anticoagulante/8,1 ml de sangue total) e imediatamente processada. Os procedimentos iniciais de separação foram realizados a temperatura ambiente para evitar ativação plaquetária artefactual. Inicialmente, o sangue foi submetido à centrifugação simples a 3.000g durante 10 minutos para a separação do plasma dos elementos figurados. A seguir, retirou-se o sobrenadante e a ele foram adicionados inibidores de proteases: 3 mM de fenilmetilsulfonilfluoreto (PMSF), 1,0 µg/ml de aprotinina e 1,0 µg/ml de pepstatina. Procedeu-se então a filtração seqüencial do sobrenadante em filtros de náilon de 1,0 µm, 0,45 µm e 0,22 µm para remoção de plaquetas e outras células intactas, fragmentos celulares e corpos apoptóticos. O fluido resultante, livre de células e debris, foi coletado sobre o gelo e ultracentrifugado a 100.000g durante 90 minutos a 4° C para isolamento do “pellet” rico em exossomos. Removeu-se, cuidadosamente, o excesso de proteínas plasmáticas com lavagem utilizando tampão fosfato salino (PBS) acrescido de 0,1 mM de etilenodiaminotetraacético (EDTA). O “pellet” foi ressuspensionado em 250 µl de PBS. A concentração de proteína foi medida por um ensaio colorimétrico comercial (DC Protein Assay, Bio-Rad, EUA) baseado no método de Lowry (1951). As amostras foram estocadas em freezer a -80° C até a realização dos experimentos.

3.4.2 Obtenção de Exossomos Plaquetários de Voluntários Saudáveis

3.4.2.1 Separação das plaquetas

De cada voluntário saudável foram coletados 40-50 ml de sangue. Cada amostra foi coletada em tubo estéril de centrifugação contendo solução anticoagulante ACD. Centrifugou-se o sangue total a 800g durante 5 minutos a 20° C para obtenção do plasma rico em plaquetas. A seguir, os leucócitos foram removidos através de sistema de filtros comercial (Pall Corporation East Hills, NY). O plasma rico em plaquetas foi centrifugado a 800g durante 15 minutos a 20° C. O “pellet” de plaquetas resultante, livre de plasma, foi ressuspendido em 5 ml de tampão Krebs-HEPES (composição em mM: NaCl 99, KCl 4,7, MgSO₄ 1,2, KH₂PO₄ 1, CaCl₂ 1,9, NaHCO₃ 25, glicose 11,1 e sal HEPES 20).

3.4.2.2 Estimulação das plaquetas a produzirem exossomos: criação de um modelo semelhante aos exossomos plaquetários de pacientes sépticos

Sepse e choque séptico, como vimos, consistem em estados de desequilíbrio imuno-inflamatório em resposta a uma infecção, com importante participação da geração de NO na disfunção vascular. Diferentes modelos têm sido validados para simular sepsis em condições “in vitro” e “in vivo”, como exposição ao LPS ou TNF- α . Assim, decidimos estimular as plaquetas com cada um desses agentes para criar um modelo de geração de exossomos plaquetários, similar àqueles encontrados em pacientes sépticos (Janiszewski et al., 2004).

Portanto, a suspensão de plaquetas foi incubada por 1 hora a temperatura ambiente com LPS 100 ng/ml ou TNF- α 40ng/ml ou com o doador de NO dietilamina-NONOato (NONOato, 0,5 μ M). Utilizou-se como controle plaquetas incubadas com 250 μ l de solução salina (NaCl 154 mM em água) ou com trombina (5 IU/ml). A reação foi interrompida colocando-se as amostras no gelo.

3.4.2.3 Isolamento dos exossomos

As amostras de plaquetas foram centrifugadas a 800g durante 15 minutos para remoção das plaquetas. A seguir, centrifugou-se o sobrenadante a 17.500g durante 30 minutos para retirarmos as partículas. O sobrenadante da fração microvesicular foi filtrado seqüencialmente através de membranas de náilon, com baixa ligação a proteínas, de 0,45 μ m e 0,22 μ m. O produto filtrado foi centrifugado a 100.000g durante 90 minutos para obter o “pellet” de exossomos. Os “pellets” foram ressuspensos em 250 μ l de PBS. A concentração de proteína foi medida por um ensaio colorimétrico comercial (DC Protein Assay, Bio-Rad, EUA) baseado na reação de Lowry (1951). As amostras foram estocadas em freezer a -80° C até a realização dos experimentos.

3.5 Obtenção de corpos apoptóticos

Corpos apoptóticos com exposição intensa de fosfatidilserina foram utilizados como controle para exossomos (com baixa exposição) (Thery et al., 2001). Para gerá-los, a apoptose foi induzida em células REC por exposição à luz ultravioleta (Thery

et al., 2001; Janiszewski et al., 2004). Células em 80% de confluência em placas de Petri, tiveram seu meio de cultura trocado por PBS e foram irradiadas durante 30 minutos com luz ultravioleta usando uma lâmpada TUV 15W/G15 T8 (Philips, Holanda). Depois da irradiação, adicionou-se meio de cultura fresco e as células foram cultivadas por mais 24 horas. O meio sobrenadante foi coletado e centrifugado sucessivamente a 1.200g e 10.000g para precipitar as células e grandes “debris” e finalmente a 100.000g por 1 hora para coletar os corpos apoptóticos.

3.6 Caracterização dos exossomos

3.6.1 Citometria de Fluxo

Para a análise da citometria de fluxo foram utilizadas alíquotas de exossomos e de corpos apoptóticos, na concentração de 200 µg de proteína/ml. As amostras foram adquiridas em um citômetro de fluxo FACScan e analisadas pelo “software” Cell Quest (Becton Dickinson, San Jose, Califórnia, EUA). Para identificar epítomos específicos, a suspensão de exossomos e de corpos apoptóticos foi incubada com anticorpos conjugados com isotiocianato de fluoresceína (FITC) ou ficoeritrina (PE) dirigidos a antígenos de membrana, na concentração final de 1 µg/ml (BD Biosciences, San Jose, CA): CD9, CD63, CD81 (moléculas da família co-ativadora das tetraspaninas, que caracterizam os exossomos) (Escola et al., 1998; Février e Raposo al., 2004). Ligação inespecífica foi bloqueada com soro espécie-específico em relação a cada anticorpo utilizado. As amostras foram incubadas com anexina V conjugada com FITC em tampão de ligação (concentração final em mM: Hepes 0,1 (pH 7.4), NaCl 1,4, CaCl₂ 25). A ligação da anexina V representa a exposição de

fosfatidilserina na superfície da partícula. A aquisição de sinal inespecífico foi corrigida em relação às concentrações idênticas de anticorpos imunoglobulina G (IgG) controle, com a adequada fixação de limiares.

Como os exossomos são, em média, muito pequenos para análise citométrica acreditamos que nossos dados correspondam a agregados de exossomos formados após ultracentrifugação. Por essa razão, nós não nos preocupamos em realizar nenhuma quantificação específica.

Em estudo anterior (Janiszewski et al., 2004), para identificar a origem celular dos exossomos no sangue de pacientes sépticos, utilizamos anticorpos contra antígenos de membrana específicos: CD61 e 42b (para plaquetas), CD14 (para monócitos), CD15 (para granulócitos), CD3 (linfócitos), CD31 (endotelial) e CD56 (para células Natural Killer). Mostramos, assim, que os exossomos presentes no sangue de indivíduos em sepse eram derivadas predominantemente de plaquetas.

3.6.2 Microscopia eletrônica

Para a realização da microscopia eletrônica, os “pellets” de exossomos derivados de plaquetas foram fixados com glutaraldeído 2% em cacodilato de sódio 0,1 M por pelo menos 2 horas e posteriormente fixado com tetróxido de ósmio 2% em sacarose 10,56% por mais 2 horas. Por fim, foram incubados com uranil acetato 0,5% e sacarose 10,56% “overnight”. Os “pellets” foram, então, desidratados e embebidos em resina “Spurr”. Secções ultrafinas de 70-80 nm foram cortadas com o auxílio de um ultramicrotomo (Leica Ultracut R, Alemanha) depositadas sobre grades de cobre e coradas para contraste com 1% de uranil acetato e 1% de citrato de

chumbo. Os espécimes foram observados ao microscópio eletrônico de transmissão (JEOL Eletric 1010, Japão) operado a 80kV.

3.7 Detecção de espécies reativas

Existem vários métodos disponíveis para se quantificar ROS. Esses métodos incluem técnicas quimiluminescentes, ensaios fluorescentes, métodos enzimáticos e ressonância de elétron. Cada uma dessas técnicas pode apresentar artefatos potenciais, assim, o uso de duas ou mais técnicas diferentes, com resultados similares, fornece uma abordagem mais segura para o estudo de espécies reativas.

Por causa da sua sensibilidade, a quimiluminescência é freqüentemente utilizada para detectar radicais superóxido. Sob a exposição ao superóxido, sondas quimiluminescentes liberam fótons, que podem ser detectados por um contador de cintilação ou um luminômetro. Entre os compostos luminescentes, a lucigenina (bis-N-metilacridinium nitrato) é amplamente utilizada como um indicador da produção de superóxido.

As reações envolvidas na quimiluminescência amplificada pela lucigenina são:

- 1) $O_2^- + LC^{2+} \rightarrow LC^{\cdot+} + O_2$
- 2) $LC^{\cdot+} + O_2^- \rightarrow LCO_2$
- 3) $LCO_2 \rightarrow 2N\text{-metilacridona} + h\nu$,

onde LC^{2+} é a lucigenina (na sua forma aquosa dicátion), $LC^{\cdot+}$ é o radical cátion lucigenina, e LCO_2 é lucigenina dioxetano.

De acordo com esse mecanismo, o radical superóxido (O_2^-) reduz a lucigenina a seu radical cátion, que reage com um segundo O_2^- para formar uma molécula dioxetano rica em energia, que, ao decair, emite um fóton (Münzel et al., 2002).

Infelizmente, a lucigenina exibe uma tendência em sofrer ciclagem redox quando em concentração maior do que $5\mu\text{mol/L}$, superestimando, assim, a concentração de superóxido. A reação que exemplifica isso é: $LC^{\cdot+} + O_2 \leftrightarrow O_2^- + LC^{2+}$. Ou seja, o próprio radical lucigenina formado após a primeira reação com superóxido, reduz uma molécula de oxigênio a um novo radical superóxido. Sugere-se que esse fenômeno não seja significativo em relação à geração biológica de superóxido quando utilizadas baixas concentrações (menores ou iguais a $5\mu\text{mol/L}$) (Münzel et al. 2002; Myhre et al., 2003).

Diferente da lucigenina, a celenterazina, um composto que parece não sofrer ciclagem redox significativa, também é utilizado como sonda para superóxido. A quimiluminescência estimulada pelo superóxido ocorre depois da oxidação direta da celenterazina (Tarpey e Fridovich, 2001). Em contraste com a lucigenina, a celenterazina não parece ser específica para o superóxido, ela também reage com o peroxinitrito. Assim, para determinar se é o radical superóxido ou o peroxinitrito que contribui com a quimiluminescência induzida pela celenterazina, seqüestradores devem ser utilizados. Apesar da detecção concomitante de superóxido e peroxinitrito parecer, à primeira vista, ser uma desvantagem, ela permite a quantificação de todos os superóxidos produzidos, incluindo aqueles que já reagiram com o NO (Münzel et al., 2002).

Quanto às sondas fluorescentes, a diclorofluoresceína é utilizada para detectar ROS. Quimicamente, a fluorescência é adquirida pela oxidação do 2',7'-

dihidroclorofluoresceína (DCFH) em 2',7'-diclorofluoresceína (DCF) (Gomes et al., 2005; Soh, 2006). DCF não é específico e emite forte fluorescência a uma variedade de ROS, incluindo peróxido de hidrogênio, outros peróxidos e peroxinitrito. Por causa disso, sequestradores específicos dessas várias espécies reativas devem ser utilizados para entender a fonte do sinal DCF.

Várias técnicas são descritas para identificar RNS. Uma dessas técnicas é baseada no uso de sondas químicas cuja transformação por NO geram derivados altamente fluorescentes, permitindo a detecção de NO em concentrações nanomolares. Essas sondas incluem diaminofluoresceínas (DAFs) e diaminorodaminas (DARs). A transformação química fluorescente das DAFs é baseada na sua reatividade com o NO na presença de oxigênio. A nitroação das DAFs, resulta em derivados triazóis altamente fluorescentes (Lepiller et al., 2007).

No presente estudo, a detecção de espécies reativas foi realizada em plaquetas e exossomos provenientes de plaquetas através de ensaios luminométricos e fluorimétricos. As plaquetas foram obtidas como já descrito anteriormente e contadas em contador automático.

A quantificação de espécies reativas foi realizada em leitor de placa FARCyte (Amersham Biotech, EUA). As amostras de exossomos foram ressuspensas em 100µl de tampão Krebs-HEPES, numa concentração constante de 100 µg/ml. Sondas luminescentes ou fluorescentes foram adicionadas 15 minutos antes do início da medição e as amostras foram protegidas da luz.

Primeiramente, as sondas luminescentes lucigenina e celenterazina foram usadas para detectar ROS. A concentração de lucigenina e celenterazina utilizada (5 µM) minimiza a geração de artefatos de leitura como previamente demonstrado

(Myhre et al., 2003). Iniciaram-se as reações pela adição de NADPH (0,1 mM) para o ensaio de lucigenina e NADPH (0,1 mM) mais L-arginina (1 μ M) para o ensaio de celenterazina. Os sinais luminescentes foram medidos em placas transparentes sólidas, com tempo de integração fixado em 100 ms, sem atenuação e “background” automaticamente subtraído de todas as amostras. Para comparar a geração de ROS proveniente dos exossomos com a geração de ROS plaquetárias, ensaios com lucigenina e celenterazina foram realizadas com 1×10^8 plaquetas/ml e os resultados foram corrigidos para a concentração protéica das plaquetas. As contagens luminescentes foram apresentadas como contagem de luminescência relativa/min/mg de proteína.

Para melhor caracterizar a geração de espécies reativas, utilizou-se DCFH (10 mM) para medir ROS (Myhre et al., 2003) e DAF (10 mM) para medir RNS (Jourdeuil, 2002). As medidas foram realizadas na presença de NADPH (0,1 mM) com ou sem L-arginina (1 μ M) para DCFH, e na presença de L-arginina para DAF.

Experimentos posteriores para caracterizar a fonte ou o tipo de espécie reativa, foram realizados na presença de inibidores ou sequestradores específicos como: L^G-Metil-L-arginina acetato (L-NMA, 5 mM), N_w-Nitro-L-arginina metil ester (L-NAME, 1 μ M), N_w-Nitro-D-arginina metil ester (D-NAME, 1 μ M), Urato (1 μ M), Mimético de SOD [Mn (III) tetrakis (4-ácido benzóico) cloreto de porfirina (MnTBAP, 10 μ M, Oxis Research)] e o peptídeo gp91 ds-tat (10 μ M) (Rey et al., 2001).

3.8 Imunodeteção de enzimas

Foi realizada a imunodeteção dos componentes $p22^{\text{phox}}$, Nox1 e Nox2 ($gp91^{\text{phox}}$) da enzima NADPH oxidase, da PDI e das isoformas iNOS, eNOS e nNOS nos exossomos através da técnica de “Western Blotting”. Leucócitos foram usados como controle positivo para iNOS e componentes da NADPH oxidase. Células endoteliais ativadas com LPS foram utilizadas como controle positivo para eNOS e iNOS, enquanto as células endoteliais não ativadas foram utilizadas como controle para a expressão de eNOS.

3.8.1 Separação dos leucócitos

A separação dos leucócitos foi realizada a partir da coleta de 75 ml de sangue periférico de indivíduos saudáveis em tubos estéreis contendo anticoagulante citrato dextrose. A separação foi realizada por gradiente Ficoll-Paque (Pharmacia Biotech, Suécia). Para cada tubo contendo 5 ml de Ficoll-Paque, 10 ml de sangue foi adicionado cuidadosamente, para evitar a mistura entre o Ficoll e o sangue, permitindo, assim, uma separação celular eficiente. Centrifugou-se a 1500 rpm durante 30 minutos, à 20° C. Coletou-se o sobrenadante (plasma rico em leucócitos) descartando-se o sedimento de hemácias. O sobrenadante foi centrifugado a 1500 rpm durante 10 minutos, à 20° C para obtenção do “pellet”. Lavou-se o pellet com PBS e ressuspendeu-se em 500 µl de tampão de lise (NaCl 150 mM, EDTA 2 mM, PMSF 2 mM, Igepal 1%, SDS 0,1%, em PBS). Após determinação da concentração de proteínas, o material foi armazenado à – 80° C.

3.8.2 Preparo do Lisado de células endoteliais

As células endoteliais em cultura foram expostas a LPS 40 ng/ml durante 1 hora. Em seguida, procedeu-se a lavagem das células. Todo o procedimento foi realizado sobre o gelo ou com soluções resfriadas a 4° C. Aproximadamente 4×10^8 células, ainda aderentes aos frascos de cultura (equivalente a 20 placas de Petri de 20 cm de diâmetro, com células em torno de 80% de confluência) foram lavadas duas vezes com PBS e então raspadas das placas para frascos de centrifugação contendo tampão Tris 50mM, pH 7,4 com 3,4 mM PMSF, 1 µg/ml pepstatina e aprotinina, nos quais foram mais completamente rompidas por sonicação seriada (3 vezes por 10 segundos). Em seguida, o material foi centrifugado a 1000 g por 10 minutos para se removerem células intactas e grandes aglomerados. Uma segunda centrifugação do material sobrenadante a 18.000 g por 15 minutos permitiu a precipitação de núcleos celulares, mitocôndrias e grandes organelas. Por fim, novamente o sobrenadante da centrifugação anterior foi submetido a uma última centrifugação a 10.000 g por 60 minutos. O material precipitado desse último procedimento contendo principalmente microssomas e vesículas de membrana plasmática foi ressuspensionado em 1ml de tampão PBS.

3.8.3 “Western Blotting”

Após determinação da concentração de proteínas realizada pelo ensaio colorimétrico comercial DC Protein Assay (Bio-Rad, EUA), alíquotas de 40µg de leucócitos, lisado de células endoteliais e exossomos foram diluídas em tampão de

amostra contendo azul de bromofenol 0,02%, mercaptoetanol 10mM e dodecil sulfato de sódio 10% (SDS). Essas amostras foram aquecidas por 5 minutos a 100° C para desnaturação de proteínas e quebra de pontes dissulfeto e submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida (7,5% a 12%) sob corrente constante de 100 V para separação eletroforética das proteínas, através do sistema eletroforético Mini-PROTEAN[®] 3 (Bio Rad, EUA). Foi também aplicado ao gel um padrão de bandas de pesos moleculares conhecidos (Kaleidoscope[®], Bio Rad, EUA). Após separação, realizou-se a transferência das proteínas para membrana de nitrocelulose (Millipore, EUA), através do sistema Mini Trans-Blot Cell[®] (Bio Rad, EUA) sob 100V constante, a 4° C por 90 minutos. Em seguida, a membrana de nitrocelulose foi corada com solução de Ponceau para visualização da correta transferência e igual separação de proteínas das amostras. Após lavagem da membrana em tampão tris salina com tween 0,05% (TBS-T) foi realizado o bloqueio inespecífico com leite em pó desnatado a 5% em TBS-T 0,05% por 1 hora em temperatura ambiente, com o objetivo de minimizar a ligação inespecífica de anticorpos. Os seguintes anticorpos primários foram diluídos no título de 1:1000 em TBS-T 0,05% e incubados “overnight”, a 4° C: anticorpos dirigidos aos componentes p22^{phox}, Nox1 e Nox2 (gp91^{phox}) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) do citocromo b558 da NADPH oxidase, à PDI (ABR-Affinity Bioreagents) ou às isoformas iNOS, eNOS ou nNOS (Calbiochem, EMD Chemicals, San Diego, Califórnia, EUA). Após lavagem com TBS-T 0,05%, foi realizada a incubação com anticorpo secundário conjugado com peroxidase (1:5000, Santa Cruz Biotechnology) por 1 hora à temperatura ambiente. Após novas lavagens, procedeu-se a revelação da membrana por método quimioluminescente (peroxidase-H₂O₂-luminol) utilizando-se o kit ECL

(Amersham-Pharmacia, Grã Bretanha). Os experimentos foram repetidos ao menos três vezes.

3.9 Investigação de apoptose em células endoteliais

3.9.1 Microscopia de fluorescência

Para detecção da apoptose, utilizou-se método de detecção da exposição de fosfatidilserina através da Anexina V (Dhanabal et al., 1999). A morte celular apoptótica é acompanhada por uma mudança na estrutura da membrana plasmática, resultando na exposição de moléculas de fosfatidilserina na superfície celular (Van Engeland et al., 1998).

As células REC foram cultivadas em placas de 6 poços como já descrito. Vinte e quatro horas antes de serem processadas, mantiveram-se as células em 1% de soro fetal bovino para colocá-las em quiescência. Um volume de suspensão de exossomos equivalente a 100 µg de proteína foi adicionado em cada poço (a concentração final de proteínas por poço foi de 400 µg/ml) contendo NADPH (0,1 mM) e L-arginina (1 µM) e incubou-se por 30 minutos. Alguns experimentos foram realizados com incubação concomitante com mimético de SOD (10 µM), com Urato (1 µM) ou com L-NAME (1 µM). Após incubação, lavaram-se as células e adicionou-se meio fresco. Após 1 hora, as células foram lavadas com tampão PBS gelado e removidas das placas com 1% de tripsina, em seguida, as células foram centrifugadas e ressuspensas em tampão contendo cálcio na concentração de 10^6 células/ml dentro de “eppendorfs”. Adicionou-se Anexina V-FITC numa concentração de 100 ng/ml, em seguida, as células foram incubadas no escuro por 10

minutos e lavadas novamente com tampão PBS. Adicionou-se iodeto de propídeo (PI) (30 μ l) antes da análise. PI é um composto fluorescente que se liga ao DNA, ele é impermeável à membrana e geralmente excluído das células vivas. No entanto, durante a morte ou dano celular, com a perda da integridade da membrana plasmática, o PI é capaz de alcançar o núcleo e se intercalar no DNA, sendo assim, comumente usado para identificar morte celular. As células que são consideradas viáveis são negativas para ambas marcações, anexina-FITC e PI, enquanto as células em apoptose precoce são positivas para anexina-FITC e negativas para coloração com PI. As células que estão em apoptose tardia ou necrosaram são positivas para ambas as marcações.

As células coradas com PI foram espalhadas em lâminas, cobertas com lamínulas de vidro e imediatamente examinadas em microscópio de fluorescência (Axiovert, Zeiss, Alemanha). Para cada amostra, contaram-se um mínimo de 200 células por campo de alta potência (400X), em três campos diferentes. Consideraram-se células apoptóticas quando a fluorescência emitida pela anexina-FITC ligada à membrana era positiva e a coloração com iodeto de propídeo era negativa. Os resultados foram expressos como número de células apoptóticas/100 células.

3.9.2 Detecção colorimétrica de Caspase-3

Células endoteliais de coelho foram cultivadas sobre placas de 6 poços até uma confluência em torno de 80-90% e foram mantidas em soro fetal bovino 1%, vinte e quatro horas antes do experimento. Adicionou-se um volume de suspensão de

exossomos equivalente a 100 µg de proteína para cada poço (a concentração final de proteína por poço foi de 400 µg/ml) e incubou-se por 30 minutos. Alguns experimentos foram realizados após incubação com SOD mimético (10 µM) ou com L-NAME (1 µM). Utilizou-se a exposição ao TNF- α como controle positivo da ativação da caspase-3. Depois da incubação, mantiveram-se as placas no gelo. As células foram lavadas com PBS gelado e lisadas com tampão de lise contendo Tris/HCl (pH 7,4, 20 mM), NaCl (150 mM), Na₄P₂O₇ (10 mM), leupeptina (1 µg/ml), pepstatina (1 µg/ml), PMSF (3 mM), e Nonideto P40 (1% v/v), colocadas no gelo por 10 minutos. As células foram raspadas das placas, o material então centrifugado a 10.000g por 10 minutos. A atividade caspase-3 foi medida através de kit de detecção colorimétrico (Assay Designs, Ann Arbor, Michigan) a 405 nm no material sobrenadante (citosol). O kit envolve a conversão de um substrato cromogênico específico para caspase-3 em um produto colorido que absorve luz visível a 405 nm.

3.10 Análise Estatística

Os dados estão apresentados como média $\pm$ 1 erro padrão de três ou mais experimentos similares. A comparação entre os diferentes grupos foi realizada por análise de variância (ANOVA) seguido pelo teste de Student-Newman-Keuls. O nível de significância foi de 5%.

4. Resultados

4.1 Dados demográficos e características dos pacientes e controles

A tabela 2 descreve os dados clínicos dos pacientes sépticos e sujeitos controles. Os pacientes apresentavam média de idade em torno de 58 anos. Metade dos pacientes possuía infecção por bactéria gram negativa e o principal foco inicial de infecção era o sistema respiratório. Os voluntários saudáveis apresentavam média de idade em torno de 39,5 anos, não apresentavam doenças prévias nem haviam tomado medicação de reconhecida ação sobre plaquetas. Por serem pacientes extremamente graves, em choque séptico, seria impossível controlar as medicações que estes usavam no momento da coleta.

Tabela 1. Dados clínicos de pacientes sépticos e controles saudáveis

	Pacientes (n=12)	Controles (n=10)
Idade	58.3 ± 21	39.5 ± 13
Contagem plaquetas/ml	187 ± 45 x 10 ⁶	270 ± 116 x 10 ⁶
Exossomo: mg proteína/amostra	9.6 ± 3.9 mg	10.6 ± 4.5 mg
Infecção: gram -	6	n.a.
gram +	2	n.a.
<i>Candida</i>	1	n.a.
não identificado	3	n.a.
Local de origem: respiratório	7	n.a.
sangue	2	n.a.
urinário	1	n.a.
peritonite	1	n.a.
trauma	1	n.a.
Contagem de neutrófilos/ml	12.1 ± 5.7 x 10 ³	5.6 ± 1.5 x 10 ³
Disfunção: choque	12	n.a.
respiratório	8	n.a.
renal	3	n.a.
hepático	1	n.a.

n.a – não aplicável.

4.2 Caracterização dos Exossomos

4.2.1 Quantificação de Proteínas

As amostras de exossomos de pacientes sépticos geraram uma concentração de proteínas de $9,6 \pm 3,9$ mg/amostra, ao passo que as amostras de indivíduos saudáveis geraram uma concentração protéica de $10,6 \pm 4,5$ mg/amostra. Não houve, portanto, diferença significativa.

4.2.2 Citometria de Fluxo

Sabe-se que os exossomos expõem vários marcadores diferentes relacionados a sua origem celular e funções. Fosfatidilserina não é tipicamente exposta, diferenciando os exossomos dos corpos apoptóticos ou “debris” celulares. Por outro lado, considera-se que proteínas da família das tetraspaninas são especificamente inseridas durante a geração dos exossomos. Como mostrado na figura 15, a análise da citometria de fluxo divide as partículas em 2 grupos:

a) Partículas obtidas de plaquetas estimuladas com doador de NO (NONOato) ou com LPS, que são similares ao exossomos recuperados de pacientes sépticos (Sepse), expondo altas quantidades de CD9, CD63 e CD81, e baixa ligação à anexina V; as quais serão nomeadas, a partir de agora, sempre como exossomos.

b) Partículas obtidas de plaquetas expostas a salina (Controle), trombina ou TNF- α (não mostrado), que são similares aos corpos apoptóticos com baixa exposição de tetraspanina e alta capacidade de ligação à anexina V.

Figura 15. O enriquecimento de tetraspaninas caracteriza os exossomos. O gráfico representa os eventos positivos por 100.000 contagens como analisados pela citometria de fluxo. Os valores são corrigidos de acordo com o valor basal e ligação não específica de anticorpos. Os exossomos obtidos de pacientes sépticos tanto quanto aqueles de plaquetas ativadas pelo doador de NO (dietilamina NONOato) ou pelo LPS expuseram altas quantidades de CD9, CD63 e CD81 e baixa de fosfatidilserina (Anexina V) em relação às partículas obtidas de plaquetas tratadas somente com salina (Controle) ou trombina ou de células endoteliais apoptóticas. Resultados estão representados como média $\pm$ erro padrão. Cada barra representa amostras com n=4. * p<0,05 vs. Controle † p<0,05 vs. corpos apoptóticos.

4.2.3 Microscopia Eletrônica

Como descrito na figura 16, a microscopia eletrônica revelou partículas com morfologia (semelhantes a “pires”, do inglês “saucers”) e diâmetro menor do que 150nm, similares aos exossomos descritos na literatura. É notável que partículas de plaquetas estimuladas com NONOato (painel A) exibem uma superfície mais regular quando comparadas àquelas geradas por plaquetas expostas à trombina (painel B). Outros estudos microfotográficos mostram exossomos com estruturas similares às

abaixo apresentadas, ainda que com diâmetro variável a depender de sua origem celular, variando desde 50nm a 120nm.

Figura 16. Microscopia eletrônica revela estruturas exossomais. Imagens obtidas da população de partículas geradas por plaquetas expostas à NONOato (figura A) e à Trombina (figura B) revelam estruturas membranáceas medindo em média menos que 150 nm. Partículas de plaquetas estimuladas com NONOato exibem uma superfície mais regular do que àquelas liberadas por plaquetas expostas à trombina. Barras, 100 nm; aumento, 60.000x.

4.3 Detecção de Espécies Reativas

Medidas preliminares da atividade de geração de ROS, realizadas com lucigenina, revelaram que existia um paralelo quanto à atividade redox dos exossomos e às características reveladas pela análise da citometria de fluxo. Como visto na figura 17, os exossomos obtidos das plaquetas expostas ao LPS ou ao doador de NO geram ROS de uma maneira similar aos exossomos de pacientes sépticos, enquanto as partículas obtidas de plaquetas expostas à salina (Controle), trombina ou TNF- α (não mostrado) geram baixas quantidades de ROS. Plaquetas intactas geram sinais luminescentes maiores quando comparadas às partículas. As plaquetas de

pacientes sépticos também geram sinais luminescentes significativamente maiores do que as plaquetas de indivíduos sãos.

Figura 17. Quimioluminescência de lucigenina desencadeada por exossomos de plaquetas expostas a NO ou LPS é similar àquela dos exossomos de pacientes sépticos. O gráfico representa a quimioluminescência da lucigenina dependente de NADPH acima do valor basal. Exossomos obtidos de plaquetas expostas ao NONOato ou ao LPS geraram ROS de um modo similar aos exossomos obtidos de pacientes sépticos, enquanto as partículas obtidas de plaquetas expostas à salina (Controle) ou trombina apresentam atividade muito reduzida. Para efeito de comparação, a luminescência obtida com plaquetas de indivíduos saudáveis (Controle) e pacientes sépticos são mostradas. Os resultados foram ajustados de acordo com a concentração de proteína da amostra e estão representados na forma de média $\pm$ erro padrão de três ou mais experimentos. * $p < 0,05$ vs. Controle. RLU, Unidade Relativa de Luminescência.

Para melhor caracterizar o perfil redox dos exossomos, medidas com a sonda luminescente celenterazina foram realizadas, como mostrado na figura 18. Os resultados foram similares àqueles obtidos com lucigenina. Além disso, sabe-se que a celenterazina gera luminescência ao reagir tanto com superóxido, quanto com radical peroxinitrito, formado, na maior parte das vezes da reação espontânea entre o superóxido e o radical NO. O SOD mimético e os inibidores da NOS, L-NAME e

L-NMA inibiram significativamente os sinais luminescentes, sugerindo que os exossomos plaquetários são capazes de gerar ambos superóxido e NO. Os controles com D-NAME não mostraram redução de sinal significativa.

Figura 18. Geração de luminescência da celenterazina por exossomos sugere presença tanto de ROS quanto RNS. O painel 22 representa o sinal luminescente acima do valor basal obtido de exossomos expostos à celenterazina, incubados com NADPH e L-arginina. Exossomos obtidos de plaquetas expostas a NO ou LPS geraram ROS de modo similar aos exossomos de pacientes sépticos, enquanto as partículas obtidas de plaquetas expostas à salina (Controle) ou trombina tiveram baixa atividade. Sinais luminescentes foram consistentemente inibidos pela adição de SOD e pelos inibidores da NOS, L-NMA ou L-NAME sugerindo presença de ROS e RNS geradas pelos exossomos. Os resultados são média $\pm$ erro padrão de sete experimentos. * $p < 0,05$ vs. Controle, † $p < 0,05$ vs. Grupo não-tratado. RLU, Unidade Relativa de Luminescência.

As sondas fluorescentes DCHF e DAF foram utilizadas para melhor esclarecer a natureza da geração de ROS pelos exossomos. Ainda que haja ampla discussão na literatura, acredita-se que DCHF reaja principalmente com peróxido de hidrogênio, enquanto a detecção de superóxido pelo DCHF ainda não seja totalmente clara.

DCHF também pode ser oxidado pelo peroxinitrito (Myhre et al., 2003). Por outro lado, DAF é considerado uma sonda específica para RNS, como NO ou peroxinitrito.

A figura 19 mostra que os exossomos obtidos de pacientes sépticos e de plaquetas estimuladas com o doador de NO (NONOato) ou com LPS geram grandes quantidades de ROS comparativamente às partículas obtidas pelas plaquetas não estimuladas (Controle) ou pelas plaquetas expostas à trombina. O sinal DCHF foi inibido significativamente pelo SOD mimético, sugerindo que o superóxido possa estar envolvido.

Para melhor caracterizar a fonte de superóxido, nós realizamos experimentos com o inibidor específico da NADPH oxidase, o peptídeo gp 91 ds-tat (Rey et al., 2001), que reduziu expressivamente a fluorescência do DCHF induzida pelos exossomos quando comparado com o peptídeo “scrambled”. Esses resultados indicam, assim, a clara participação de uma Nox pertencente a uma NADPH oxidase. Por outro lado, estudos recentes sugerem que o desacoplamento da NOS poderia também representar uma fonte importante de superóxido no meio vascular (Li e Shah, 2004). De fato, a adição de L-NAME, um bloqueador não somente da geração de NO, mas também da geração de superóxido por NOS desacopladas, causou uma inibição de ~ 40% na fluorescência produzida pela DCHF.

Figura 19. NADPH oxidase e NO sintase desacoplada são fontes de espécies reativas de exossomos provenientes de plaquetas. Exossomos de pacientes sépticos, assim como exossomos gerados após exposição por NO e LPS causam um aumento da fluorescência de DCHF após adição do NADPH, que foi inibida tanto pelo SOD mimético como pelo peptídeo gp91 ds-tat, confirmando o papel da NADPH oxidase na geração de superóxido. L-NAME reduziu os sinais fluorescentes, sugerindo um papel da NOS desacoplada na geração de superóxido. O peptídeo “scrambled” (scr) usado como controle para gp91 ds-tat mostrou efeitos inibitórios residuais não significantes. Os resultados são média $\pm$ erro padrão de cinco experimentos para cada grupo. * $p < 0,05$ vs. Controle, † $p < 0,05$ vs. Grupo não-tratado. RFU, Unidade Relativa de Fluorescência.

Em adição, a suplementação com L-arginina (Figura 20), que pode favorecer o reacoplamento da NOS, resultou numa redução dos sinais DCHF, sugerindo que a transferência de elétrons foi redirecionada para a síntese de NO. Finalmente, considerando a co-existência da NADPH oxidase ativa e da NOS, nós postulamos o papel do peroxinitrito como uma espécie oxidante importante no sistema, já que a adição de urato levou a uma redução adicional do sinal de DCHF (Figura 20).

Figura 20. Exossomos derivados de plaquetas podem gerar peroxinitrito. O gráfico mostra a redução nos sinais DCHF após adição de L-arginina, sugerindo um papel da NOS desacoplada na geração de superóxido. Por outro lado, o efeito inibitório adicional da adição de urato, sugere, fortemente, o envolvimento da oxidação por peroxinitrito. Os resultados são médias $\pm$ erro padrão de cinco experimentos de cada grupo. * $p < 0,05$ vs. Controle, † $p < 0,05$ vs. Grupo não-tratado. RFU, Unidade Relativa de Fluorescência.

Até esse ponto, fomos capazes de demonstrar a geração de superóxido por uma NADPH oxidase e possivelmente por uma NOS desacoplada. Adicionalmente pudemos sugerir a presença de formação de peroxinitrito. Assim a idéia de que poderíamos verificar a presença também de uma NOS gerando radical NO nos levou a experimentos com o fluorocromo DAF.

A figura 21 mostra os resultados obtidos com DAF. Os exossomos de plaquetas expostas ao doador de NO ou ao LPS têm um perfil de atividade similar aos exossomos plaquetários obtidos de pacientes sépticos, enquanto as partículas obtidas de plaquetas expostas à trombina ou salina têm baixo nível de atividade. Além disso, sinais DAF puderam ser significativamente reduzidos pelo inibidor da NOS (L-

NAME) e pelo urato, mas não pelo SOD mimético, confirmando a hipótese da presença de geração de NO pela NOS.

Figura 21. Exossomos geram espécies reativas de nitrogênio. O gráfico mostra a fluorescência da sonda DAF de exossomos incubados com L-arginina. O SOD mimético não teve efeito inibitório enquanto L-NAME e urato causaram redução significativa nos sinais fluorescentes, sugerindo a geração de RNS principalmente pelos exossomos sépticos e por aqueles gerados após exposição ao NO e LPS. Resultados são média $\pm$ erro padrão de quatro experimentos para cada grupo. * $p < 0,05$ vs. Controle, † $p < 0,05$ vs. Grupo não-tratado. RFU, Unidade Relativa de Fluorescência.

Para investigar a fonte de óxido nítrico (a isoforma de NOS), experimentos preliminares foram realizados com a adição do quelante de dicátions EDTA 1mM no tampão dos experimentos. Não houve inibição significativa do sinal de DAF com o EDTA, mas surgiu grande variabilidade ao longo de cada experimento. A hipótese é que haveria uma interferência inespecífica em reações intermediárias na geração de fluorescência pelo EDTA. Em consequência, experimentos foram realizados a seguir usando tampão Krebs-HEPES livre de cálcio. Sob essa condição, o sinal dependente

de DAF não foi afetado, indicando a existência de uma NOS independente de cálcio, ou seja, a isoforma NOS induzível (tipo II).

4.4 Expressão protéica nos exossomos

A Figura 22 sumariza os resultados da análise de Western Blotting das partículas plaquetárias. Como esperado pelos resultados funcionais, nós identificamos nelas a presença de NO sintase tipo II, mas não dos tipos I ou III. Além disso, identificamos a presença das subunidades p22^{phox} e Nox 1 e Nox 2 da NADPH oxidase, assim como da sua proteína regulatória PDI.

Figura 22. Exossomos derivados de plaquetas possuem NADPH oxidase e NO sintases. Western blot representativo de partículas obtidas de diferentes origens [plaquetas sépticas (Sepse), plaquetas expostas a NONOato (NONO), LPS, TNF- α , trombina (Tr) e salina (Ctl)] submetidos a SDS-PAGE e expostos a anticorpos dirigidos às diferentes isoformas de NO sintase: neuronal (nNOS), induzível (iNOS) e endotelial (eNOS), à proteína reguladora da NADPH oxidase (PDI), às subunidades da NADPH oxidase, Nox 1 e Nox 2 e p22^{phox}. Leucócitos foram usados como controle positivo para iNOS e componentes da NADPH oxidase. Células endoteliais (Endotélio) ativadas (+) ou não (-) com LPS foram usadas como controle para a expressão de eNOS/iNOS. Como exossomos não possuem quantidades expressivas de actina, uma banda de proteína inespecífica foi usada como controle de “loading” do gel, para confirmar que quantidades similares de proteína exossomal foram analisadas simultaneamente. Os resultados são representativos de pelo menos três experimentos diferentes. Kda, quilodaltons.

4.5 Quantificação de Apoptose

Para verificar o papel fisiológico ou patofisiológico das partículas derivadas de plaquetas, nós expusemos as células REC aos diferentes tipos de partículas já identificadas. Como visto na figura 23, a adição de partículas derivadas de plaquetas expostas à trombina não alteraram as taxas basais de apoptose das células endoteliais. As partículas obtidas de plaquetas expostas à salina não mostraram também nenhum efeito sobre a taxa de apoptose endotelial (dados não mostrados). Por outro lado, exossomos de pacientes sépticos e exossomos de plaquetas expostas a doadores de NO aumentaram de duas a três vezes as taxas de apoptose. Esse efeito foi completamente inibido pelo mimético de SOD, pelo inibidor da NOS e pelo urato. Esses resultados sugerem, de fato, um papel para as ROS e RNS geradas pelas fontes enzimáticas presentes nos exossomos.

Figura 23. Exossomos derivados de plaquetas sépticas e expostas ao NO causam apoptose de células endoteliais dependente de ROS/RNS. Exossomos obtidos de pacientes sépticos ou de plaquetas expostas a um doador de NO causam um aumento de duas a três vezes na taxa de apoptose de células endoteliais de coelhos, quando comparados com partículas de plaquetas expostas à salina (não mostrado) ou trombina (Tr). O mimético de SOD, o inibidor da NOS, bem como o sequestrador do peroxinitrito (o urato) reverteram a atividade pró-apoptótica dos exossomos. Resultados são média $\pm$ erro padrão de seis experimentos para cada grupo. * $p < 0,05$ vs. Controle, † $p < 0,05$ vs. Grupo não-tratado.

A ativação da caspase-3 é um passo central da cascata de apoptose, e é reconhecidamente sensível ao ambiente redox (Rössig et al., 1999; Meji et al., 2004; Zhu et al, 2004). Para se testar a hipótese de que a apoptose induzida pelo exossomos poderia estar relacionada à ativação de caspase-3, nós expusemos as células endoteliais a diversas partículas e medimos, colorimetricamente, a ativação de caspase-3. A figura 24 sumariza os resultados, revelando nestes que os padrões de ativação de caspase-3 desencadeada por exossomos foi análoga aos padrões de alteração das taxas de apoptose nas células endoteliais pelos exossomos, ou seja, exossomos de pacientes sépticos e exossomos de plaquetas expostas ao doador de NO ou LPS provocam ativação de caspase-3, enquanto partículas originadas de plaquetas expostas à trombina, ou à salina (dado não mostrado) não têm nenhum

efeito. Em adição, nós demonstramos que a ativação de caspase-3 é claramente dependente da geração de superóxido ou geração de NO.

Figura 24. Exossomos causam ativação de caspase-3 dependente de ROS/RNS em células endoteliais. Partículas obtidas de plaquetas expostas à salina (não mostrado) ou trombina não causaram ativação de caspase-3 em células endoteliais de coelho acima da linha basal (Basal). Por outro lado, exossomos derivados de pacientes sépticos (Sepsis) ou de plaquetas expostas ao NO causaram um aumento de duas vezes na ativação da caspase-3 quando comparados à linha basal, similar à ativação obtida pela exposição direta das células endoteliais ao TNF- α . O mimético de SOD e o L-NAME bloquearam a ativação de caspase-3 desencadeada pelos exossomo. Resultados são média $\pm$ erro padrão de três experimentos para cada grupo. * $p < 0,05$ vs. Controle, † $p < 0,05$ vs. Grupo não-tratado.

5. Discussão

O presente estudo permitiu caracterizar quais estímulos associados à sepse poderiam levar a secreção de exossomos plaquetários em pacientes sépticos. Se há um papel real dos exossomos na comunicação celular, é fundamental que a célula de origem controle seu conteúdo (Baj –Krzyworzeka et al., 2002). Neste aspecto, aqui se sugere que diferentes agentes são capazes de induzir a liberação “in vitro” de micropartículas plaquetárias distintas. De fato, um dos achados iniciais do nosso estudo foi a confirmação que plaquetas secretam partículas similares a exossomos com características diferentes após estímulos diferentes: exossomos gerados de plaquetas expostas a agentes doadores de NO ou LPS são muito similares àqueles encontrados em (recuperados de) pacientes sépticos em relação ao conteúdo protéico, à exposição de fosfatidilserina e à atividade redox, enquanto plaquetas expostas à trombina ou TNF- α liberam partículas que se assemelham a corpos apoptóticos. Adicionalmente, os resultados encontrados pela microscopia eletrônica indicaram que as partículas de plaquetas estimuladas com NONOato exibem uma superfície mais regular em relação às de plaquetas expostas à trombina, e que as primeiras são mais semelhantes morfológicamente aos exossomos encontrados em pacientes sépticos. Assim podemos propor que na sepse, a geração aumentada de NO, assim como, a presença de LPS podem desencadear a liberação de exossomos pelas plaquetas.

Os exossomos emergem de compartimentos endocíticos conhecidos como MVBs (Figura 24). Estudos demonstram que os exossomos parecem ser produzidos a partir da seleção específica de proteínas da membrana limitante dos MVBs, invaginação desta e incorporação das proteínas selecionadas (Gassart et al., 2003).

Figura 24. Modelo hipotético da biogênese e liberação do exossomos. Exossomos contém proteínas de membrana que são selecionadas (1) durante sua formação nos MVBs. As proteínas de membrana selecionadas são concentradas em pequenas áreas (2) que são incorporadas por invaginação (3). Exossomos são liberados para o meio extracelular após fusão dos MVBs com a membrana plasmática (5). Adaptado de Stoorvogel et al., 2002.

Os experimentos de Western Blotting evidenciaram a presença de uma banda de cerca de 55 kDa que pode corresponder à PDI, em exossomos plaquetários, ambos de pacientes com choque séptico e de plaquetas estimuladas com LPS ou NO. Células sanguíneas mononucleares submetidas a estresse por calor (“heat shock”), dirigem especificamente HSP70 aos exossomos (Lancaster e Febbraio, 2005). PDI, assim como HSP70, é uma chaperona, associada ao tráfico de proteínas do retículo endoplasmático à membrana, e também está estritamente relacionada ao equilíbrio redox de células vasculares (Laurindo et al., 2008). Recentemente mostrou-se que PDI modula a NADPH oxidase nas VSMC (Janiszewski et al., 2005). Podemos

imaginar que PDI (assim como HSP70 e outras chaperonas) tenha um papel específico no processo de seleção e envio de proteínas aos exossomos.

Os mecanismos que regulam a secreção dos exossomos ainda não são completamente conhecidos. Somente um estudo recente sugeriu uma via regulatória para a secreção dos exossomos, revelando que a inibição da enzima diacilglicerol quinase- α (DGK- α) em linfócitos T aumentou a secreção de exossomos pró-apoptóticos (Luo et al., 2004). A inibição de isoformas DGK permite a completa ativação da cascata diacilglicerol/Ras/ERK (Los et al., 2004; Alonso et al., 2006) que representa uma via relacionada a efetores de sinalização vascular importantes, como angiotensina II ou PDGF. Apesar dos inibidores fisiológicos das DGKs ainda não estarem claros, recentes estudos mostram que as isoformas DGK possuem dois ou três domínios ricos em cisteína essenciais para sua completa atividade (Los et al., 2004), que podem proporcionar sua susceptibilidade a modificações redox de grupos tióis. Assim, é possível que a exposição ao NO promova a liberação de exossomos plaquetários interferindo numa via similar.

A presente investigação permitiu caracterizar as possíveis fontes enzimáticas de produção de ROS e RNS em exossomos derivados de plaquetas. Há mais de 20 anos há provas de que plaquetas liberam $O_2^{\cdot-}$. Entretanto há ainda discussão sobre as possíveis fontes enzimáticas de ROS nas plaquetas, incluindo ciclooxigenase (COX), enzimas mitocondriais (por exemplo, citocromo P450), xantina oxidase e NADPH oxidase. Em um estudo anterior (Janiszewski et al., 2004) mostrou-se que os exossomos de pacientes sépticos possuem capacidade geradora de superóxido não inibível por catalase, fluconazol ou oxipurinol, mas que o é por SOD, óxido de fenilarsênico, difenileno iodônio, inibidores conhecidos da NADPH oxidase. No

presente trabalho, através do uso de inibidor específico (gp91ds-tat), confirmou-se como importante fonte de geração de O_2^- em exossomos plaquetários uma NADPH oxidase contendo subunidade Nox. Demonstrou ainda, pela primeira vez, a presença da enzima responsável pela produção de NO, a NOS, mais especificamente sua isoforma iNOS, em amostras de exossomos plaquetários. Por fim, nossos dados sugerem que uma porção substancial das propriedades redox dos exossomos plaquetários poderia ser atribuída à formação de um radical altamente oxidante, o peroxinitrito.

Este estudo permitiu, ainda, caracterizar a participação dos exossomos plaquetários na apoptose de células vasculares associada ao choque séptico em humanos. Deve ser ressaltado que muitos dos estudos de sinalização vascular presentes na literatura foram executados com uma gama de partículas subcelulares conhecidas genericamente como micropartículas (MPs). Assim é difícil fazer comparações e análises entre os diferentes resultados experimentais (Johnstone, 2006). Através da análise por microscopia eletrônica pudemos inferir que as partículas liberadas por plaquetas estimuladas com NONOato e LPS eram mesmo exossomos visto que possuíam formas (“semelhante à pires”) e tamanhos (menores que 150nm) compatíveis com os dados da literatura. Em outro trabalho, Azevedo et al. (2007) demonstraram também por microscopia eletrônica exossomos similares obtidos de pacientes sépticos. Além disso, a análise por citometria de fluxo permitiu mostrar baixa exposição de fosfatidilserina e alta de tetraspaninas, marcadores característicos dos exossomos.

Diferentes estudos mostram que após interação com células alvo, MPs plaquetárias disparam algumas respostas biológicas; por exemplo, elas ativam as

células endoteliais (Barry et al., 1997), induzem (Myiamoto et al., 1998) ou inibem a apoptose de leucócitos polimorfonucleares (Brunet et al., 2000). Estudos de um mesmo grupo de pesquisadores demonstraram que MPs plaquetárias poderiam ativar vias de sinalização com ERK e AkT induzindo angiogênese e metástase em câncer de pulmão e promovendo a sobrevivência e proliferação de células hematopoiéticas humanas normais (Baj-Krzyworzeka et al. 2002; Janowska-Wieczorek, 2005). Todavia, os lipídios, proteínas ou espécies enzimáticas responsáveis por esses efeitos não puderam ser identificados. Além disso, estudos de diferentes grupos demonstraram consistentemente que MPs circulantes causam disfunção vascular (Boulanger et al., 2001), comprometendo o relaxamento vascular e alterando a contração cardíaca em vasos isolados e modelos cardíacos (Azevedo et al., 2007). Apesar dos mecanismos de dano vascular não serem completamente entendidos, eles têm sido relacionados à geração de ROS (Janiszewski et al., 2004). Para demonstrar que, pelo menos em parte, a atividade pró-apoptótica dos exossomos poderia estar relacionadas à geração de ROS e RNS, nós investigamos ativação de caspase-3 desencadeada pelos exossomos e inibida por SOD, L-NAME e urato em células endoteliais em cultura. A ativação de caspase-3 e apoptose dependente de caspase-3 parece ser inibível pela S-nitrosação de um resíduo de cisteína crítico induzida por doadores de NO exógeno (Rössig et al., 1999). Outros estudos, no entanto, mostraram que caspase-3 (e caspase-2), assim como a apoptose, podem ser ativadas, por ONOO⁻ exógeno (Lin et al., 1998; Zhu et al, 2004). De fato, NO parece estar envolvido na regulação da apoptose numa variedade de tecidos (Rössig et al., 1999). Em adição aos efeitos pró-apoptóticos bem estabelecidos do NO (Albina et al., 1993), um crescente corpo de evidência indica que baixa concentração de NO

funciona como importante inibidor da apoptose (Mannick et al., 1994). Em vista dessa capacidade ambivalente do NO atuar tanto como um fator pró-apoptótico e anti-apoptótico, intimamente relacionado ao tipo celular e à concentração de NO, um complexo espectro de controle de apoptose mediado por NO é concebível (Dimmeler e Zeiher, 1997). Assim, de acordo com a ativação das NOS e do balanço redox citosólico do tipo celular específico, num certo cenário fisiológico, NO pode funcionar como um inibidor apoptótico estabelecendo a integridade do tecido ou exercendo efeitos tóxicos.

6. Conclusões

6.1 Em conjunto, nossos resultados confirmam observações prévias que a geração de exossomos é um processo sujeito a vias regulatórias específicas.

6.2 Na sepse, o aumento na geração de NO e a presença de LPS podem desencadear a liberação de exossomos derivados de plaquetas, enquanto a presença de concentrações elevadas de trombina ou TNF- α induz a geração de partículas ricas em fosfatidilserina, que não podem ser caracterizadas como exossomos.

6.3 Indicando um papel de sinalização efetiva, exossomos plaquetários induzem ativação de caspase-3 e apoptose de células endoteliais através da geração de ROS/RNS por NADPH oxidases que contém as subunidades Nox1 ou 2 e por uma iNOS contribuindo para a disfunção endotelial na sepse.

6.4 Podemos propor, assim, que a liberação de exossomos por plaquetas trata-se de mais uma possível via envolvida na disfunção endotelial, vascular, e possivelmente orgânica na sepse.

6.5 Adicionalmente, podemos propor que exossomos, nessa situação, podem se tratar de um microcompartimento de sinalização redox, tal qual “lipid rafts” (aos quais se assemelham em composição lipídica), concentrando enzimas envolvidas em geração localizada de ROS/RNS. Com a diferença que são enviados pelas células originais para sinalização à distância, diferindo, assim claramente, do que seria a geração inespecífica e generalizada de ROS/RNS.

6.6 Em adição, nós oferecemos aqui a exposição plaquetária à LPS ou ao NO “in vitro” como um possível modelo experimental para a geração de exossomos envolvidos na sinalização redox.

7. Referências

1. Aird WC. The role of the endothelium in severe sepsis and multiple organ dysfunction syndrome. *Blood*. 2003;101(10):3765-77.
2. Akira S, Takeda K, Kaisho T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol*. 2001; 2(8):675-80.
3. Albina JE, Cui S, Mateo RB, Reichner JS. Nitric oxide-mediated apoptosis in murine peritoneal macrophages. *J Immunol*. 1993;150(11):5080-5.
4. Alom-Ruiz SP, Anilkumar N, Shah AM. Reactive oxygen species and endothelial activation. *Antioxid Redox Signal*. 2008;10(6):1089-100.
5. Alonso R, Mazzeo C, Mérida I, Izquierdo M. A new role of diacylglycerol kinase α on the secretion of lethal exosomes bearing Fas ligand during activation-induced cell death of T lymphocytes. *Biochimie*. 2006;89(2):213-21.
6. Alvarez B, Radi R. Peroxynitrite reactivity with amino acids and proteins. *Amino Acids*. 2003; 25(3-4):295-311.
7. Andrew PJ, Mayer B. Enzymatic function of nitric oxide synthases. *Cardiovasc Res*. 1999;43(3):521-31.
8. Azevedo, LC. Efeito ionotrópico negativo de exossomos plaquetários circulantes em pacientes com choque séptico: um novo mecanismo de disfunção miocárdica [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2004.
9. Azevedo LC, Janiszewski M, Pontieri V, Pedro Mde A, Bassi E, Tucci PJ, Laurindo FR. Platelet-derived exosomes from septic shock patients induce myocardial dysfunction. *Crit Care*. 2007;11(6):R120
10. Azevedo LC, Pedro MA, Souza LC, Souza HP, Janiszewski M, Da Luz PL, Laurindo FRM. Oxidative stress as a signaling mechanism of the vascular response to injury: the redox hypothesis of restenosis. *Cardiovasc Res*. 2000;47(3): 436-45.
11. Babior, BM. NADPH Oxidase: An Update. *Blood*. 1999; 93(5):1464-76.
12. Baj-Krzyworzeka M, Majka M, Pratico D, Ratajczak J, Vilaire G, Kijowski J, Reza R, Janowska-Wieczorek A, Ratajczak MZ. Platelet-derived microparticles stimulate proliferation, survival, adhesion, and chemotaxis of hematopoietic cells. *Exp Hematol*. 2002;30(5):450-9.
13. Barford D. The role of cysteines as redox-sensitive regulatory switches. *Curr Opin Struct Biol*. 2004;14(6): 679-86.

14. Barnnerman DD, Sathyamoorthy M, Goldblum SE. Bacterial lipopolysaccharide disrupts endothelial monolayer integrity and survival signaling events through caspase cleavage of adherens junction proteins. *J Biol Chem*. 1998;273(52):35371-80.
15. Barry OP, Pratico D, Lawson JA, FitzGerald GA. Transcellular activation of platelets and endothelial cells by bioactive lipids in platelet microparticles. *J Clin Invest*. 1997;99(9):2118-27.
16. Belizário JE, Alves J, Occhiucci JM, Garay-Malpartida M, Sesso A. A mechanistic view of mitochondrial death decision pores. *Braz J Med Biol Res*. 2007;40(8):1011-24.
17. Bellomo R. The cytokine network in the critically ill. *Anaesth Int Care*. 1992; 20(3):288-302.
18. Beutler B, Cerami A. The biology of cachectin/TNF- a primary mediator of the host response. *Ann Rev Immunol*. 1989;7:625-55.
19. Bevers LM, Braam B, Post JA, van Zonneveld AJ, Rabelink TJ, Koomans HA, Verhaar MC, Joles JA. Tetrahydrobiopterin, but not L-arginine, decreases NO synthase uncoupling in cells expressing high levels of endothelial NO synthase. *Hypertension*. 2006;47:87-4.
20. Blackwell TS, Christman JW. Sepsis and cytokines: current status. *Br J Anaesth*. 1996;77(1):110-7.
21. Bone RC. Sepsis, the sepsis syndrome, multi-organ failure: a plea for comparable definitions. *Ann Intern Med*. 1991;114(4):332-3.
22. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus, WA, Schein RM, Sibbaldi, WJ. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Chest*. 1992;101(6):1644-55.
23. Boos CJ, Goon PKY, Lip GYH. The endothelium, inflammation, and coagulation in sepsis. *Clin Pharmacol Ther*. 2006;79:20-2.
24. Boulanger CM, Scoazec A, Ebrahimian T, Henry P, Mathieu E, Tedgui A, Mallat Z. Circulating microparticles from patients with myocardial infarction cause endothelial dysfunction. *Circulation*. 2001;104(22):2649-52.
25. Brandes RP. A radical adventure: the quest for specific functions and inhibitors of vascular NADPH oxidases. *Circ Res*. 2003;92:583-5.
26. Brookes OS, Yoon Y, Robotham JL, Anders MW, Sheu SS. Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2004;287(4):817-33.

27. Brown GC. Nitric oxide and mitochondrial respiration. *Biochim Biophys Acta*. 1999;1411(2-3):351-69.
28. Brown GC, Borutaite V. Nitric oxide inhibition of mitochondrial respiration and its role in cell death. *Free Radic Biol Med*. 2002;33(11):1440-50.
29. Brüne B, von Knethen A, Sandau KB. Nitric oxide (NO): an effector of apoptosis. *Cell Death Differ*. 1999;6(10):969-75.
30. Buttner MJ, Paget MSB. Thiol-based regulatory switches. *Annu Rev Genet*. 2003;37: 91-121.
31. Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res*. 2000;87(10):840-4.
32. Carreras MC, Poderoso JJ. Mitochondrial nitric oxide in the signaling of cell integrated responses. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2007;292(5):C1569-80.
33. Cerami A. Inflammatory cytokines. *Clin Immunol Immunopathol*. 1992;62(1-2):S3-10.
34. Chlopicki S, Olszanecki R, Janiszewski M, Laurindo FR, Panz T, Miedzobrodzki J. Functional role of NADPH oxidase in activation of platelets. *Antioxid Redox Signal*. 2004;6(4):691-8.
35. Cho JA, Yeo DJ, Son HY, Kim HW, Jung DS, Ko JK, Koh JS, Kim YN, Kim CW. Exosomes: a new delivery system for tumor antigens in cancer immunotherapy. *Int J Cancer*. 2005;114(4):613-22.
36. Chung HT, Pae HO, Choi BM, Billiar TR, Kim YM. Nitric oxide as a bioregulator of apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001;282(5):1075-9.
37. Cinel I, Dellinger RP. Advances in pathogenesis and management of sepsis. *Curr Opin Infect Dis*. 2007;20(4):345-52.
38. Cohen MV. Free radicals in ischemic and reperfusion myocardial injury: is this time for clinical trials? *Ann Intern Med* 1989;111: 918-31.
39. Couzin J. Cell biology: The ins and outs of exosomes. *Science*. 2005;308(5730):1862-3.
40. Crimi E, Sica V, Willian-Ignarro S, Zhang H, Slutsky A, Ignarro LJ, Napoli C. The role of oxidative stress in adult critical care. *Free Radic Biol Med*. 2006;40(3):398-406.40.

41. Danese S, Fiocchi C. Platelet activation and the CD40/CD40 ligand pathway: mechanisms and implications for human disease. *Crit Rev Immunol*. 2005;25(2):103-21
42. de Kleijn D, Pasterkamp G. Toll-like receptors in cardiovascular diseases. *Cardiovasc Res*. 2003;60(1):58-67
43. Dembic Z. Immune system protects integrity of tissues. *Mol Immunol*. 2000;37(10):563-9.
44. Denzer K, Kleijmeer MJ, Heijnen HFG, Stoorvogel W, Geuze HJ. Exosomes: from internal vesicle of the multivesicular body to intercellular signaling device. *J Cell Sci*. 2000;113:3365-74.
45. Dhanabal M, Ramchandran R, Waterman MJF, Lu H, Knebelmann B, Segal M, Sukhatme VP. Endostatin induces endothelial cell apoptosis. *J Biol Chem*. 1999;274(17):11721-6.
46. Dimmeler S, Zeiher AM. Nitric oxide and apoptosis: another paradigm for the double-edged role of nitric oxide. *Nitric Oxide*. 1997;1(4):275-81.
47. Dinarello CA. Proinflammatory and anti-inflammatory cytokines as mediators in the pathogenesis of septic shock. *Chest*. 1997;112:321-9.
48. Donkó A, Péterfi Z, Sum A, Leto T, Geiszt M. Dual Oxidases. *Phil Trans R Soc B*. 2005;360(1464):2301-2308.
49. Escola JM, Kleijmeer MJ, Stoorvogel WJ, Griffin M, Yoshie O, Geuze HJ. Selective enrichment of tetraspan proteins on the internal vesicles of multivesicular endosomes and on exosomes secreted by human B lymphocytes. *JBiol Chem*. 1998;273(32):20121-7.
50. Fedoroff N. Redox Regulatory Mechanisms in Cellular Stress Responses. *Annals of Botany*. 2006;98:289-300.
51. Fenton HJH. Oxidation of tartaric acid in presence of iron. *J Chem Soc*. 1894;64:899-909.
52. Février B, Raposo G. Exosomes: endosomal-derived vesicles shipping extracellular messages. *Curr Opin Cell Biol*. 2004;16(4):415-21.
53. Fialkow L, Wang Y, Downey GP. Reactive oxygen and nitrogen species as signaling molecules regulating neutrophil function. *Free Radic Biol Med*. 2007;42(2):153-64.

54. Forman HJ, Fukuto JM, Torres M. Redox signaling: thiol chemistry defines which reactive oxygen and nitrogen species can act as second messengers. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2004;287:C246-56.
55. Frantz S, Ertl G, Bauersachs J. Mechanisms of disease: Toll-like receptors in cardiovascular disease. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*. 2007;4(8):444-54.
56. Frey EA, Finlay BB. Lipopolysaccharide induces apoptosis in a bovine endothelial cell line via a soluble CD14-dependent pathway. *Microb Pathog*. 1998;24(2):101-9.
57. Garrido C, Galluzzi L, Brunet M, Puig PE, Didelot C, Kroemer G. Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria. *Cell Death Differ*. 2006;13(9):1423-33.
58. Garrido C, Schmitt E, Candé C, Vahsen N, Parcellier A, Kroemer G. HSP27 e HSP70: potentially oncogenic apoptosis inhibitors. *Cell Cycle*. 2003;2(6):579-84.
59. Gassart A, Geminard C, Fevrier B, Raposo G, Vidal M. Lipid raft-associated protein sorting in exosomes. *Blood*. 2003;102(13):4336-44.
60. Gay NJ, Gangloff M. Structure and function of Toll receptors and their ligands. *Annu Rev Biochem*. 2007;76:141-65.
61. Geller DA, Billiar TR. Molecular biology of nitric oxide synthases. *Cancer Metastasis Rev*. 1998;17(1):7-23.70.
62. Ghafourifar P, Cadenas E. Mitochondrial nitric oxide synthase. *Trends Pharmacol Sci*. 2005;26(4):190-5.
63. Ghatan S, Larner S, Kinoshita Y, Hetman M, Patel L, Xia Z, Youle RJ, Morrison RS. p38 MAP kinase mediates Bax translocation in nitric oxide-induced apoptosis in neurons. *J Cell Biol*. 2000;150(2):335-47.
64. Gomes A, Fernandes E, Lima JLFC. Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species. *J Biochem Biophys Methods*. 2005;65(2-3):45-80.
65. Govers R, Rabelink TJ. Cellular regulation of endothelial nitric oxide synthase. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2001;280(2):F193-206.
66. Griending KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M. NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res*. 2000;86(5):494-501.
67. Grivicich I, Regner A, da Rocha AB. Morte celular por apoptose. *Rev Bras Cancerol*. 2007;53(3):335-343.

68. Gullo A, Iscra F, Di Capua G, Berlot G, Lucangelo U, Chierago ML, Ristagno G, Peratoner A, Fasiolo S, Consales C, De Martino G, Tufano R. Sepsis and organ dysfunction: an ongoing challenge. *Minerva Anesthesiol.* 2005;71(11):671-99.
69. Haber F, Weiss J. The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts. *Proc R Soc.* 1934; 147:332-51.
70. Hack CE, Zeerleder S. The endothelium in sepsis: Source of and a target for inflammation. *Crit Care Med.* 2001;29(7):S21-S27.
71. Hampton MB, Kettle AJ, Winterbourn CC. Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. *Blood.* 1998;92(9):3007-17.
72. Hampton MB, Kettle AJ, Winterbourn CC. Involvement of superoxide and myeloperoxidase in oxygen-dependent killing of *Staphylococcus aureus* by neutrophils. *Infect Immun.* 1996; 64(9):3512-7.
73. Hayashi F, Means TK, Luster AD. Toll-like receptors stimulate human neutrophil function. *Blood.* 2003;102(7):2660-9.
74. Hehlhans T, Pfeffer K. The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. *Immunology.* 2005;115(1):1-20.
75. Heijnen HFG, Schiel AE, Fijnheer R, Geuze HJ, Sixma JJ. Activated platelets release two types of membrane vesicles: microvesicles by surface shedding and exosomes derived from exocytosis of multivesicular bodies and α -granules. *Blood.* 1999;94(11):3791-9.
76. Hornung V, Rothenfusser S, Britsch S, Krug A, Jahrsdorfer B, Giese T, Endres S, Hartmann G. Quantitative expression of Toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides *J.Immunol.* 2002; 168(9):4531-4537.
77. Hotchkiss RS, Karl I. Endothelial cell apoptosis in sepsis: A case of habeas corpus? *Crit Care Med.* 2004; 32(3):901-2.
78. Hotchkiss RS, Karl JE. The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Eng J Med.* 2003;348(2):138-50.
79. Hotchkiss RS, Nicholson DW. Apoptosis and caspases regulate death and inflammation in sepsis. *Nat Rev Immunol.* 2006;6(11):813-22.
80. Hotchkiss RS, Tinsley KW, Swanson PE, Karl IE. Endothelial cell apoptosis in sepsis. *Crit Care Med.* 2002;30:S225-8.

81. Hoyt DG, Mannix RJ, Rusnak JM, Pitt Br, Lazo JS. Collagen is a survival factor against LPS- induced apoptosis in cultured sheep pulmonary artery endothelial cells. *Am J Physiol.* 1995;269:L171-7.
82. Hu X, Yee E, Harlan JM, Wong F, Karsan A. Lipopolysaccharide induces the antiapoptotic molecules, A1 and A20, in microvascular endothelial cells. *Blood.* 1998;92(8):2759-65.
83. Hurst J, von Landenberg P. Toll like receptors and autoimmunity. *Autoimmun Rev.* 2008;7(3):204-8.
84. Jaffrey SR et al. Protein s-nitrosylation: a physiological signal for neuronal nitric oxide. *Nat Cell Biol.* 2001; 3:193-7.
85. Janiszewski M, Carmo AO, Pedro MA, Silva E, Knobel E, Laurindo FRM. Platelet-derived exosomes of septic individuals possess proapoptotic NAD(P)H oxidase activity: A novel vascular redox pathway. *Crit Care Med.* 2004;32(5):818-25.
86. Janiszewski M, Lopes LR, Carmo AO, Pedro MA, de Lima TM, Laurindo FRM. Protein disulfide isomerase acts as a novel regulatory subunit of vascular smooth muscle cell NAD(P)H oxidase. *J Biol Chem.* 2005; 280: 40813 – 9.
87. Janiszewski M, Pedro MA, Scheffer RC, van Asseldonk JH, Souza LC, da Luz PL, Augusto O, Laurindo FR . Inhibition of vascular NADH/NADPH oxidase activity by thiol reagents. Lack of correlation with cellular glutathione redox status”. *Free Radical Biology and Medicine.* 2000; 29(9):889-99.
88. Janowska-Wieczorek A, Wysoczynski M, Kijowski J, Marquez-Curtis L, Machalinski B, Ratajczak J, Ratajczak MZ. Microvesicles derived from activated platelets induce metastasis and angiogenesis in lung cancer. *Int J Cancer.* 2005;113(5):752-60.
89. Jarrossay D, Napolitani G, Colonna M, Sallusto F, Lanzavecchia A. Specialization and complementarity in microbial molecule recognition by human myeloid and plasmacytoid dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* 2001; 31(11): 3388- 93.
90. Jiang X, Wang X. Cytochrome C-mediated apoptosis. *Annu Rev Biochem.* 2004;73:87-106.
91. Johnstone RM. Revisiting the road to the discovery of exosomes. *Blood Cells Mol Dis.* 2005; 34(3):214-9.

92. Johnstone RM. Exosomes biological significance: A concise review. *Blood Cells Mol Dis*. 2006; 36(2):315-21.
93. Jourdain D. Increased nitric oxide-dependent nitrosylation of 4,5-diaminofluorescein by oxidants: implications for the measurement of intracellular nitric oxide. *Free Radic Biol Med*. 2002;33(5):676-84.
94. Kanczkowski W, Ziegler CG, Zacharowski K, Bornstein SR. Toll-like receptors in endocrine disease and diabetes. *Neuroimmunomodulation*. 2008;15(1):54-60.
95. Kawai T, Akira S. TLR Signaling. *Cell Death Differ*. 2006;13(5) :816-25.
96. Keller S, Sanderson MP, Stoeck A, Altevogt P. Exosomes: from biogenesis and secretion to biological function. *Immunol Lett*. 2006;107(2):102-8.
97. Kim KM, Kim PK, Kwon YG, Bai SK, Nam WD, Kim YM. Regulation of apoptosis by nitrosative stress. *J Biochem Mol Biol*. 2002;35(1):127-33
98. Krause KH. Tissue distribution and putative physiological function of NOX family NADPH oxidases. *Jpn J Infect Dis*. 2004;57(5):S28-9.
99. Kunsch C, Medford RM. Oxidative stress as a regulator of gene expression in the vasculature. *Circ Res*. 1999;85(8):753-66.
100. Lambeth JD. Nox/Duox family of nicotinamide adenine dinucleotide (phosphate) oxidases. *Curr Opin Hematol*. 2002;9(1):11-7.
101. Lancaster GI, Febbraio MA: Exosome-dependent trafficking of HSP70 – a novel secretory pathway for cellular stress proteins. *J Biol Chem* 2005, 280(24):23349-55.
102. Laurindo FR, Fernandes DC, Amanso AM, Lopes LR, Santos CX. Novel role of protein disulfide isomerase in the regulation of NADPH oxidase activity: pathophysiological implications in vascular diseases. *Antioxid Redox Signal*. 2008;10(6):1101-13.
103. Laurindo FR, Pedro MA, Barbeiro HV, Pillegi F, Carvalho MHC, Augusto O, da Luz PL. Vascular free radical release ex vivo and in vivo evidence for a flow-dependent endothelial mechanism. *Circ Res*. 1994;74(4):700-9.
104. Le Pecq JB. Exosomes as a therapeutic cancer vaccine: from bench to bedside. *Blood Cells Mol Dis*. 2005;35(2):129-35.
105. Lepiller S, Laurens V, Bouchot A, Herbomel P, Solary E, Chluba J. Imaging of nitric oxide in a living vertebrate using a diaminofluorescein probe. *Free Radic Biol Med*. 2007;43(4):619-27.

106. Li JM, Shah AM. Endothelial cell superoxide generation: regulation and relevance for cardiovascular pathophysiology. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2004;287(5):R1014-30.
107. Li XB, Zhang ZR, Schluesener HJ, Xu SQ. Role of exosomes in immune regulation. *J Cell Mol Med*. 2006;10(2):364-75.
108. Liew FY, Xu D, Brint EK, O'Neill LAJ. Negative regulation of Toll-like receptor-mediated immune responses. *Nat Rev Immunol*. 2005;5(6):446-58.
109. Lin KT, Xue JY, Lin MC, Spokas EG, Sun FF, Wong PY. Peroxynitrite induces apoptosis of HL-60 cells by activation of a caspase-3 family protease. *Am J Physiol*. 1998;274(4 Pt 1):C855-60.
110. Los AP, van Baal J, de Widt J, Divecha N, van Blitterswijk WJ. Structure-activity relationship of diacylglycerol kinase theta. *Biochim Biophys Acta*. 2004;1636(2-3):169-74.
111. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin Phenol Reagent. *Journal of Biological Chemistry*. 1951;193(1):265-75.
112. Lum H, Roebuck K. Oxidant stress and endothelial cell dysfunction. *Am J Cell Physiol*. 2001;280(4):719-41.
113. Luo B, Regier DS, Topham MK, Prescott SM: Diacylglycerol kinases. *Cell Signal*. 2004;16(9):983-9.
114. Mackdonald J, Galley HF e Webster NR. Oxidative stress and gene expression in sepsis. *Br J Anesth*. 2003;90(2):221-32.
115. Magder S. Reactive oxygen species: toxic molecules or spark of life? *Crit Care Med*. 2006;10(1):208-15.
116. Mannick JB, Asano K, Izumi K, Kieff E, Stamler JS. Nitric oxide produced by human B lymphocytes inhibits apoptosis and Epstein-Barr virus reactivation. *Cell*. 1994 Dec 30;79(7):1137-46.
117. Mannick JB, Schonhoff CM. NO means No and Yes: regulation of cell signalling by protein nitrosylation. *Free Radic Res*. 2004; 38:1-7.
118. Matsuda N e Hattori Y. Vascular biology in sepsis: pathophysiological and therapeutic significance of vascular dysfunction. *J Smooth Muscle Res*. 2007;43(4):117-37.
119. McCord JM. The evolution of free radicals and oxidative stress. *Am J Med*. 2000; 108(8):652-9.

120. Meji JTA, Haselton CL, Hillman KL, Murlikrishnan D, Ebadi M, Yu L. Differential Mechanisms of Nitric Oxide- and Peroxynitrite-Induced Cell Death. *Molec Pharmacol*. 2004;66(4):1043-52.
121. Messmer UK, Brüne B. Nitric oxide induced apoptosis: p53-dependent and p53-independent signaling pathways. *Biochem J*. 1995; 319(1):299-305.
122. Mignot G, Roux S, Thery C, Ségura E, Zitvogel L. Prospects for exosomes in immunotherapy of cancer. *J Cell Mol Med*. 2006;10(2):376-88.
123. Miyake K. Innate recognition of lipopolysaccharide by Toll-like receptor 4-MD-2. *Trends Microbiol*. 2004;12(4):186-92.
124. Münzel T, Afanas'ev A, Kleschyov A, Harrison D. Detection of superoxide in vascular tissue. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002; 22(11):1761-8.
125. Myhre O, Andersen JM, Aarnes H, Fonnum F. Evaluation of the probes 2,7-dichlorofluorescein diacetate, luminol, and lucigenin as indicators of reactive species formation. *Biochem Pharmacol*. 2003;65(10):1575–8.
126. Nagase H, Okugawa S, Ota Y, Yamaguchi M, Tomizawa H, Matsushima K, Ohta K, Yamamoto K, Hirai K. Expression and function of Toll-like receptors in eosinophils: activation by Toll-like receptor 7 ligand. *J Immunol*. 2003;171(8): 3977-3982.
127. Nguyen HB, Rivers EP, Abrahamian FM, Moran GJ, Abraham E, Trzeciak S, Huang DT, Osborn T, Stevens D, Talan DA. Severe sepsis and septic shock: review of the literature and emergency department management guidelines. *Ann Emerg Med*. 2006;48(1):28-54.
128. O'Brien JM, Ali NA, Aberegg SK, Abraham E. Sepsis. *Am J Med*. 2007;120(12):1012-22.
129. Oldham KM, Bowen PE. Oxidative stress in critical care: Is antioxidant supplementation beneficial? *J Am Diet Assoc*. 1998;98:1001-8.
131. O'Neill LA, Bowie AG. The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol*. 2007;7(5):353-64.
132. Orrenius S. Reactive oxygen species in mitochondria-mediated cell death. *Drug Metab Rev*. 2007; 39(2-3):443-55.
133. Ott M, Gogvadze V, Orrenius S, Zhivotovsky B. Mitochondria, oxidative stress and cell death. *Apoptosis*. 2007;12(5):913-22.
134. Ottaviano FG, Handy DE, Loscalzo J. Redox regulation in the extracellular environment. *Circ J*. 2008;72:1-16.

135. Pan BT, Johnstone RM. Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro: selective externalization of the receptor. *Cell*. 1983;33(3):967-78.
136. Papathanassoglou EDE, Moynihan JA, Ackerman M. Does programmed cell death (apoptosis) play a role in the development of multiple organ dysfunction in critically ill patients? A review and a theoretical framework. *Crit Care Med*. 2000;28(2):537-49.
137. Parihar MS, Parihar A, Fujita M, Hashimoto M, Ghafourifar P. Mitochondrial association of alpha-synuclein causes oxidative stress. *Cell Mol Life Sci*. 2008;65(7-8):1272-84.
138. Peters K, Unger RE, Brunner J, Kirkpatrick CJ. Molecular basis of endothelial dysfunction in sepsis. *Cardiovasc Res*. 2003;60(1):49-57.
139. Petros AM, Olejniczak ET, Fesik SW. Structural biology of the Bcl-2 family of proteins. *Biochim Biophys Acta*. 2004;1644(2-3):83-94.
140. Pinsky MR, Vincent JL, Deviere J, Alegre M, Kahn RJ, Dupont E. Serum cytokine levels in human septic shock. Relation to multiple-system organ failure and mortality. *Chest*. 1993;103(2):565-75
141. Pohlman TH, Harlan JM. Human endothelial cell response to lipopolysaccharide, interleukin-1, and tumor necrosis factor is regulated by protein synthesis. *Cell Immunol*. 1989;119(1):41-52.
142. Raposo G, Nijman HW, Stoorvogel W, Liejendekker R, Harding CV, Melief CJ, Geuze HJ. B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J Exp Med*. 1996;183(3):1161-72.
143. Ray R, Shah AM. NADPH oxidase and endothelial cell function. *Clin Sci*. 2005;109(3):217-26.
144. Remick DG. Pathophysiology of Sepsis. *Am J Pathol*. 2007;170(5):1435-44.
145. Rey FE, Cifuentes ME, Kiarash A, Quinn MT, Pagano PJ. Novel competitive inhibitor of NADP(H) oxidase assembly attenuates vascular O₂- and systolic blood pressure in mice. *Circ Res*. 2001;8:408-14.
146. Ritcher C. Nitric Oxide and its congeners in mitochondria: implications for apoptosis. *Environ Health Perspect*. 1998;106(5):1125-30.
147. Ritcher C, Schweizer M, Cossarizza A, Franceschi C. Control of apoptosis by the cellular ATP level. *FEBS Lett*. 1996;378(2):107-10.

148. Rössig L, Fichtlscherer B, Breitschop K, Haendeler J, Zeiher a, Mülsch A, Dimmeler S. Nitric Oxide inhibits caspase-3 by S-nitrosation in vivo. *J Biol Chem.* 1999;274(11):6823-6.
149. Sabroe I, Jones E C, Usher L R, Whyte,M K, Dower S K. Toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 in human peripheral blood granulocytes: a critical role for monocytes in leukocyte lipopolysaccharide responses. *J Immunol.* 2002;168(9):4701-10
150. Sandor F, Buc M. Toll like receptors. I. Structure, Function and their ligands. *Folia Biol (Praha).* 2005a;51(5):148-56.
151. Sandor F, Buc M. Toll-like receptors. II. Distribution and pathways involved in TLR signalling. *Folia Biol. (Praha).* 2005b;51(6):188-197.
152. Satta N, Kruithof EK, Reber G, de Moerloose P. Induction of TLR2 expression by inflammatory stimuli is required for endothelial cell responses to lipopeptides *Mol Immunol.* 2008;46(1):145-57.
153. Schröder M, Bowie AG. TLR3 in antiviral immunity: key player or bystander? *Trends Immunol.*2005; 26: 462-8.
154. Segal AW. How neutrophils kills microbes. *Annu Rev Immunol.* 2005;23:197-223.
155. Sessler CN, Shepherd W. New concepts in sepsis. *Curr Opin Crit Care.* 2002;8(5):465-72.
156. Shiraki R, Inoue N, Kawasaki S, Takei A, Kadotani M, Ohnishi Y, Ejiri J, Kobayashi S, Hirata K, Kawashima S, Yokoyama M. Expression of Toll-like receptors on human platelets. *Thromb Res.* 2004;113(6):379-85.
157. Silva E, Pedro Mde A, Sogayar AC, Mohovic T, Silva CL, Janiszewski M, Cal RG, de Sousa EF, Abe TP, de Andrade J, de Matos JD, Rezende E, Assunção M, Avezum A, Rocha PC, de Matos GF, Bento AM, Corrêa AD, Vieira PC, Knobel E. Brazilian Sepsis Epidemiological Study (BASES study). *Crit Care.* 2004;8(4):R251-60.
158. Sogayar AMC, Machado FR, Rea-Neto A, Dornas A, Grion CMC, Lobo SMA, Tura BR, Silva CLO, Cal RGR, Beer I, Michels Júnior V, Safi Júnior J, Kayath M, Silva E. *Pharmacoeconomics.* 2008;26(5):425-34.
159. Soh N. Recent advances in fluorescent probes for detection of reactive oxygen species. *Anal Bioanal Chem.* 2006;386(3):532-43.
160. Štefanec T. Endothelial Apoptosis: could it have a role in the pathogenesis and treatment of disease? *Chest.* 2000; 117(3):841-54.

161. Stoorvogel W, Kleijmeer MJ, Geuze HJ, Raposo G. The biogenesis and functions of exosomes. *Traffic*. 2002;3(5):321-30.
162. Sullivan JC, Pollock JS. Coupled and uncoupled NOS: separate but equal? Uncoupled NOS in endothelial cells is a critical pathway for intracellular signaling. *Circ Res*. 2006;98(6):717-19.
163. Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors. *Ann Rev Immunol*. 2003;21:355-76.
164. Taniyama Y, Griendling KK. Reactive oxygen species in the vasculature: molecular and cellular mechanisms. *Hypertension*. 2003;42(6):1075-81.
165. Tarpey MM, Fridovich I. Methods of detection of vascular reactive species nitric oxide, superoxide, hydrogen peroxide and peroxynitrite. *Circ Res*. 2001;89:224- 36.
166. Thannickal, VJ; Fanburg BL. Reactive oxygen species in cell signaling. *A J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2000; 279(6):L1005-28.
167. Théry C, Boussac M, Veron P, Ricciardi-Castagnoli P, Raposo G, Garin J, Amigorena S. Proteomic analysis of dendritic cell-derived exosomes: A secreted subcellular compartment distinct from apoptotic vesicles. *J Immunol*. 2001;166(12):7309–18.
168. Théry C, Zitvogel L, Amigorena S. Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nat Rev Immunol*. 2002;2(8):569-79.
169. Toth B, Lok CAR, Böing A, Diamant M, Van der Post JAM, Friesse K, Nieuwland R. Microparticles and exosomes: impact on normal and complicated pregnancy. *Am J Reprod Immunol*. 2007;58(5):389-402.
170. Triantafilou M, Triantafilou K. Lipopolysaccharide recognition: CD14, TLRs and the LPS-activation cluster. *Trends Immunol*. 2002;23(6):301-4.
171. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*. 2007;39(1):44-84.
172. Van Engeland M, Nieland LJW, Ramaekers FCS, Schutte B, Reutelingsperger CPM. Annexin V-Affinity Assay: A review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. *Cytometry*. 1998;31(1):1-9
173. Vasselon T, Detmers PA. Toll receptors: A central element in innate immune responses. *Infect Immun*. 2002; 70(3):1033-41.

174. Venter JC, Buonassisi V. Hormone and Neurotransmitter receptors in an established vascular endothelial cell line. *Proc natl Acad Scien USA*. 1976;73(5):1612-6.
175. Victor VM, Rocha M, De la Fuente, M. Immune cells: free radicals and antioxidants in sepsis. *Int Immunopharmacol*. 2004;4(3):327-47.
176. Volk T, Kox WJ. Endothelium function in sepsis. *Inflamm Res*. 2000; 49(5):185-198.
177. Wen-Jye L, Wen-Chen Y. Implication of toll-like receptor and tumor necrosis factor a signaling in septic shock. *Shock*. 2005; 24(3):206-9.
178. Winn RK, Harlan JM. The role of endothelial cell apoptosis in inflammatory and immune disease. *J Thromb Haemost*. 2005; 3(8):1815-24.
179. Wolfers J, Lozier A, Raposo G, Regnault A, Théry C, Masurier C, Flament C, Pouzieux S, Faure F, Tursz T, Angevin E, Amigorena S, Zitvogel L. Tumor-derived exosomes are a source of shared tumor rejection antigens for CTL cross- priming. *Nat Med*. 2001;7(3):297-303.
180. Wort SJ, Evans TW. The role of endothelium in modulating vascular control in sepsis and related conditions. *Br Med Bull*. 1999;55(1):30-48.
181. Wulf D. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev*. 2002; 82:47-95.
182. Zanon F, Caovilla JJ, Michel RS, Cabeda EV, Ceretta DF, Luckemeyer GD, Beltrame C, Posenatto N. Sepsis na unidade de terapia intensiva: etiologias, fatores prognósticos e mortalidade. *RBTI*. 2002;20(2):128-34.
183. Zhu C, Wang X, Qiu L, Peeters-Scholte C, Hagberg H, Blomgren K. Nitrosylation precedes caspase-3 activation and translocation of apoptosis-inducing factor in neonatal rat cerebral hypoxia-ischaemia. *J Neurochem*. 2004;90(2):462-71.
184. Zitvogel L, Regnault A, Lozier A, Wolfers J, Flament C, Tenza D, Ricciardi-Castagnoli P, Raposo G, Amigorena S. Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: dendritic cell-derived exosomes. *Nat Med*. 1998;4(5):594-600.