

Edielle de Sant'Anna Melo

**Alterações de expressão gênica na tolerância
ao LPS : Análise da participação dos linfócitos
B na regulação gênica da tolerância**

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

Área de concentração: Emergências Clínicas

Orientador: Prof. Dr. Francisco Garcia Soriano

**São Paulo
2007**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Melo, Edielle de Sant'Anna

Alterações de expressão gênica na tolerância ao LPS : análise da participação dos linfócitos B na regulação gênica da tolerância / Edielle de Sant'Anna Melo. São Paulo, 2007.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Departamento de Clínica Médica.

Área de concentração: Emergências Clínicas.

Orientador: Francisco Garcia Soriano.

Descritores: 1.Sepse 2.Lipopolissacarídeos 3.Expressão gênica 4.Linfócitos B 5.Camundongos 6.

USP/FM/SBD-384/07

À minha mãe, Laura, e ao meu pai, Maurício, por todo o apoio, carinho e amor em todas as etapas da minha vida. E por ter me proporcionado a oportunidade de conquistar o mais valioso de todos os bens, a cultura. Meu eterno agradecimento.

Esse trabalho é dedicado a vocês.

Aos meus irmãos, André e Frederico, por toda a amizade, carinho e paciência, e principalmente, por todo o apoio nos momentos mais difíceis.

Ao meu noivo, Rodrigo, por todo o amor, carinho, respeito, paciência e por estar presente em todos os momentos.

Agradecimientos

Ao Prof. Dr. Francisco Garcia Soriano, pela orientação, apoio e dedicação. Determinado, com talento e entusiasmo acompanhou-me em todos os momentos, transmitindo estímulo diário. Foi incansável e responsável por tornar realidade este trabalho.

Ao Prof. Dr. Irineu Tadeu Velasco, pela oportunidade e confiança no desenvolvimento deste trabalho. Pelo apoio nos momentos difíceis e pelos valiosos conselhos.

Ao Prof. Dr. Heraldo Possolo de Souza, pela colaboração e pelas discussões que muito contribuíram para o enriquecimento deste.

Ao Prof. Dr. Rui Curi, pela amizade, atenção e pela oportunidade de desenvolver parte deste trabalho em seu laboratório.

Ao Prof. Dr. Dewton de Moraes Vasconcelos, pela valiosa colaboração no exame de qualificação deste trabalho, pelos conselhos e sugestões e pela oportunidade de desenvolver parte deste trabalho em seu laboratório.

Às amigas Goretti Duarte e Yara Corradini, pelo apoio e empenho nos momentos difíceis, pelo carinho e por tornar possível esta defesa de tese.

À Renata, pela amizade, apoio e principalmente pela excelência na ajuda do experimento de macroarray.

Aos amigos do Laboratório de Emergências Clínicas- LIM-51: Ana, Clara, Cristiane, Daniella, Ester, Flávia, Luís, Luís Godoy, Maria Carolina, Mariana, Meriângela, Nancy, Paola, Ricardo, Tadeu, Tatiana e Themis, pelo carinho, amizade e apoio em todos os momentos.

Aos amigos e funcionários do Laboratório de Emergências Clínicas- LIM-51: Hermes, Denise, Márcia, Sueli, Fátima, Kelli e Geraldo, pelo apoio técnico, pela amizade e pela agradável convivência.

Às amigas e funcionárias da Secretaria de Pós-graduação da Disciplina de Emergências Clínicas-HC FMUSP: Angélica e Rose, pela atenção, apoio e amizade.

Aos funcionários do Biotério: Antônio, Luciano e Valdecir pelo cuidado com os animais utilizados em nossos estudos.

À FAPESP (Processos: 04/07168-5 e 02/07430-6) pelo suporte financeiro.

A Deus, que tornou tudo isso possível.

“Cultivem o espírito crítico. Se deixado de lado, ele não desperta idéias, nem estimula a grandes coisas. Sem ele, nada tem valor. Ele tem sempre a última palavra. Isso que lhes peço é o que, por sua vez, vocês devem pedir aos discípulos que vão formar, é o que há de mais difícil para o inventor. Acreditar que se encontrou um fato científico importante, sentir um desejo ardente de anunciá-lo, e ser obrigado durante dias, semanas e até durante anos a combater a si próprio, esforçando-se para desmentir suas próprias experiências e só proclamar sua descoberta quando se esgotarem todas as hipóteses contrárias, sim, é uma tarefa árdua. Porém, quando depois de tantos esforços chega-se, finalmente, à certeza, sentimos uma das maiores alegrias que a alma humana pode experimentar...”

Louis Pasteur

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Resumo

Summary

1. Introdução	1
1.1 Sepses	2
1.2 LPS e inflamação	4
1.3 Mecanismos moleculares de ação do LPS	7
1.4 Tolerância ao LPS	10
1.5 Linfócitos B na tolerância.....	12
1.6 Expressão gênica e sepses.....	15
2 . Objetivos.....	17
2.1 Objetivo Geral.....	18
2.2 Objetivos específicos.....	18
3. Métodos	20
3.1 Indução de tolerância ao LPS.....	21
3.2 Análise das Citocinas por ELISA	21
3.3 Separação das células através de Separadores Magnéticos	22
3.4 Produtos de reação do ácido barbitúrico (TBARS).....	23
3.5 Técnica de “macroarray”.....	24
3.5.1 Obtenção do RNA total.....	25
3.5.2 Tratamento com Dnase	25
3.5.3 Quantificação e avaliação da integridade do RNA total....	26
3.5.4 Síntese da sonda de cDNA	26
3.5.5 Purificação da sonda marcada	27
3.5.6 Hibridização.....	28
3.5.7 Análise dos resultados	28

3.6	Confirmação por RT-PCR.....	29
3.6.1	Desenho das seqüências dos “primers”	29
3.6.2	Reação de transcrição reversa (RT).....	29
3.6.3	Avaliação dos parâmetros da reação em cadeia pela polimerase –PCR	30
3.6.4	Análise do produto de PCR	31
3.7	Western Blotting	32
3.8	Atividade da caspase1.....	33
3.9	Quantificação dos processos apoptóticos (método de anexina V/ iodeto de propídeo com análise em citometria de fluxo)	33
4.	Resultados.....	36
4.1	Estudo de Mortalidade-Curvas de Mortalidades.....	37
4.1.1	LPS dose letal	37
4.2	Análise das Citocinas	38
4.2.1	TNF- α	38
4.2.2	IL10	39
4.2.3	IL6	39
4.2.4	IL 1 β	40
4.2.5	MIP2	41
4.3	Resultados da análise da expressão do RNAm por RT-PCR.....	42
4.3.1	IL10	42
4.3.2	TNF- α	43
4.3.3	IL1- β	43
4.4	Efeito da Tolerância ao LPS nos níveis de TBARS	44
4.5	Técnica do Macroarray	45
4.6	Análise dos genes	46
4.7	Genes relacionados à apoptose	49
4.8	RT-PCR.....	50
4.8.1	Caspase 3	50
4.8.2	Bax	50
4.8.3	Bcl2	51
4.9	Western Blotting	52
4.9.1	Bcl2	52
4.9.2	Caspase 2	52
4.9.3	Bax	53

4.10 Atividade da caspase 1.....	54
4.11 Citometria de Fluxo.....	55
5. Discussão	57
5.1 Mediadores inflamatórios envolvidos na sepse	58
5.1.1 Citocinas	58
5.1.2 Óxido Nítrico	62
5.1.3 Estresse oxidativo	65
5.2 Heat Shock Proteins	66
5.3 Apoptose	68
5.3.1 Seps e Apoptose	68
5.3.2 Apoptose e seus mecanismos.....	69
5.3.3 Mecanismos apoptóticos na sepse.....	73
5.3.4 A Tolerância ao LPS inibe a apoptose	75
5.4 Outros genes envolvidos no processo séptico	76
6. Conclusões.....	78
7. Referências.....	80

Apêndice

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μg	Micrograma
μl	Microlitro
μM	Micromolar
μm^2	micrômetros quadrados
BSA	do inglês “Bovine Serum Albumin” traduzido como albumina sérica bovina
Ca^{2+}	íon cálcio
CD	do inglês “Cluster of Differentiation” traduzido como conjuntos de diferenciação
cDNA	do inglês “Complementary DNA” traduzido como DNA complementar
DAB	diaminobenzidina
DNA	do inglês “Deoxyribonucleic Acid” traduzido como ácido dextrribonucléico
dNTP	do inglês “Deoxyribonucleotide triphosphate” traduzido como desoxirribonucleotídeo trifosfatado
DO	densidade óptica
EDTA	do inglês “ethylenediamine-tetra acetic acid” traduzido como ácido etilenodiamino tetra acético
ERK	do inglês “Extracellular Signal-Regulated Protein Kinase” traduzido como proteína quinase regulada por sinal extracelular
EROs	espécies reativas de oxigênio
HCl	ácido clorídrico
HSPs	do inglês “Heat Shock Protein” traduzido como proteínas ativadas por choque térmico
HSRs	do inglês “Heat Shock Response” traduzido como proteínas liberadas em resposta ao choque térmico

ICAM-1	do inglês “Intercellular Adhesion Molecule-1” traduzido como molécula de adesão intercelular-1
IL	interleucina
KDA	Kilodalton
PBP	Proteína ligadora de Lipopolissacáride
LPS	Lipopolissacáride
LC	Ligadura Cecal
M	molar
MAPK	do inglês “Mitogen-Activated Protein Kinase” traduzido como proteína quinase ativada por mitógeno
MDA	malondialdeído
MEC	matriz extracelular
MEC	matriz extra celular
mg	miligramas
mg/ml	miligramas por mililitros
Mg ²⁺	íon magnésio
mM	milimolar
MPO	mieloperoxidase
NaN ₃	azida sódica
NIH	do inglês “National Institute of Health”
PAF	do inglês “Platelet Activating Factor” traduzido como fator ativador de plaquetas
pb	pares de bases
PBS	do inglês “Phosphate-buffered saline” traduzido como tampão salina fosfato
pH	cologarítimo da concentração hidrogeniônica de uma solução
PMN	polimorfonuclear

pmol	picogramas por mol
PMSF	do inglês “Phenylmethylsufonil fluoride”
RNAm	RNA mensageiro
rRNA	do inglês “Ribosomal Ribonucleic Acid” traduzido como ácido ribonucléico ribossomal
RT-PCR	do inglês “Reverse Transcriptase – Polymerase Chain Reaction” traduzido como transcrição reversa-reação em cadeia da polimerase.
SARA	do inglês “Acute Respiratory Distress Syndrome” traduzido como síndrome da angústia respiratória aguda
SDS page	do inglês “Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis” traduzido como eletroforese em gel de poliacrilamida, tendo como agente denaturante sulfato dodecil sódico.
SIRS	do inglês “Systemic Inflammatory Response Syndrome” traduzido como síndrome da resposta inflamatória sistêmica
TBST	do inglês “Tris-Buffered Saline Tween 20” traduzido como tampão salina Tris-HCl suplementado com Tween 20
TEMED	tetrametiletenonodiamino
TGF- β	do inglês “Transforming Growth Factor “
TNF	do inglês “Fator de Necrose Tumoral”

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura esquemática dos padrões moleculares associados a patógenos	4
Figura 2: Liberação sistêmica excessiva de citocinas pró-inflamatórias	9
Figura 3: Tolerância e Resposta Inata	11
Figura 4: Curvas de mortalidades para um período de observação de 12 horas.....	37
Figura 5: Análise das concentrações nos grupos controles e tolerantes para a citocina TNF- α	38
Figura 6: Análise das concentrações nos grupos controles e tolerantes para a citocina IL10.....	39
Figura 7: Análise das concentrações nos grupos controles e tolerantes para a citocina IL6.....	39
Figura 8: Análise das concentrações nos grupos controles e tolerantes para a citocina IL1- β	40
Figura 9: Análise das concentrações nos grupos controles e tolerantes para a citocina MIP2	41
Figura 10: Análise das concentrações nos grupos controles e tolerantes para IL10-RT-PCR.....	42
Figura 11: Análise das concentrações nos grupos controles e tolerantes para TNF- α -RT-PCR.....	43
Figura 12: Análise das concentrações nos grupos controles e tolerantes para IL1 β -RT-PCR.	43
Figura 13: Análise do MDA no Plasma	44
Figura 14: Macroarray	45
Figura 15: RT-PCR Caspase 3	50

Figura 16: RT-PCR Bax	50
Figura 17: RT-PCR Bcl2	51
Figura 18: Western Blotting Bcl2.....	52
Figura 19: Western Blotting Caspase 2	52
Figura 20: Western Blotting Bax	53
Figura 21: Atividade Caspase 1	54
Figura 22: Citometria de Fluxo- Linfócitos- Apoptose	55
Figura 23: Citometria de Fluxo- Linfócitos- Necrose	55
Figura 24: Curva de mortalidade para um período de 30 dias de observação	56
Figura 25: Representação esquemática dos eventos apoptóticos.....	72
Figura 26: Representação dos eventos apoptóticos na sepse	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Tabela de genes.....	46
Tabela 2: Tabela de genes envolvidos no processo apoptótico.....	49

RESUMO

Melo ES. *Alterações de expressão gênica na tolerância ao LPS : Análise da participação dos linfócitos B na regulação gênica da tolerância* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2007. 86p.

A sepse é causada por microorganismos tais como: bactérias Gram-negativas, Gram-positivas, fungos e vírus. A sepse grave e o choque séptico estão associados a taxas de mortalidade de 40 a 60%. O evento mais importante para a evolução do quadro séptico é a apoptose das células efetoras do sistema imune. A eliminação de um grande número de células do sistema imune compromete a defesa efetiva do hospedeiro. Para estudarmos o papel das células imunes na sepse utilizamos o modelo de tolerância ao LPS. Em nossos estudos induzimos tolerância ao LPS em camundongos Balb-C e analisamos os padrões da expressão gênica nos linfócitos do baço. Para o mapeamento dos genes, utilizamos o macroarray, identificamos o grupo funcional de genes que tem maior relevância na proteção induzida pela tolerância, e em seguida confirmamos os resultados encontrados através do RT-PCR, Western Blotting, atividade de caspase 1 e citometria de fluxo. Encontramos uma importante redução na expressão de genes, como heat shock proteins, óxido nítrico e apoptose. Após análise da membrana contendo os genes integradores da resposta produzida pela tolerância, optamos por enfatizar inicialmente os genes envolvidos no processo apoptótico devido à relevância deste processo no quadro séptico conforme mostraram os trabalhos encontrados na literatura. Demonstramos que animais tolerantes ao LPS apresentam diminuição dos eventos apoptóticos, com redução na expressão dos genes ligados às caspases 7, 8 e 11, assim como a redução dos genes ligados ao Bid e Apaf-1. Ao analisarmos o RNAm através do RT-PCR, encontramos redução na Caspase 3, Bax e Bcl2, resultado que se confirmou ao analisarmos a expressão protéica através do Western- Blotting. Realizamos citometria de fluxo para avaliarmos a ocorrência de apoptose nos linfócitos dos animais submetidos à ligadura cecal. Confirmamos uma redução da apoptose e necrose em linfócitos dos animais tolerantes em relação aos controles. Com estes resultados podemos propor que a tolerância seria benéfica na redução da apoptose e controle do quadro séptico, além disso, a diminuição na expressão do gene ligado à caspase 11 estaria contribuindo para a diminuição do quadro inflamatório, pois a caspase 11 é um mediador essencial na resposta ao choque séptico.

Descritores: 1.Sepse 2.Lipopolissacarídeos 3.Expressão Gênica
4.Linfócitos B 5.Camundongos

SUMMARY

Melo ES. *Genic expression alterations in the tolerance to LPS : B lymphocyte in the genic regulation of the tolerance* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2007. 86p.

Sepses are caused by microorganisms such as: Gram-negative bacteria, Gram-positive bacteria, fungus and virus. Several sepses and the septic shock have been associated with the mortality rates from 40 to 60%. One of the most important events for the septic evolution is the apoptosis cells of the immune system. The cells immune system elimination compromises the host. We induced LPS tolerance in Balb-C mice and analyzed genes expressions in spleens; we found an important reduction in the genes expressions like: heat shock proteins, nitric oxide and apoptosis. After analysis of the membrane containing the sepses genes produced by tolerance, we emphasized initially the genes involved in the apoptosis. Demonstrated that animals LPS tolerants presented decrease in apoptotic events, with reduction in the genes expression related caspases 7, 8, 11, Bid and Apaf-1. In the mRNA by RT-PCR, we found a reduction in Caspase 3, Bax and Bcl2, and these results were confirmed by Western-blot. We realized flow cytometry and we showed that the results are maintained, presenting reduction in both the apoptotic and necrotic events in tolerants animals. These results showed that the tolerance would be favorable in the apoptosis reduction and control of the sepsis, moreover, the expression reduction to caspase 11 genes would be contributing to the inflammatory reduction because Caspase 11 is an essential mediator in the septic shock.

Descriptors: 1.Sepsis 2.Lipopolysacharides 3.Gene expression
4.B-lymphocytes 5.Mice

1. Introdução

1.1 Sepses

A sepsis é causada por microorganismos tais como: bactérias Gram-negativas, Gram-positivas, fungos e vírus. A sepsis grave e o choque séptico estão associados a taxas de mortalidade de 40 a 60% [1]. A sepsis representa um subgrupo da síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS) que ocorre em associação com grande variedade de eventos não infecciosos, como por exemplo: politraumatismo, cirurgia, pancreatite e queimaduras [3-5]. Praticamente todos os pacientes com sepsis apresentam disfunção de pelo menos um órgão na evolução da doença. Aproximadamente 10-15% dos pacientes críticos que necessitam admissão na unidade de tratamento intensivo (UTI) sofrem de sepsis [6, 7]. Em contraste, até 70% de admissões na UTI desenvolvem SIRS. A sepsis, SIRS e choque séptico juntos representam a causa mais importante de morte em UTI de adultos com mortalidade associada de 30-45%. As bactérias Gram-positivas e Gram-negativas são as responsáveis na maioria dos casos da sepsis (36% e 35%, respectivamente), no entanto, a progressão da doença não é influenciada pela natureza da bactéria causadora. Quando o choque séptico se instala ocorre hipotensão arterial sistêmica e este estado pode progredir para falência de múltiplos órgãos e sistemas [7-10].

A mortalidade não tem se modificado nas últimas duas décadas apesar do desenvolvimento de novos antibióticos e aprimoramento de medidas de tratamento intensivo. O tratamento permanece de suporte e direcionado para o controle da infecção e correção de distúrbios hemodinâmicos [7-10]. As estratégias novas para o tratamento da sepse foram focadas em inibidores da endotoxina (anticorpos anti-endotoxina), em inibidores de citocinas (TNF) e em bloqueadores de produção de substâncias vasoativas (óxido nítrico) [11]. Apesar do considerável investimento para avaliação de novos medicamentos, a maioria desses não demonstrou qualquer benefício em diminuir a mortalidade em ensaios clínicos "randomizados". Entretanto, os resultados de ensaios com proteína C ativada no tratamento dos pacientes com inflamação sistêmica e falência dos órgãos parecem promissores [12].

A resposta sistêmica a infecção é mediada através de citocinas produzidas por macrófagos, que estimulam receptores de órgãos alvo em resposta a infecção. As citocinas são mediadores primários ou secundários. Os mediadores primários são o fator de necrose tumoral- α (TNF- α), interleucina 1 (IL-1), IL-6, e IL-8 [13-17]. Estes mediadores estimulam a liberação de mediadores secundários tais como outras citocinas, derivados do ácido araquidônico (PGE2, TXA2), fator ativador de plaqueta (PAF); peptídeo vasoativo tais como bradicinina, angiotensina, peptídeo intestinal vasoativo; aminas tais como histamina e serotonina; e uma variedade de produtos derivados do complemento [1].

A SIRS é um processo contínuo caracterizado por uma resposta anormal generalizada do hospedeiro atingindo órgãos remotos ao insulto. A resposta de citocinas é regulada por uma intrincada rede de mediadores, que

mantêm a resposta inflamatória inicial sob controle através de redução da produção e contrabalanço dos efeitos de citocinas já produzidas. Em alguns pacientes é difícil restabelecer a homeostasia e neste estágio o controle é perdido ocorrendo uma intensa reação inflamatória [9, 18, 19].

1.2 LPS e inflamação

O LPS de várias famílias microbianas gram-negativas é constituído do mesmo princípio arquitetônico; uma porção de polissacarídeo ligado covalentemente com o lipídeo A (LA) (Fig. 1).

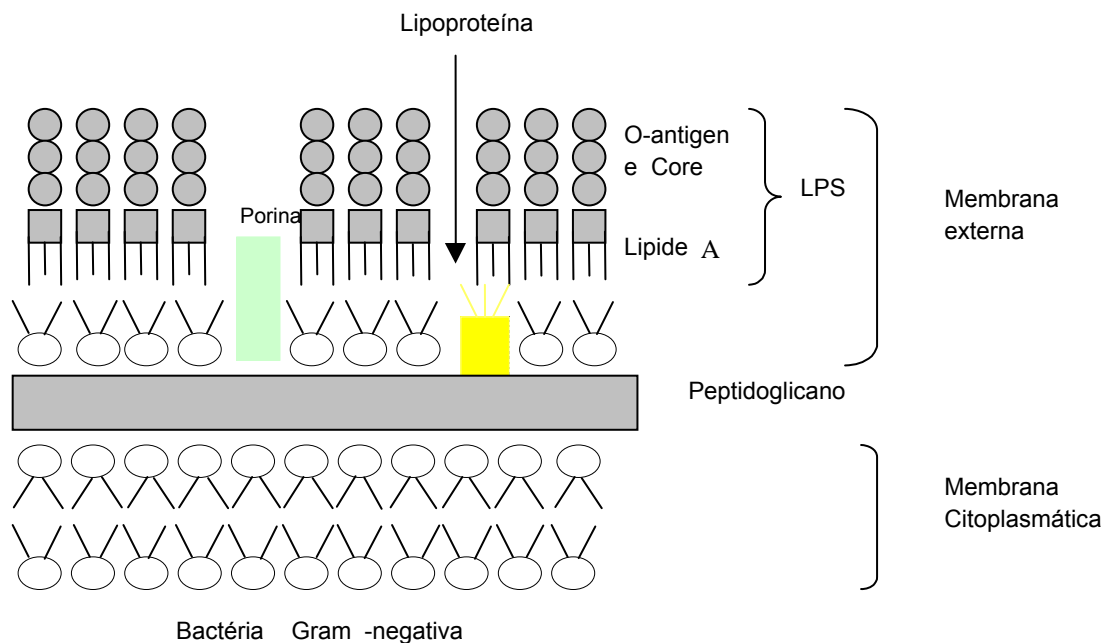


Figura1: Estrutura esquemática dos padrões moleculares associados a patógenos

A cadeia O é característica e única para cada sorotipo bacteriano, tornando-se, então, um importante fator da virulência. O LA representa o princípio endotóxico do LPS. De acordo com o conhecimento presente, é o LA bioativo, como um anfifílico, em meio aquoso, forma micelas e em condições fisiológicas, apresenta-se exclusivamente em estrutura não laminar, mas cúbica ou hexagonal. Entretanto, a atividade endotóxica é mediada pelas moléculas singulares com conformação peculiar [20].

Há dados da literatura propondo que a sepse é caracterizada por curto período da “síndrome de resposta inflamatória sistêmica” e seguido por um sustentado período de imunossupressão e antiinflamação chamado “síndrome da resposta antiinflamatória compensatória” (CARS). Outros autores propõem que a SIRS prossegue pela liberação de citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF- α , IL-1 β e outras, sobreposta a CARS. A CARS é caracterizada por defeito em apresentação de antígeno, “paralisia” de macrófagos, anergia de células T, supressão de proliferação de células T, diminuição da proliferação de células Th1 e aumento de apoptose das células B e T. Muitos dos efeitos da fase CARS são mediados pela IL-10 [21].

A maioria das respostas imunes é realizada pela sucessão dos mecanismos inatos e adaptativos, ou seja, nas fases iniciais da infecção há um predomínio das respostas inatas e nas fases mais tardias os linfócitos passam a gerar respostas imunes adaptativas. A principal diferença entre estes dois tipos de resposta é que a resposta imune adaptativa é altamente específica e é memorizada. A expansão clonal dos linfócitos em resposta a um agente infeccioso é absolutamente necessária para geração de uma

resposta imune eficiente. O desenvolvimento de clones diferenciados em células efectoras leva de 3 a 5 dias. Este período de tempo é o bastante para que as bactérias produzam sérios danos ou a morte do hospedeiro. Os linfócitos “memorizam” a estrutura do agente agressor e passam a responder mais rápida e eficientemente no caso de haver uma reinfecção pelo mesmo patógeno. Por outro lado, os mecanismos efetores da imunidade inata (peptídeos antimicrobianos, fagócitos e via alternativa do complemento) são ativados imediatamente depois da invasão. A resposta imunológica inata utiliza sistemas de reconhecimento primitivos e inespecíficos, que permitem sua ligação a muitos produtos microbianos [22]. Estas estruturas estão referidas como “padrões moleculares associados à patógenos” (PAMPs) (p.ex. LPS, peptidoglicano, ácidos lipoteicóicos, mannanos, DNA das bactérias, RNA de dupla-fita e glucanos), e os receptores do sistema da imunidade inata que estão envolvidos no reconhecimento dos PAMPs são chamados receptores de reconhecimento do padrão (PRR). Eles estão expressos em muitas células efectoras do sistema inato, tais como neutrófilos polimorfonucleares, macrófagos, células dendríticas e células B – as células “profissionais” de apresentação de antígeno. Os LPS-PRRs reconhecem LPS, encontrado exclusivamente em bactérias gram- negativas e “alertam” o sistema imunológico sobre a presença das bactérias [18]. Os sinais induzidos com o reconhecimento pelo sistema imune inato, em consequência, controlam a ativação da resposta imune adaptativa. O sistema imune adaptativo responde ao patógeno somente depois que este é reconhecido pelo sistema imune inato.

1.3 Mecanismos moleculares de ação do LPS

Depois da entrada do LPS na corrente sangüínea, pelo menos duas proteínas, LBP e CD14, competem para a ligação com esta macromolécula tóxica, com conseqüências contrastantes para o hospedeiro. A ligação do LPS a LBP sérica facilita a transferência de LPS para CD14, HDL e proteínas séricas (lipoproteínas, lipoproteínas ricas em triglicerídeos) aumentando a atividade de LPS e lipídeo A. A septina também atua como um amplificador biológico do LPS. Por outro lado, quando LPS é transferido para lipoproteínas, o seu efeito tóxico é neutralizado e a resposta inflamatória no hospedeiro é efetivamente interrompida. Depois da associação com fatores séricos, LPS interage com receptores expressos pelas células alvo da endotoxina, tais como, granulócitos, linfócitos, células endoteliais e, em particular, monócitos/macrófagos.

O CD14 é uma proteína superficial de monócitos que facilita a ativação celular induzida pelo LPS. O CD14 participa na apresentação de LPS para o receptor similar ao Toll like tipo 4 (TLR4), ativando posteriormente os leucócitos para a secreção de citocinas e inicia uma resposta inflamatória aguda. Outra proteína, MD-2, é necessária para reconhecimento de LPS via TLR4 [23]. Os receptores como TLRs induzem CD80 ou CD86 a aparecer em células apresentadoras de antígeno. A célula T recebe sinais para ativação só se o seu receptor se ligar ao PAMP/LPS (sinal de co-estimulação) e se um outro receptor de antígeno reconhecer LPS em forma de uma molécula ligada ao complexo principal de

histocompatibilidade do próprio organismo (MHC) de classe II. Reconhecimento de LPS na ausência de moléculas CD80, CD40 ou CD86 resulta em permanente inativação, apoptose ou tolerância de células T. Assim, este mecanismo assegura que, normalmente, somente células T específicas para determinado patógeno sejam ativadas. Além disso, o ambiente das citocinas (IL-12) secretadas pelas células apresentadoras de antígenos determina a sub-população de células T a ser produzida a partir das células Th0. Depois da ativação, as células T auxiliares tipo 1 (Th1) (possivelmente, também tipo 3) controlam outras unidades de imunidade adaptativa, tais como ativação de células T citotóxicas, células B e macrófagos [14]. A resposta resultante integra a defesa do hospedeiro. O evento central na cascata fisiopatológica da sepse é uma liberação sistêmica excessiva de citocinas pró-inflamatórias, tais como, $TNF\alpha$, interleucinas (IL)-1, IL-6, IL-12, IL-18, e interferon- γ ($INF\gamma$) em resposta ao LPS (Fig 2).

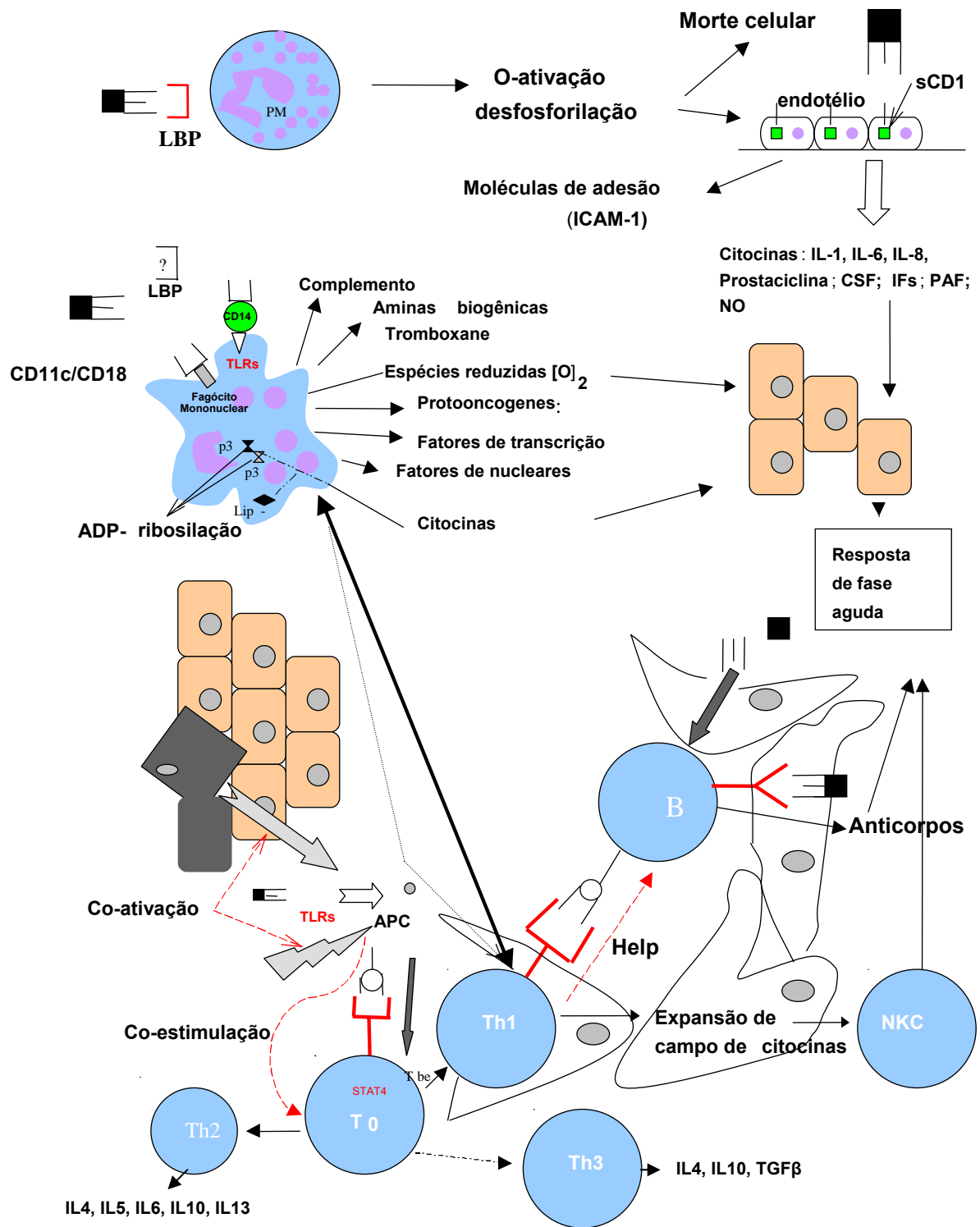


Figura 2: Liberação sistêmica excessiva de citocinas pró-inflamatórias

Estas citocinas ativam sistemas celulares (fagócitos e endotélio) e humoral (rotas de coagulação e ativação de complemento, mediadores de baixo peso molecular) os quais são primariamente orientados para eliminação de bactérias invasoras, mas ocasionalmente se tornam em inflamação generalizada auto-destrutiva com consecutiva falência de múltiplos órgãos. Mecanismos de disfunção de órgãos na sepse dependem do evento fisiopatológico inicial e as condições do paciente [24, 25].

1.4 Tolerância ao LPS

A resistência ao LPS pode ser determinada geneticamente ou adquirida. Animais de experimentação submetidos a exposição prévia a doses sub-letais de LPS pode induzir um estado de resistência adquirida e tornar estes animais resistentes a doses letais, pirogênicas e metabólicas de LPS. O fenômeno da interrupção da mortalidade associada com LPS, ou então chamado como tolerância a endotoxina, não é específico à ação de LPS e apresenta reação cruzada com outros estímulos, tais como, peptidoglicano, lipoproteína das bactérias, estresse hipertérmico, ácido lipoteicoico, micobacterium, muramil dipeptideo, 25-hidroxi-colesterol, estresse cirúrgico, isquemia, TNF e IL-10 [26, 27]. As fases inicial e tardia de tolerância com características diferentes seguem a injeção inicial do LPS. A fase inicial pode ser detectada dentro das primeiras 24 horas depois de exposição ao LPS e pode durar até 8 dias. A tolerância ao LPS relaciona-se à produção e

liberação reduzidas de citocinas pelos fagócitos em re-exposição ao LPS. Além disso, foi demonstrado que a exposição prévia ao LPS resulta em alteração de padrão de expressão gênica das citocinas (Fig. 3) [28].

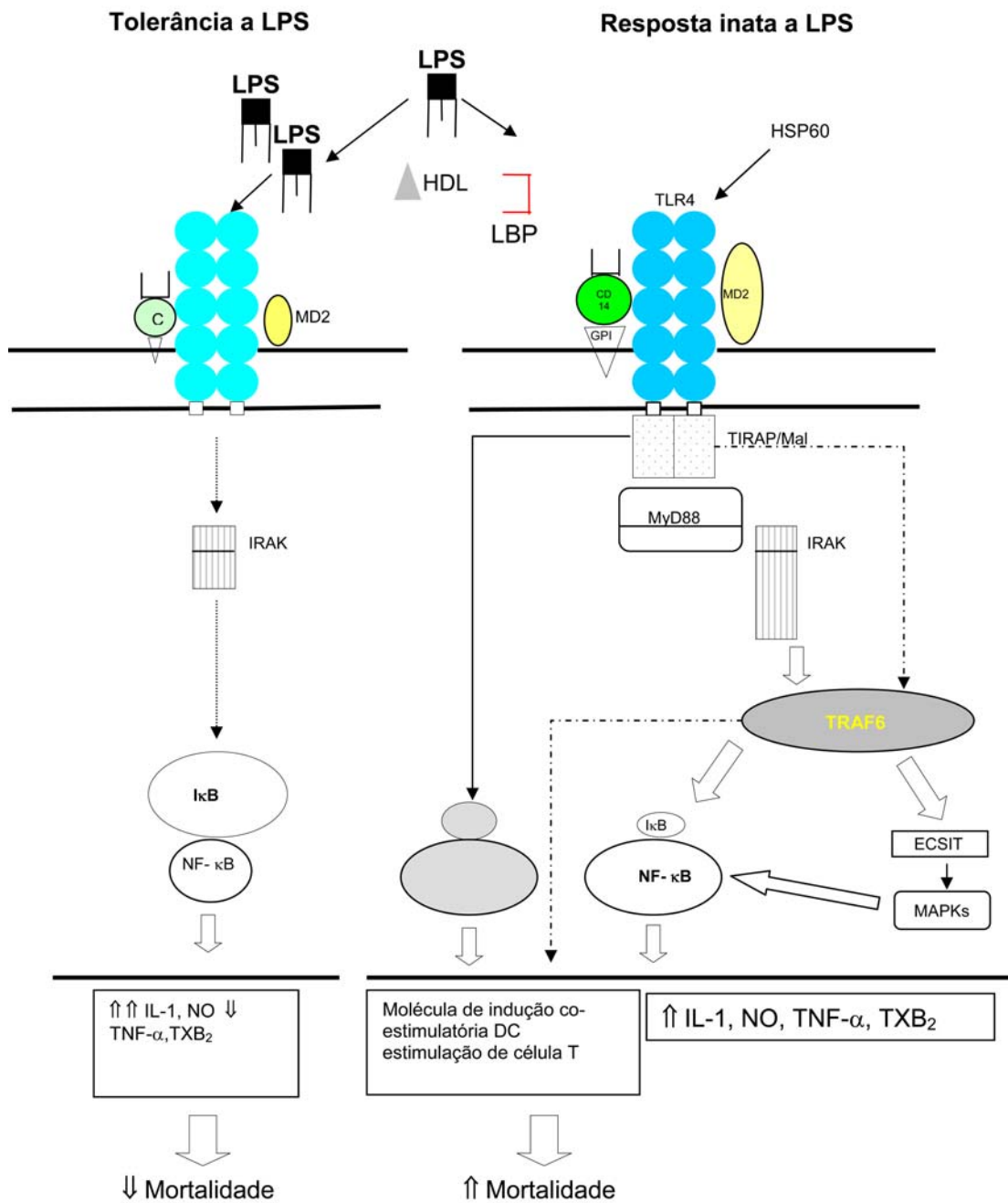


Figura 3: Tolerância e Resposta Inata

Parece que a tolerância a endotoxina resulta de alterações em rotas de transdução de sinal induzidas pelo LPS. Inicialmente foi proposto que a tolerância seria uma resposta imune benéfica, entretanto as evidências indiretas sugerem-na como um marcador ou participante de desregulação imune, complicando o manejo de pacientes em sepse grave.

1.5 Linfócitos B na tolerância

Linfócitos B não têm apenas papel central na produção e amplificação das respostas imunes humorais, também têm papel importante como células apresentadoras de antígenos (APCs) na geração de linfócitos T, mediando as respostas imunes. Linfócitos B ativados expressam altos níveis de MHC classe II e moléculas associadas à ativação de células T, levando à apresentação efetiva dos antígenos à estas células. Embora células detriticas e macrófagos promovam a diferenciação de células Th1 antígenos-específicas, a apresentação do antígeno pelas células B geralmente induz anergia das células T e promovem a diferenciação de células T em células com fenótipo Th2. Assim, as células B têm duplo papel na modulação das células T e podem contribuir para a manutenção da homeostasia imunológica [29].

Linfócitos B são conhecidos pelo seu importante papel na ativação de células T CD4 e na geração da imunidade humoral, também exercem efeitos regulatórios na resposta das células T CD8+ ; porém este fenômeno

não é muito conhecido. Embora, a literatura sugira que linfócitos B atenuem a resposta das células T CD8+, os linfócitos B são conhecidos por potencializarem as respostas das células T CD8+. Isto ocorre porque as células B inibem a indução da imunidade tumoral dependente de célula T, no qual células T CD8 restritas à classe I exercem papel principal na erradicação do tumor. Embora células B expressem moléculas co-estimulatórias B7.1 e B7.2, já foi bem documentado que o reconhecimento de antígenos por células T CD8+ bem como por células B induzem tolerância nas células B (2). A tolerância induzida por células B é conhecida não apenas em células T CD8+ mas também em clones de células T CD8+ *in vitro* [29, 30].

Contudo outros estudos demonstraram que o reconhecimento de antígenos pelas células B induz tolerância diretamente nas células T CD8 + , e esta indução de tolerância não é devida à ausência de células T CD4+ *helper*. Além disso, estudos feitos em camundongos deficientes em células B indicam que as células B são incapazes de induzir células T CD8+ e assim não são necessárias para iniciar as respostas dos CTLs . Porém, células B também são conhecidas por potencializarem as respostas de T CD8 + . Evidências sugerem que células B têm um papel importante na indução e manutenção da resposta de células T CD8+ de memória. Observou-se que, na ausência de células B, a resposta das CTLs de memória ao vírus da coriomeningitelinfocítica foi severamente afetada. Além disso, estudos em um modelo de diabetes autoimune mostraram que camundongos deficientes em $\alpha 2$ -micro-globulina e células B tornam-se tolerantes ao diabetes mellitus

dependente de insulina. Estas observações indicam um papel importante das células B na indução da auto-reatividade das T CD8 + que poderiam causar destruição celular. Recentemente, Sun *et al* também mostraram que CTLs, CMV e EBV-específicas, poderiam ser induzidas *in vitro* na presença da linhagem celular linfoblastóide, expressando um antígeno específico. Estas diferenças relativas à capacidade de ativação de células B levaram à reavaliação do papel das células B como células acessórias na ativação das TCD8 + . Porque células B não ativadas são conhecidas por expressarem baixos níveis de moléculas co-estimulatórias, e ainda assim podem induzir tolerância em células T, entretanto a maioria dos estudos utilizaram células B ativadas, como APCs. Sabe-se que a ativação de células B pode ocorrer em resposta a dois tipos de antígenos, os T-dependentes e os T-independentes. A ativação de células B em resposta à antígenos T-dependentes ocorre quando células B capturam antígenos via imunoglobulina de superfície e processam-no para apresentação com o MHC classe II para as células T CD4 + . Além disso, a interação do ligante de CD40 nas células T com o CD40 nas células B é pré-requisito para a ativação dos linfócitos B . Estudos utilizando células B ativadas por dois modos diferentes, na presença de anticorpos anti-Ig e anti-CD40 ou com LPS, mostraram que quando se usa uma Ig anti-camundongo como um modelo de antígeno na presença de anticorpos ativadores anti-CD40 mimetiza-se a célula TCD4+ helper . No entanto, quando se utiliza LPS, que é o antígeno T-independente melhor estudado para ativar as células B, ocorre ativação policlonal de células B, proliferação e produção de citocinas,

como IL-1, IL-6, IL-8, e TNF- α . O LPS também estimula os linfócitos B a aumentar a sua capacidade de apresentação de antígenos, que é acompanhada pela secreção de grandes quantidades de anticorpos anti-LPS. Sendo estes efeitos cumulativos de LPS efetivados pela ligação a seu receptor, toll like 4 (TLR-4) [29, 30].

1.6 Expressão gênica e sepse

Os avanços recentes em biotecnologia, os resultados de sequenciamento do genoma humano e o desenvolvimento de métodos de análise da expressão gênica em escala genômica oferecem oportunidades para melhorar nosso conhecimento de mecanismos de alta complexidade, tais como fisiopatologia de doenças. Foi proposto que todas as células envolvidas em resposta imune específica atuam de maneira coordenada e dividem elementos regulatórios comuns. Este processo coordenado cria uma área de citocinas caracterizada pela produção de um único padrão de citocinas e receptores deles correspondentes (“assinatura da expressão gênica”). A sepse é o resultado da ativação de um número grande de genes que interagem em redes complexas. O uso de padrões de expressão gênica, coletados em sistemas experimentais bem definidos, pode indicar a regulação de rotas celulares e as funções fisiológicas dos genes envolvidos em resposta celular particular do hospedeiro. O princípio de análise de macro-unidades (“macroarray analysis”) é a quantificação paralela dos níveis de mRNA de

milhares de genes. Na maioria dos casos, dois exemplos de mRNA são comparados diretamente na mesma unidade pela incorporação de fluorocromos diferentes em probes de cDNA derivados das amostras. A extensão de hibridização dos probes com cada gene na macro-unidade é quantificada e a razão de intensidades para cada fluorocromo reflete a expressão gênica relativa em cada amostra de mRNA. Assim, a estratégia de complementação da investigação de um único gene com estudos genômicos parece ser promissor e já foi utilizado em identificação de padrões fisiológicos da expressão gênica em fisiopatologia de sistema imune, traumatismo, choque hemorrágico, neoplasias, doenças auto-imunes [31].

2 . Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Identificar genes que exercem função regulatória na tolerância, utilizando a análise de *macroarray*.

2.2 Objetivos específicos

2.2.1 Estabelecer o modelo experimental de tolerância ao LPS em nosso laboratório

- Definir a dose, tempo e condições experimentais da tolerância ao LPS em camundongos Balb-C.
- Análise de mortalidade para uma mesma dose de LPS.

Justificativa: analisar a importância *in vivo* da tolerância ao LPS e verificar os diferentes modelos experimentais de tolerância, para verificar o melhor para a nossa proposta.

2.2.2 Identificar os padrões da expressão gênica na tolerância ao LPS, nos linfócitos do baço

Justificativa: os linfócitos são uma linhagem celular capaz de desenvolver memória na resposta da sepse, portanto o estudo destas células é importante.

2.2.3 Identificar o grupo funcional de genes que tem relevância na proteção induzida pela tolerância.

Justificativa: A análise dos genes pelo método do macroarray mostrará muitos grupos funcionais envolvidos com a proteção induzida pela tolerância, portanto devemos priorizar o grupo com maior relevância para o estudo.

3. Métodos

3.1 Indução de tolerância ao LPS

Injeções sub- cutâneas de LPS de 1 mg/kg diárias por 5 dias consecutivos. (LPS obtido da *E. coli* 055:B5 99% de pureza Sigma Cat. No. L-8274)

Grupos:

A- Controle: injeção de 0,5 ml salina estéril subcutânea

B- Tolerante: LPS 1,0 mg/kg 1x/dia subcutâneo, durante 5 dias.

3.2 Análise das Citocinas por ELISA

Foram coletados os plasmas após 2 e 4h da injeção de dose letal de LPS dos grupos controles e tolerantes, diluímos as amostras com solução diluente “Duo Set ELISA Development System” (TNF- α : 1:5 solução/ amostra; IL1- β : 1:5 solução/ amostra; IL6: 1:5 solução/ amostra; IL10: 1:10 solução amostra; MIP2: 1:10 solução amostra). Preparamos as placas, diluímos os anticorpos de captura (conforme a citocina estudada) em PBS e adicionamos 100 μ l em cada poço, incubamos 12h em temperatura ambiente, lavamos as placas com tampão de lavagem (Duo Set ELISA

Development System) e bloqueamos. Acrescentamos 100 µl das amostras já diluídas (conforme descrito) e os anticorpos de detecções (conforme a citocina estudada), incubamos por 2h e colocamos “Streptavidina”(Duo Set ELISA Development System), incubamos na ausência de luminosidade por 20 minutos, acrescentamos a solução de parada da reação (Duo Set ELISA Development System). Determinamos a densidade óptica de cada poço através do espectrofotômetro, fizemos as leituras ópticas em 532 nm.

Todos os passos descritos para a realização destes experimentos estavam descritos no “Kit Duo Set ELISA Development System” para cada citocina estudada. Os reagentes utilizados neste experimento pertencem ao Kit Duo Set da B&D.

Utilizamos 10 animais por grupo (30 controles, 30 tolerantes) , sendo total de 60 camundongos Balb-C.

3.3 Separação das células através de Separadores Magnéticos

As células sanguíneas foram separadas utilizando-se o Isolymp® (Gallard- Schlesinger industries) e em seguida os separadores magnéticos (Magnetic Beads), a fim de obtermos apenas os linfócitos B para análise dos genes .

Os animais (Balb-c machos, com 10 animais por grupo) foram anestesiados com cloridrato de cetamina (Ketalar- Parke- Daves), realizamos punção cardíaca. Após a coleta do sangue, diluímos 6ml de

sangue em 3 ml de Isolymp®[®], centrifugamos durante 30 minutos em 5000 rpm, obtivemos então a separação em fases da solução, sendo que na fase com menor densidade, com a coloração branca (anel branco) encontramos os linfócitos e monócitos e na fase mais densa os neutrófilos e as hemácias. Aspiramos, cuidadosamente, a fase branca e colocamos em uma placa plástica com meio de cultura RPMI. Os monócitos aderem na placa plástica e assim obtivemos apenas os linfócitos.

Os linfócitos foram obtidos através de separadores magnéticos (Magnetic Beads), as amostras foram recolhidas da placa plástica e lavadas com PBS. Conforme protocolo da Polysciences Biomag Selecta Pure, lavamos as partículas magnéticas em meio de cultura estéril com 5% de soro fetal bovino e 1% de antibiótico, 0,5ml de partículas magnéticas anti-TCR8 foram acrescentadas para cada 1.10^7 linfócitos (previamente contados em câmara de Neubauer), incubamos por 30 minutos a 4°C, as partículas magnéticas separaram os linfócitos T CD8 após serem colocados no separador (ímã) da Biomag, portanto na amostra restaram apenas os linfócitos T CD4 e os linfócitos B, da mesma maneira descrita anteriormente, os linfócitos T CD4 foram separados, restando apenas os linfócitos B.

3.4 Produtos de reação do ácido barbitúrico (TBARS)

A quantificação dos produtos de reação do ácido tiobarbitúrico (TBARS) foi utilizada para determinar a taxa de peroxidação lipídica. Foram

coletadas amostras de plasma, que foram recolhidas em tubos heparinizados, centrifugados a 3000 rpm por 5 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi coletado e acondicionado em tubos a -80°C até o momento da dosagem. A dosagem foi realizada utilizando-se 100µl de soro, acrescido de 100 µl SDS a 8,1%, 750 µl de ácido acético a 20%, e 750 µl de ácido tiobarbitúrico a 0,8%. A mistura foi aquecida a 95°C por 40 minutos. A solução foi centrifugada e medida a absorbância a 532nm no sobrenadante. Os resultados representam a média de 10 animais por grupo experimental (controles 0, 2, 4 horas; tolerantes 0, 2 e 4 horas; n=60).

3.5 Técnica de “macroarray”

A técnica de “macroarray” baseia-se na imobilização de sequências de genes específicas (sondas) sob uma matriz sólida, as quais são então hibridizadas com cópias marcadas de ácidos nucleicos obtidos a partir da amostra biológica (alvos), no caso das amostras de RNA estas são sintetizadas a cDNA. Esta técnica possibilita observar um aumento ou diminuição na expressão de um gene a partir da variação na quantidade do alvo marcado. No presente estudo foi utilizada uma membrana mista (Atlas Array Trial Kit - Clontech laboratories, Inc., Califórnia, EUA), ou seja, que contém genes pertencentes a vários grupos funcionais. A membrana é composta por 500 genes distintos que estão presentes em duplicata. Utilizamos todos os reagentes do Kit da CLONTECH.

3.5.1 Obtenção do RNA total

O RNA total das células tratadas e controle foi extraído utilizando-se a metodologia do tiocionato de guanidina (Chomczynski e cols., 1987), empregando-se o reagente Trizol (Life Technologies). Resumidamente, 1×10^7 células foram lisadas utilizando 1 mL do reagente, o RNA total foi isolado a partir das proteínas e restos celulares acrescentando-se 200 μ L de clorofórmio seguido de centrifugação. A precipitação do RNA total foi realizada adicionando-se propanol gelado seguido de centrifugação. Em seguida, o sedimento foi lavado em etanol 70% e após secagem a temperatura ambiente, ressuspenso em água DEPC. O volume de água DEPC utilizado variou de acordo com o tamanho do sedimento obtido não ultrapassando 30 μ L.

3.5.2 Tratamento com Dnase

Para os experimentos de “macroarrays” e RT-PCR, 200 μ g de RNA total de linfócitos e neutrófilos controle e tratados com LPS foram submetidos ao tratamento com DNase, conforme descrito pelo fabricante da membrana (Clontech laboratories, Inc., Califórnia, EUA). Resumidamente, em um tubo de microcentrífuga foram adicionados 200 μ g do RNA total, 20 U de DNase, 40 μ L de tampão da DNase I completando-se com H₂O deionizada livre de RNase para um volume final de 400 μ L. A reação foi incubada durante 30 minutos a 37°C. Ao término desse período, adicionou-se 40 μ L da mistura de terminação (Clontech

laboratories, Inc., Califórnia, EUA). Em seguida, o RNA total foi purificado com fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25:24: 1) e precipitado com acetado de sódio e etanol absoluto.

3.5.3 Quantificação e avaliação da integridade do RNA total

O RNA total isolado foi quantificado por espectrofotometria na região do ultravioleta (UV) a 260 nm e sua pureza (relação A_{260}/A_{280}) foi determinada. A integridade do RNA foi avaliada em gel de agarose a 1,2% desnaturante (formaldeído 37%) contendo 0,5 µg/mL de brometo de etídeo, em tampão MOPS. A separação eletroforética foi realizada a 100 V por 1 hora e visibilizado em luz ultravioleta em transiluminador (Pharmacia Biotech., Inc., Uppsala, Suécia). Os resultados foram foto-documentados por meio do aparelho Kodak[®] Digital Science DC120 Zoom Digital Camera (Gibico-BRL, Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD, Estados Unidos) sendo a imagem processada e analisada por meio do software da Kodak Digital Science 1D Image Analysis (Gibico-BRL, Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD, Estados Unidos).

3.5.4 Síntese da sonda de cDNA

O preparo da sonda foi realizado utilizando-se o Kit Atlas[™] pure total RNA labeling system (Clontech Laboratories, Inc). A reação de marcação foi realizada utilizando 4µL do tampão de reação 5x (fornecido pelo fabricante), 2 µL de uma mistura de dNTP 10x, sendo o ATP marcado com

^{33}P (10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{L}$), 0,5 μL de DDT. Essa mistura de reação foi acrescentada sobre o tubo contendo 10 μg do RNA total. Em seguida foi acrescentado 1 μL da mistura de “primers” “CDs” e 2 μL da enzima de transcrição reversa (MMLV), incubando-se a 50°C durante 25 minutos. Decorrido esse período, a reação foi interrompida utilizando 2 μL da mistura de terminação 10x fornecida pelo fabricante.

3.5.5 Purificação da sonda marcada

A purificação da sonda foi realizada utilizando uma coluna de cromatografia (NucleoSpin Extraction Spin Column). A sonda foi diluída em 200 μL de volume total de tampão NT2 (fornecido pelo fabricante). Esta mistura foi adicionada a uma coluna, que foi centrifugada a 14.000 rpm por 1 min. Quatrocentos microlitros de tampão NT3 (fornecido pelo fabricante) foram adicionados à coluna e centrifugados a 14.000 rpm durante 1 min. Este procedimento foi repetido por 3 vezes. A coluna foi então transferida para um tubo estéril de microcentrífuga de 1,5 mL. Adicionados 100 μL de tampão NE deixando-se a coluna encharcar por 2 min. A coluna foi centrifugada a 14.000 rpm por 1 minuto para eluir a sonda purificada. A radioatividade da sonda foi confirmada pela contagem de cintilação.

3.5.6 Hibridização

Todas as soluções utilizadas para o procedimento de hibridização foram fornecidas pela Clontech laboratories, Inc.. A hibridização foi realizada utilizando-se a solução de Express Hyb pré aquecida a 68°C, contendo 50 µg DNA de esperma de salmão. Esta solução foi adicionada ao tubo de hibridização, contendo a membrana já umedecida em água e procedeu-se a uma incubação durante 30 min com agitação contínua a 68°C para pré-hibridização. A sonda desnaturada foi adicionada e a hibridização foi mantida por 12 horas em agitação contínua a 68°C. Em seguida, a membrana hibridizada foi submetida a lavagens sucessivas com SSC e SDS. Na fase final, a membrana úmida foi imediatamente enrolada em plástico. A membrana Atlas Array foi exposta ao intensificador de sinal “Storage Phosphor Screens” e mantidas em cassete durante 2 semanas (Amershan Pharmacia Biotech, UK Limited, Uppsala, Suécia).

3.5.7 Análise dos resultados

Os dados foram obtidos pelo equipamento “Storm” (modelo 840 – Molecular Dynamics) e analisados pelo software BD AtlasImage™ 2.7. A interpretação dos mesmos foi realizada após a normalização do sinal emitido em cada membrana com o gene da β -actina presente na mesma. Em seguida, foi realizada a relação entre os dados obtidos na membrana teste (com tratamento) com os da membrana controle (sem tratamento).

3.6 Confirmação por RT-PCR

As alterações de expressão observadas nos testes com as membranas Atlas Array Rat Kit foram confirmadas utilizando-se a técnica de RT-PCR. Utilizamos 10 animais por grupo (30 controles, 30 tolerantes), sendo total de 60 camundongos Balb-C.

3.6.1 Desenho das seqüências dos “primers”

As seqüências dos primers foram desenhadas utilizando o programa “Gene Runner” versão 3.0 a partir das seqüências dos genes. Esses foram obtidos por meio das informações contidas no banco gênico do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) acessado via internet (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez>) a partir do número de acesso presente na relação de genes descritos na membrana.

3.6.2 Reação de transcrição reversa (RT)

A síntese do DNA complementar (cDNA) foi realizada a partir de 2 µg de RNA total extraídos conforme descrito anteriormente. A síntese do cDNA foi realizada utilizando a seguinte mistura de reagentes: 146 ng de “primers” e 200 U da enzima transcriptase reversa (Super Script™ II Rnase H⁻ RT Llife Technologies), tampão da enzima [Tris-HCl a 50 mM (pH 8.0), KCL 75 mM, MgCl₂ 3 mM], DTT a 5 mM, dNTP a 500µM em um volume final de reação de 20µL. Esta mistura final foi incubada por 2 min a 25°C para

permitir a hibridização dos oligonucleotídeos randômicos ao RNA, seguida de aquecimento a 42°C por 50 min. O cDNA assim obtido foi armazenado a -20°C até a realização da PCR.

3.6.3 Avaliação dos parâmetros da reação em cadeia pela polimerase – PCR

A temperatura de hibridação dos “primers”, concentração de cloreto de magnésio, quantidade da amostra (cDNA) e número de ciclos foram avaliados para compor o modelo de ensaio da PCR. As reações foram realizadas para cada grupo de “primers”: todos os parâmetros foram avaliados utilizando concentrações constantes dos reagentes, ou seja, 200 nM de cada “primer”, 200µM de cada desoxirribonucleotídeo, 2U de Taq DNA polimerase (Amershan Pharmacia Biotec. Inc., Uppsala, Suécia); tampão da PCR contendo: Tris-HCl a 10 mM (pH 8,3), KCl a 50 mM, gelatina a 0,01% e 1,5 mM de cloreto de magnésio. Contudo, como a concentração de cloreto de magnésio estava sendo avaliada foram realizados testes acrescentando cloreto até a concentração de 3,0 mM. A reação da PCR foi realizada em um volume final de 50µL. As reações foram processadas no termociclador (modelo Techne Genius – Uniscience do Brasil, São Paulo, Brasil). Uma vez determinadas as condições da PCR, as amostras foram amplificadas em um volume final de 50 µL, em programa específico para cada gene.

3.6.4 Análise do produto de PCR

Os produtos amplificados foram acrescidos de tampão de amostra (azul de bromofenol a 0,25%, xilenocianol-FF a 0,25% e glicerol a 30%) e avaliados por meio da separação eletroforética em gel de agarose a 1,5% contendo brometo de etídeo a 0,5 $\mu\text{g/mL}$ e visibilizados em luz ultravioleta no transiluminador (modelo Macrovue da Pharmacia LKB – Pharmacia Biotech., Inc., Uppsala, Suécia).

A foto-documentação dos produtos amplificados foram realizados por meio do aparelho Kodak[®] Digital Science DC120 Zoom Digital Camera (Gibico-BRL, Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD, Estados Unidos), sendo a imagem processada e analisada por meio do software da Kodak Digital Science 1D Image Analysis (Gibico-BRL, Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD, Estados Unidos). A análise da expressão do RNAm dos genes investigados foram avaliadas em valores relativos (expressão relativa) entre a densidade óptica da banda correspondente ao produto de amplificação do gene de interesse e a densidade óptica da banda correspondente ao produto de amplificação do GAPDH (Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase) para cada amostra.

3.7 Western Blotting

As amostras foram homogeneizadas em tampão de lise RIPA acrescido de inibidores de proteases (1 mg/ml pepstatina A, 100mM PMSF). Em seguida, as amostras de lisado do baço dos camundongos Balb-C (10 animais por grupo) foram centrifugadas a 14000G por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi coletado, e a concentração de proteínas quantificada pelo método de Bradford. Amostras de 50 ug/ml de proteínas foram acrescidas de tampão de amostra e submetidas à eletroforese em um sistema SDS-PAGE, gel 10% de poliacrilamida (1.5M Tris-HCl, 10% SDS, 30% bis-acrilamida, 10% de persulfato de amônia e TEMED). Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose (Biorad) em aparelho de transferência (Biorad). As membranas foram incubadas em solução de bloqueio 1% de BSA (albumina bovina) em tampão TBST (50 mM de tampão Tris, pH 8,0, 100mM NaCl, 0.1% Tween 20) por 1 hora a temperatura ambiente. Foram lavadas em TBST e incubadas com anticorpos primários (Santa Cruz) contra as proteínas de interesse por 12 horas a 4°C. Posteriormente, as membranas foram incubadas em solução contendo anticorpo secundário conjugado a peroxidase e expostas ao sistema de detecção Super Signal (Pierce). A expressão das proteínas analisadas foi comparada por densitometria de gel, utilizando-se o programa de domínio público "Image J", criado por Wayne Rasband do National Institutes of Mental Health, NIH, USA.

3.8 Atividade da caspase1

As células obtidas do baço dos animais tolerantes e controles (30 animais, sendo 5 em cada grupo), contadas na câmara de Neubauer, obtivemos dessa maneira 1×10^6 células em cada grupo, foram ressuspensas em PBS e centrifugadas por 10 minutos, em seguida o sobrenadante foi removido e as células lisadas com a adição de 25 μ l de tampão de lise (Kit R&D Systems) para cada grupo.

As células lisadas foram centrifugadas a 10.000G por 1 minuto, as células foram transferidas para um novo tubo onde a concentração resultante era de aproximadamente 4 mg/ml de proteínas. Acrescentamos as amostras na placa com 96 wells e 5 μ l de substrato colorimétrico para caspase-1 (WEHD-pNA), incubamos a 37°C por 2 horas, em seguida determinamos a densidade óptica de cada poço através do espectrofotômetro, fizemos as leituras ópticas em 405 nm. Este protocolo foi realizado conforme as especificações descritas para Caspase-1 Colorimetric Assay- Kit R&D Systems.

3.9 Quantificação dos processos apoptóticos (método de anexina V/ iodeto de propídeo com análise em citometria de fluxo)

O processo apoptótico produz uma perda da assimetria da cadeia lipídica da membrana celular, externalizando um fosfolípide, a fosfatidilserina na superfície celular. Este fosfolípide pode ser identificado pela proteína

Anexina V marcada com fluoresceína (FITC), que pode ser detectado pelo citômetro de fluxo indicando as células apoptóticas.

A necrose celular produz uma perda da integridade da membrana citoplasmática, permitindo que um corante vital não permeável à membrana, como o iodeto de propídeo, penetre livremente ligando-se ao DNA, que pode ser detectado pelo citômetro de fluxo indicando as células em necrose.

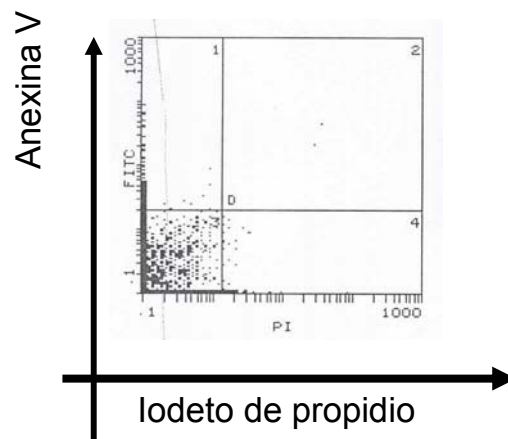
Desta forma, identificamos e quantificamos, pela citometria de fluxo, as células em apoptose (anexina positiva), em apoptose apresentando um componente necrótico (anexina e iodeto de propídeo positiva), em necrose (iodeto de propídeo positiva) e as células íntegras ou viáveis (anexina e iodeto de propídeo negativa).

Para isso: as células dos baços do grupos controles e tolerantes (30 animais) foram coletadas em tubos de 15ml para centrifuga (FALCON) e centrifugadas a 1200 rpm por 2 minutos. De cada suspensão celular foi determinada a concentração em câmara de Neubauer e separado uma alíquota com 1×10^5 células, que foram ressuspendidas em 100ul de tampão de ligação (10mM HEPES- NaOH, pH 7.4, 140 mM NaCl, 2,5 mM de CaCl_2). Em seguida, a suspensão foi transferida para um tubo de citometria de 5 ml e adicionados a cada tubo 5 ul de Annexin V-FITC (BDPharmingen), um marcador específico para apoptose e 5 ul de iodeto de propídeo (IP) (ICN) 50ug/ml, um marcador de permeabilidade de membrana. A nova suspensão celular foi então, misturada em um agitador e incubada por 20 minutos à 4°C. Foram adicionados 400ul de tampão de ligação a cada tubo para análise de citometria e detecção imediata de morte celular.

Com a análise de citometria de fluxo das células marcadas com anexina V e/ou iodeto de propídeo obtivemos um gráfico representativo do número de células encontradas em cada marcação. Como pode ser observado cada um dos quadrantes do gráfico apresenta um estágio celular.

O quadrante D1 apresenta as células com marcação positiva apenas para anexina V representando células na fase inicial de apoptose, o D2 apresenta células com marcação positiva para anexina V e IP representando células na fase final de apoptose, o D3 apresenta células sem marcação representando células viáveis e D4 apresenta células com marcação positiva para IP representando células em necrose.

Gráfico representativo da marcação de anexina V / IP



4. Resultados

4.1 Estudo de Mortalidade-Curvas de Mortalidades

4.1.1 LPS dose letal

O estudo de mortalidade revela que a taxa de sobrevivência aumenta nos animais que receberam tratamento com LPS –dose tolerante (tolerantes) 1mg/kg, quando comparados aos animais não tratados (figura 4). Houve sobrevivência de 100% dos animais tolerantes (1mg/kg), aproximadamente 60% dos animais tolerantes que receberam 0,5mg/kg LPS, sendo que todos os animais controles(que não receberam tratamento com LPS- dose de tolerância) não sobreviveram em 35 horas. Todos os animais receberam LPS- dose letal (20mg/kg).

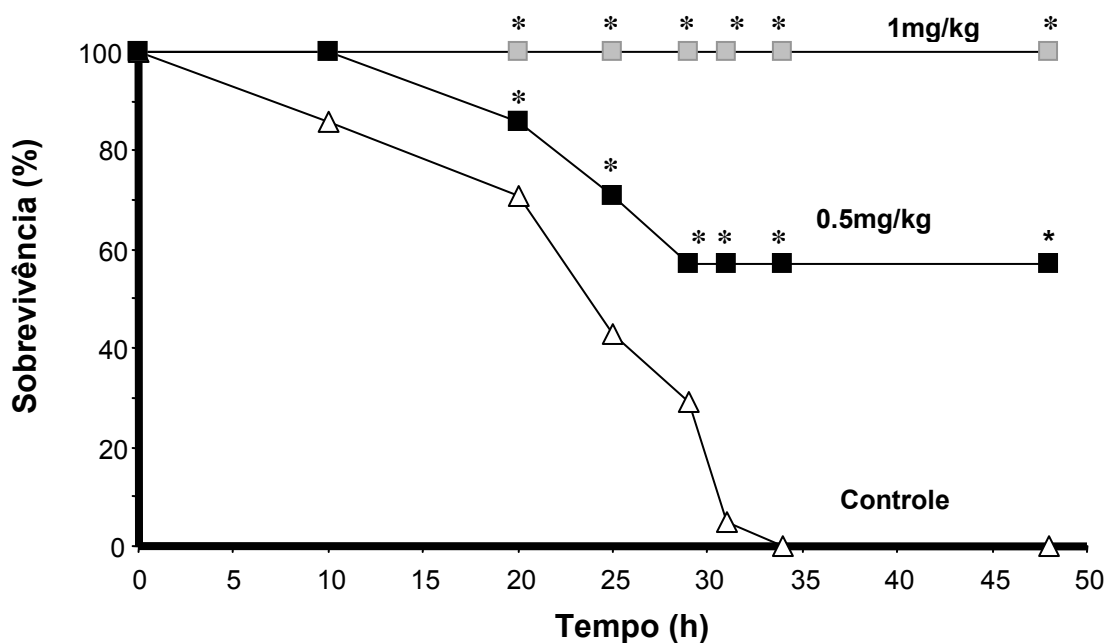


Figura 4: Curvas de mortalidades para um período de observação de 12 horas.

4.2 Análise das Citocinas

4.2.1 TNF- α

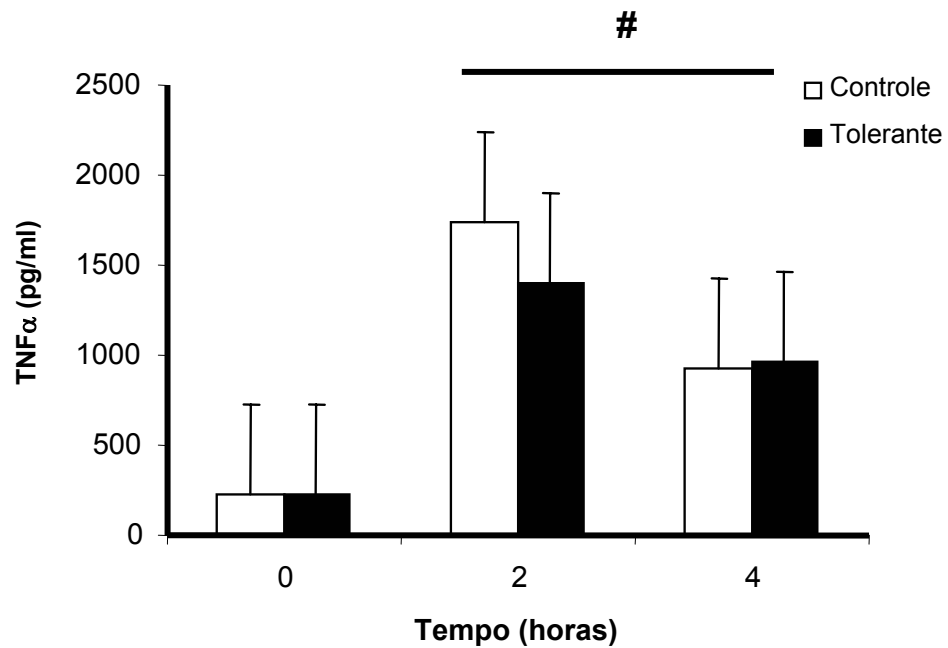


Figura 5: Análise das concentrações nos grupos controles e tolerantes para a citocina TNF- α , não observamos diferença entre os grupos controle e tolerante.

Diferença entre os tempos 0 e 2 horas, 0 e 4 horas. ($p < 0,05$)

4.2.2 IL10

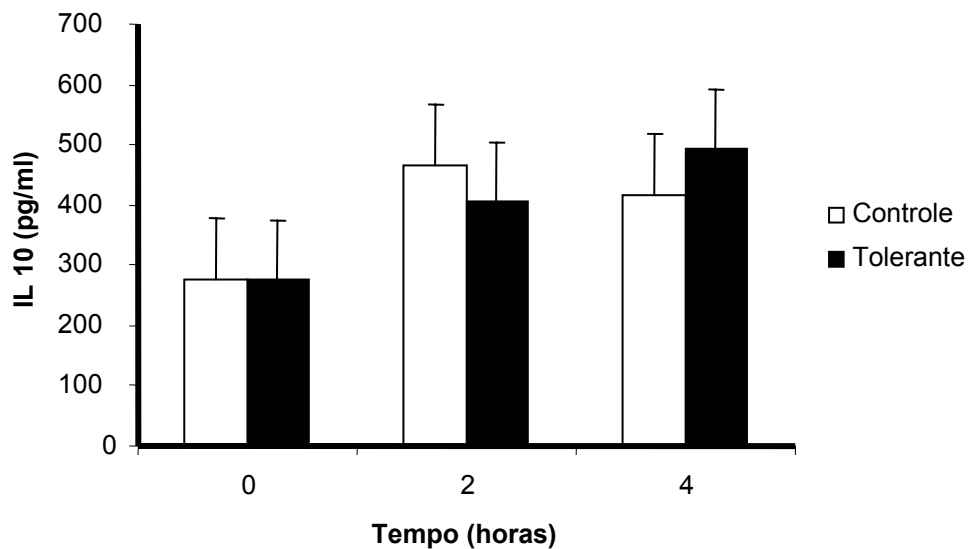


Figura 6: Análise das concentrações nos grupos controles e tolerantes para a citocina IL10, não observamos diferença entre os grupos.

4.2.3 IL6

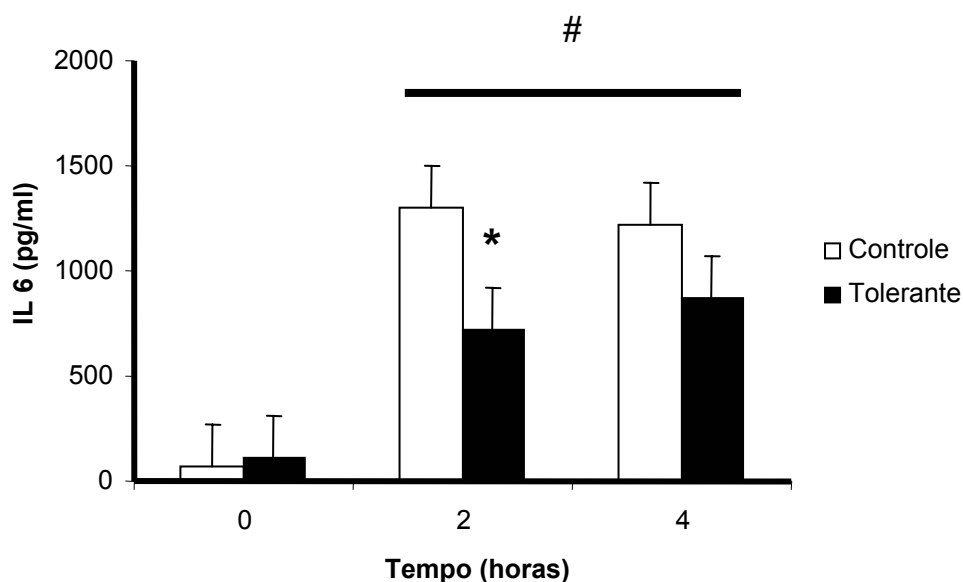


Figura 7: Análise das concentrações nos grupos controles e tolerantes para a citocina IL6, observamos diferença em 2 horas (*), sendo o grupo controle com $1487,8 \pm 96$ pg/ml e o grupo tolerante $723,6 \pm 158$ pg/ml.

diferença entre 0 e 2 horas e 0 e 4 horas. ($p < 0,05$)

4.2.4 IL 1 β

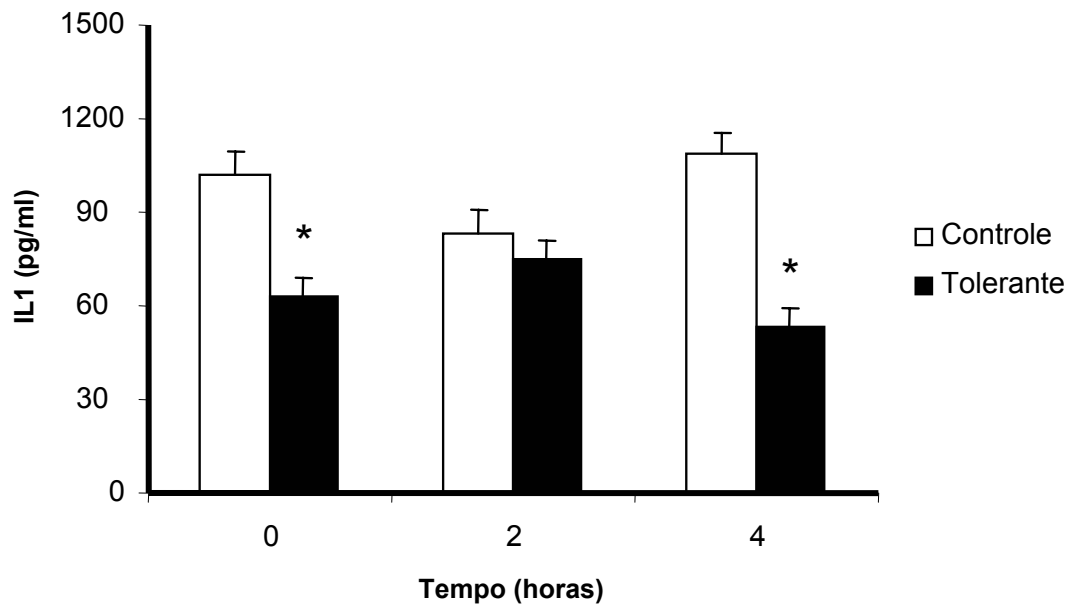


Figura 8: Análise das concentrações nos grupos controles e tolerantes para a citocina IL1- β , observamos diferença (*) em 0 horas, sendo o grupo controle com 1017,9 \pm 30 pg/ml e o grupo tolerante 734,8 \pm 26 pg/ml e em 4 horas, sendo o grupo controle com 1116,2 \pm 20 pg/ml e o grupo tolerante com 656,9 \pm 25 pg/ml. ($p < 0,05$).

4.2.5 MIP2

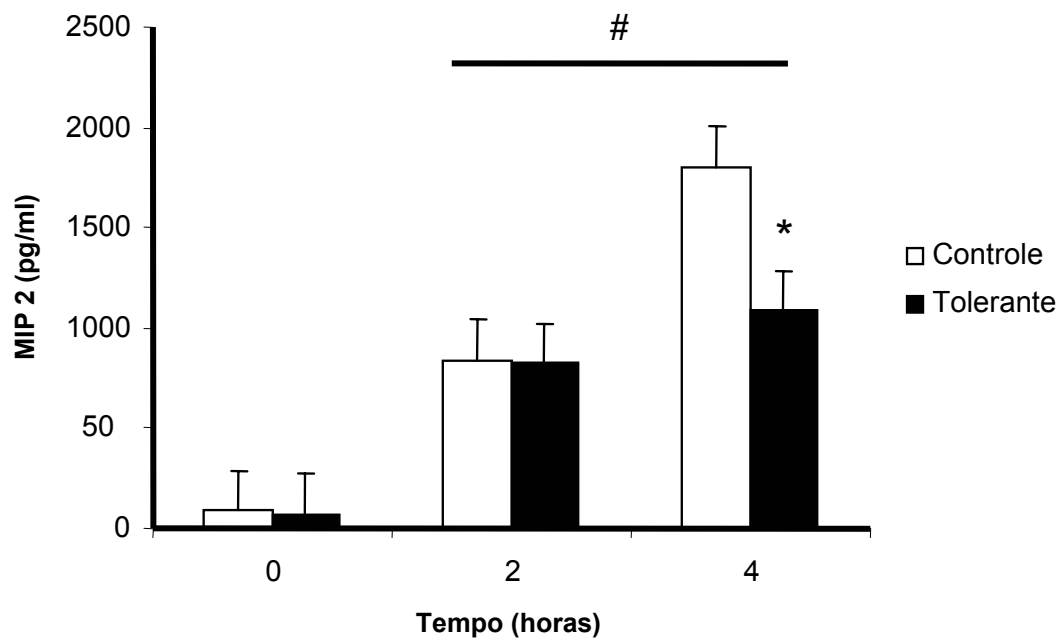


Figura 9: Análise das concentrações nos grupos controles e tolerantes para a citocina MIP2, observamos diferença (*) em 4 horas, sendo o grupo controle com 21739 ± 252 pg/ml e o grupo tolerante 18038 ± 159 pg/ml.

Diferença entre 0 e 2 horas, 0 e 4 horas. ($p < 0,05$).

4.3 Resultados da análise da expressão do RNAm por RT-PCR

4.3.1 IL10

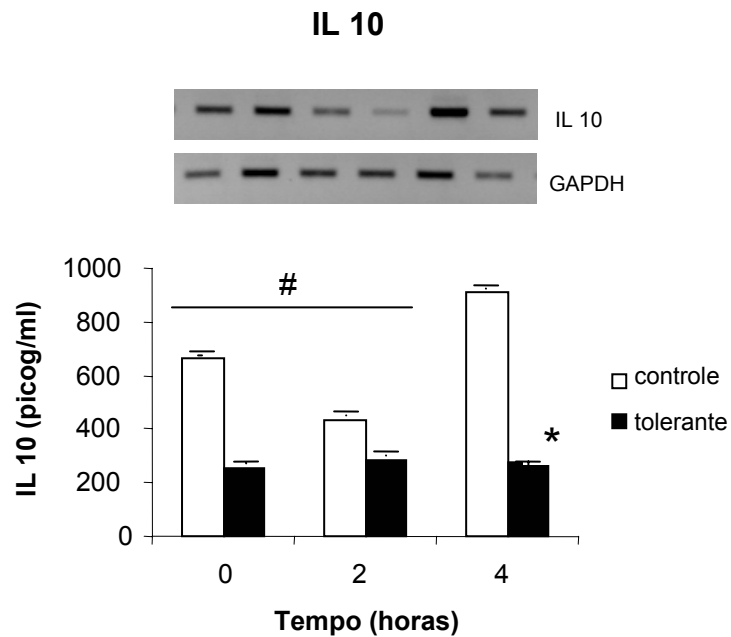


Figura 10: Análise das concentrações nos grupos controles e tolerantes para IL10, observamos diferença (*) em 4 horas, sendo o grupo controle com 217 ± 25 pg/ml e o grupo tolerante 903 ± 19 pg/ml.

Diferença entre 0 e 4 horas, 2 e 4 horas. ($p < 0,05$).

4.3.2 TNF- α

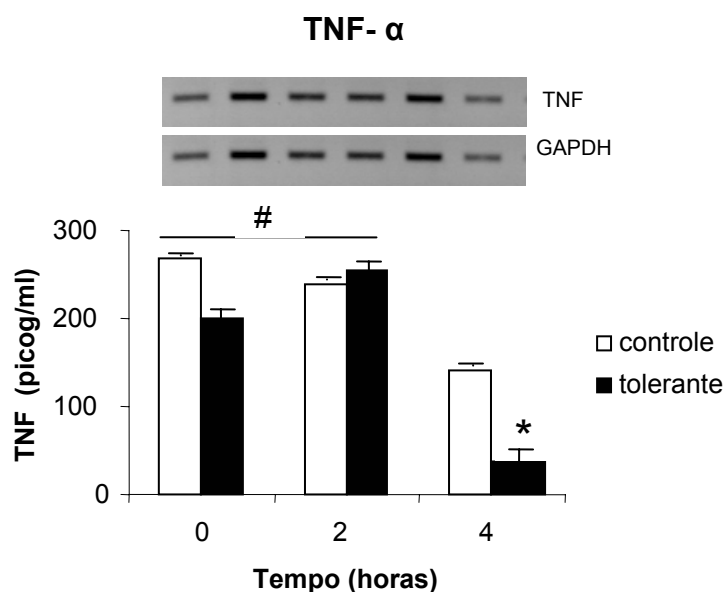


Figura 11: Análise das concentrações nos grupos controles e tolerantes para TNF- α , observamos diferença (*) em 4 horas, sendo o grupo controle com 217 ± 25 pg/ml e o grupo tolerante 903 ± 19 pg/ml.

Diferença entre 0 e 4 horas, 2 e 4 horas. ($p < 0,05$).

4.3.3 IL1- β

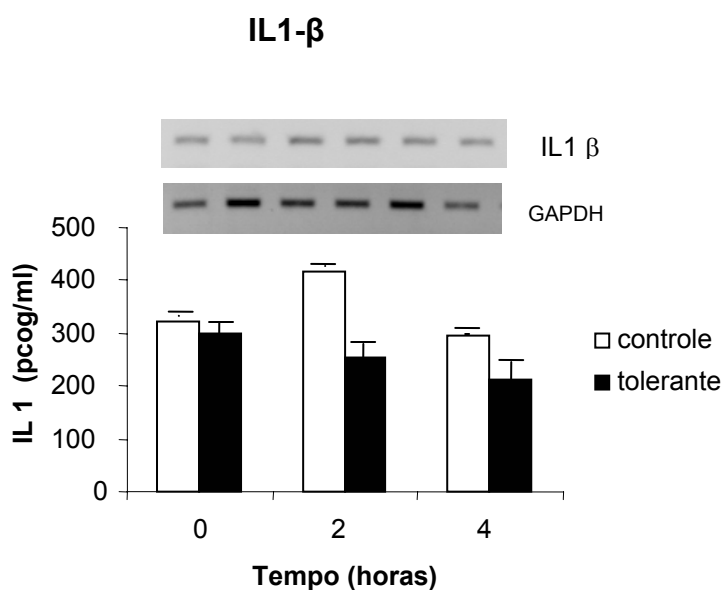


Figura 12: Análise das concentrações nos grupos controles e tolerantes para IL1 β , não observamos diferença entre os grupos.

4.4 Efeito da Tolerância ao LPS nos níveis de TBARS

A peroxidação lipídica foi determinada pela medida dos níveis de TBARS no plasma em 0, 2, 4 e 8 horas após a injeção da dose letal de LPS em animais controles e tolerantes.

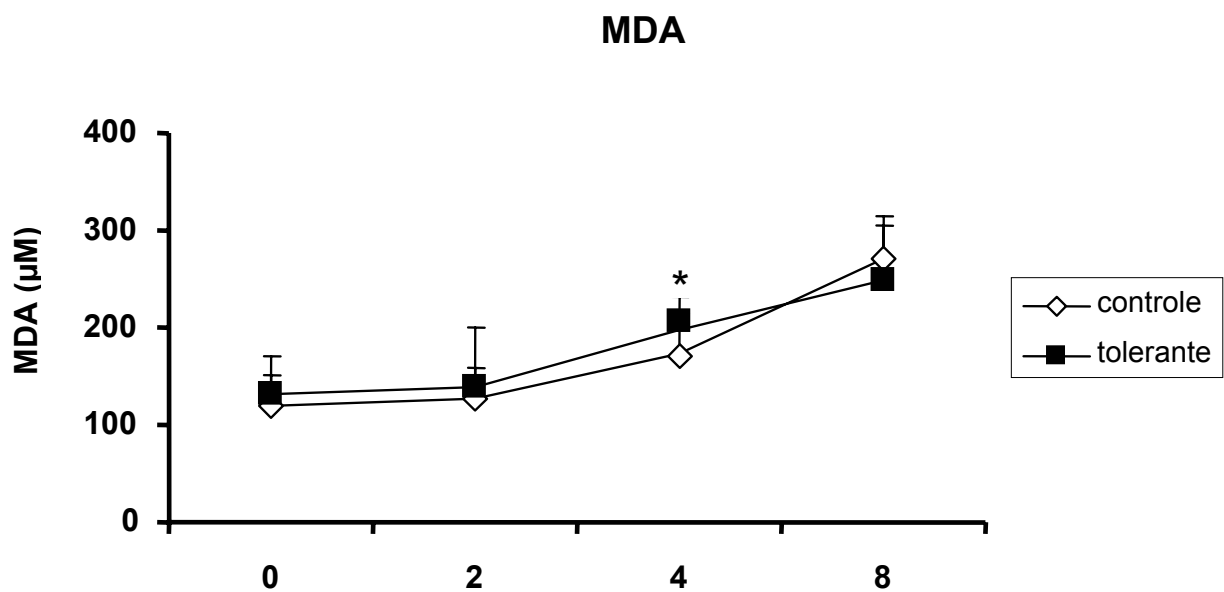


Figura 13: Análise do MDA no Plasma

Observamos um aumento do grupo controle em relação ao tolerante no grupo de 4 horas, sendo * $p < 0,05$.

4.5 Técnica do Macroarray

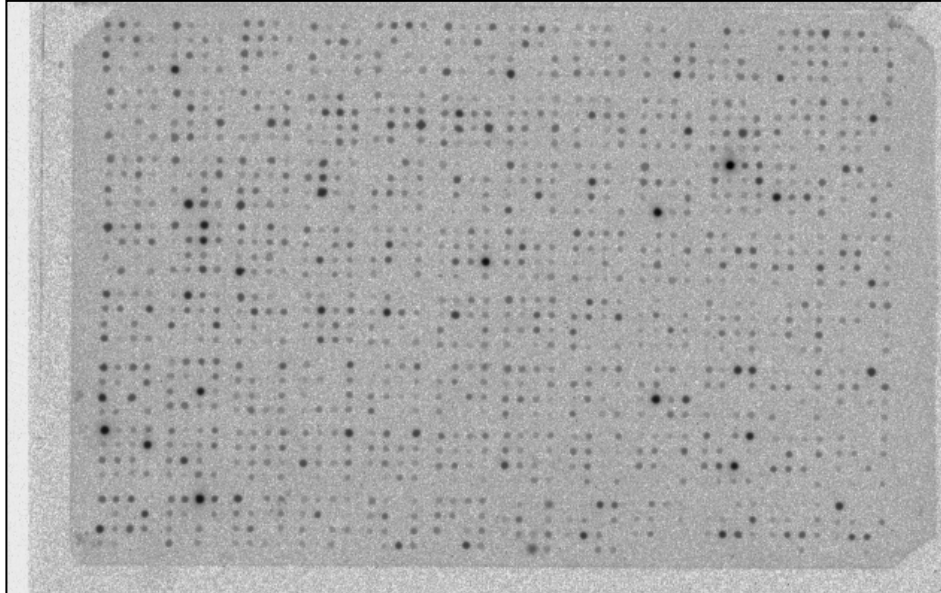


Figura 14: Macroarray

4.6 Análise dos genes

Tabela 1: Tabela de genes

<u>Gene</u>	<u>Nome</u>	<u>Relação</u>
<u>Genes relacionados às Citocinas</u>		
B01b	Tumor necrosis factor alpha induced protein	0,32
D06b	Interleukin- 10 receptor precursor	0,34
D03g	Interleukin- 1 receptor	0,25
D14i	Small inducible cytokine A3 precursor; macrophage inflammatory protein 1 alpha	0,23
E12b	Essential modulator NF-Kb	0,34
B09f	Signal transducer activator of transcription IL-6	0,48
D06d	Interleukin-3 receptor	Down
D06f	Interleukin-5 receptor alpha subunit precursor	Down
D14i	Small inducible cytokine A3 precursor; macrophage inflammatory protein 1 alpha	Down
E12b	NFKB essential modulador	Down
E07f	C-C Chemokine receptor type 1, macrophage inflammatory protein 1	Down
E08f	C-C Chemokine receptor type 2	Down
E04i	IFN- β	0,68
E04m	IL12 cadeia β	Down
E04n	IL15	Down
E05g	TGF-B activated kinase 1	0,68
J11d	TNF receptor associated factor 3	0,72
J12a	IL8 receptor	0,67
<u>Genes relacionados aos Linfócitos T</u>		
A02i	CD4 receptor (T cell activation gene)	0,22
B11i	Trans acting T-cell specific transcription factor GATA 3	0,44
H11i	Trans acting T cell specific transcription factor GATA 3	0,09
L01a	T cell specific surface glycoprotein CD28 precursor M34563	0,24
010b	Lymphocyte differentiation antigen CD38	0,12

Continua...

Continuação Tabela 1

<u>Gene</u>	<u>Nome</u>	<u>Relação</u>
<u>Genes relacionados aos linfócitos B</u>		
E11b	Lymphocyte B receptor	0,78
N11b	B Lymphocyte kinase	0,25
F13n	Anti- proliferative B cell translocation gene 2	Down
A03m	Pre B cell leukemia transcription factor 2	Down
<u>Genes relacionados ao Óxido Nítrico</u>		
F02a	Nitric oxide synthase	0,22
010a	Nitric Oxide synthase 1	Down
<u>Gene relacionado à Heat Shock Protein</u>		
011a	47-KDa heat shock protein precursor, collagen binding protein	Down
<u>Genes relacionados aos hormônios</u>		
F13n	Estrogen receptor	0,22
F14a	Insulin like growth factor binding protein 3	Down
L02d	Insulin receptor	Down
<u>Outros Genes</u>		
C03b	G- protein coupled receptor 27	0,36
C07b	C-Src proto- oncogene	0,45
C01c	Vascular cell adhesion protein 1	0,22
E01i	Transforming growth factor B 2 precursor	0,49
F04g	Alzheimer's disease amyloid A4 protein precursor homolog	0,68
F04i	Electrocardiographic QT Syndrome 2 Potassium channel subunit U04294	0,26
F14n	Lymphoid enhancer- binding factor	0,23
G02a	Endothelial transcription factor GATA-2	0,32
G03a	Myogenic factor	0,26

Continua...

Conclusão Tabela 1

<u>Gene</u>	<u>Nome</u>	<u>Relação</u>
G02b	Early Growth response protein 3	0,56
H11j	Etoposide induced p-53 responsive m-RNA	0,17
I12a	Calcium- activated potassium channel beta subunit	0,19
J09f	Oxidative stress- induced protein mRNA	Down
J11c	Vascular cell adhesion protein 1	0,34
L01d	Fas- associated factor 1	0,43
L05a	ERBB 3 receptor	Down
M05g	Tyrosine protein kinase	1,35
M05h	Protein FAN	Down
M05i	G protein coupled receptor	Down
N09a	Small inducible cytokine A3 precursor macrophage inflammatory protein 1 alpha	Down
N12f	Chemokine receptor type 1	Down
N13b	Transforming growth factor B-2 precursor	Down
011c	Fanconi group C protein	Down
011f	Vimentin	Down
D03a	Programmed cell death	0,32

Análise do grupo tolerante/ grupo controle

Down: valores abaixo de 0,05

Após análise da membrana contendo os genes integradores da resposta produzida pela tolerância, optamos por enfatizar inicialmente os genes envolvidos no processo apoptótico devido à relevância deste processo no quadro séptico conforme mostraram os trabalhos encontrados na literatura [32-36].

4.7 Genes relacionados à apoptose

Tabela 2: Tabela de genes envolvidos no processo apoptótico

	Nome	Relação
GAN*	Gene name	Ratio
X92346	TNF receptor-associated factor 4 (TRAF4)	0,26
U06948	Fas antigen ligand (FASL)	0,22
U37522	TNF related apoptosis inducing ligand (TRAIL)	0,25
M83649	Fas I receptor	0,20
U88990	Inhibitor of apoptosis protein 3	Up
D28492	Caspase 2 precursor	Down
U39613	Caspase7, apoptosis related cysteine protease	Down
U59463	Caspase 11	0,29
U13021	Caspase2, apoptosis-related cysteine protease	Down
AF064071	APAF-1; apoptotic protease activating factor1	Down
U39643	Fas associated factor 1	0,43
X67914	Programmed cell death 1 protein precursor	Down
NM022684	Bid, apoptotic protease	0,21
XM232860	Caspase3, apoptosis related cysteine protease	Down
AU020929	Interferon regulatory factor 1	Down
BY309097	Interferon gamma receptor 1	Down

Análise do grupo tolerante/ grupo controle

Down: valores abaixo de 0,05

*GAN: número de análise do gene (Gene bank)

4.8 RT-PCR

4.8.1 Caspase 3

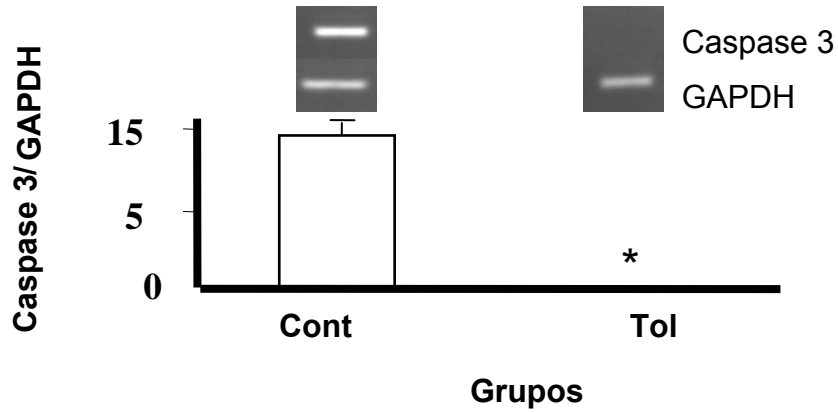


Figura 15: RT-PCR Caspase 3

Observamos diferença entre os grupos controle e tolerante, sendo $*p < 0,05$

4.8.2 Bax

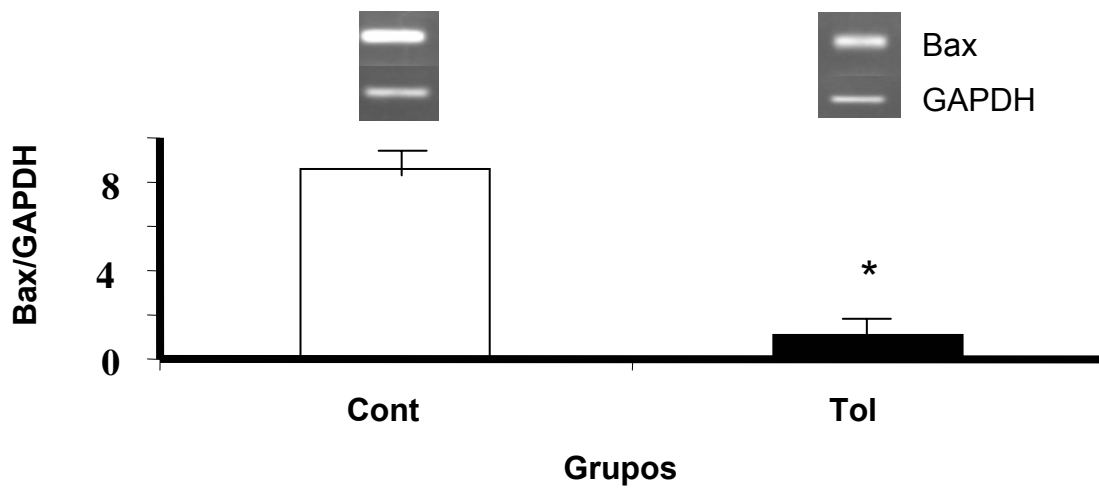


Figura 16: RT-PCR Bax

Observamos diferença entre os grupos controle e tolerante, sendo $*p < 0,05$

4.8.3 Bcl2

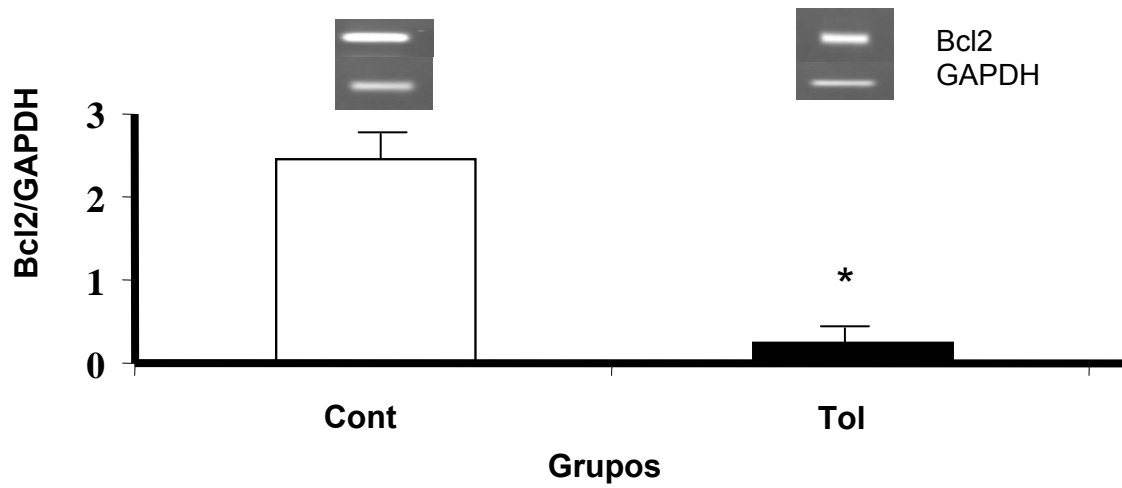


Figura 17: RT-PCR Bcl2

Observamos diferença entre os grupos controle e tolerante, sendo * $p < 0,05$

4.9 Western Blotting

4.9.1 Bcl2

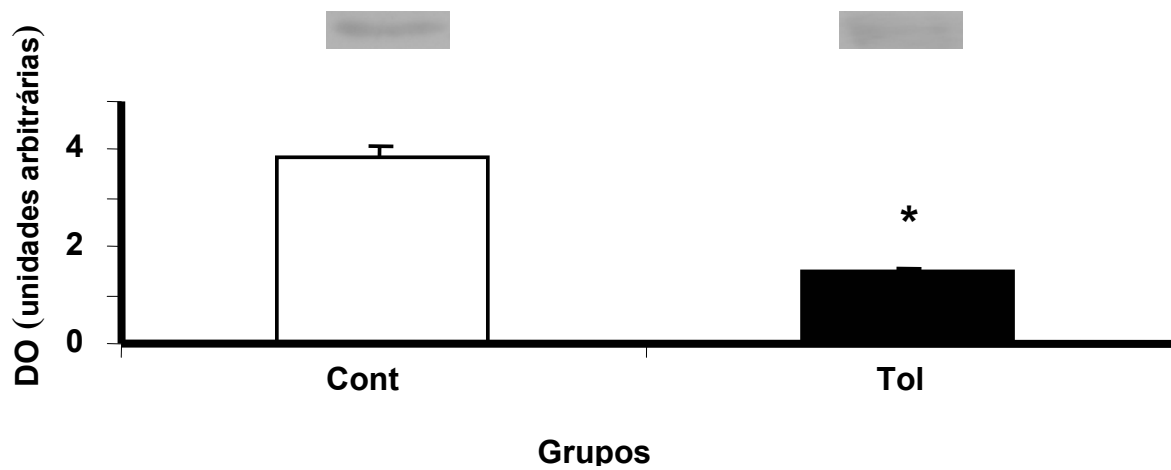


Figura 18: Western Blotting Bcl2

Observamos diferença entre os grupos controle e tolerante, sendo $p < 0,05$

4.9.2 Caspase 2

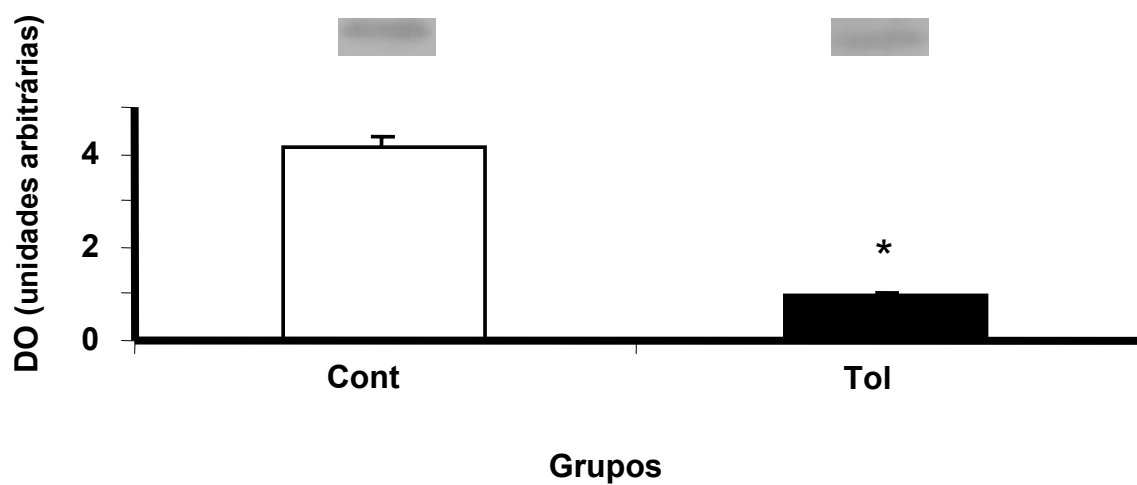


Figura 19: Western Blotting Caspase 2

Observamos diferença entre os grupos controle e tolerante, sendo $p < 0,05$

4.9.3 Bax

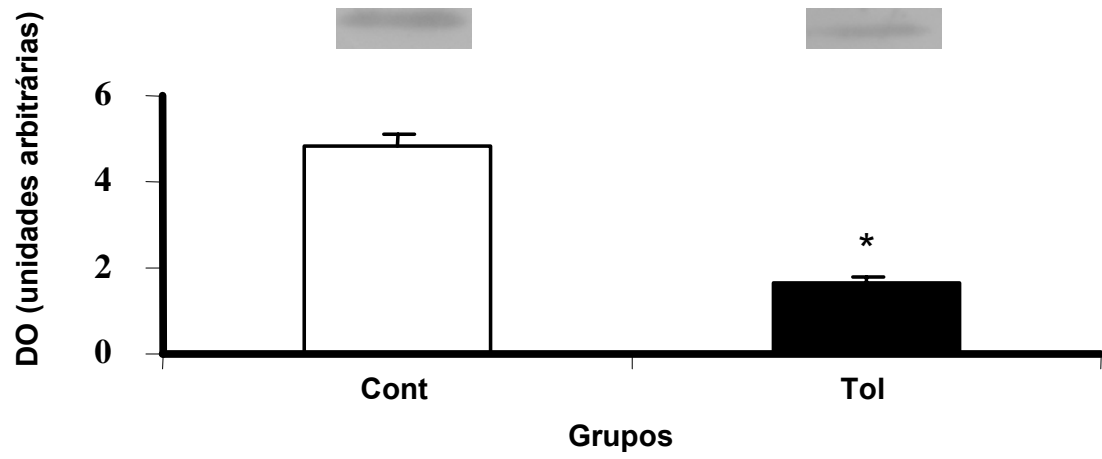


Figura 20: Western Blotting Bax

Observamos diferença entre os grupos controle e tolerante, sendo $p < 0,05$

4.10 Atividade da caspase 1

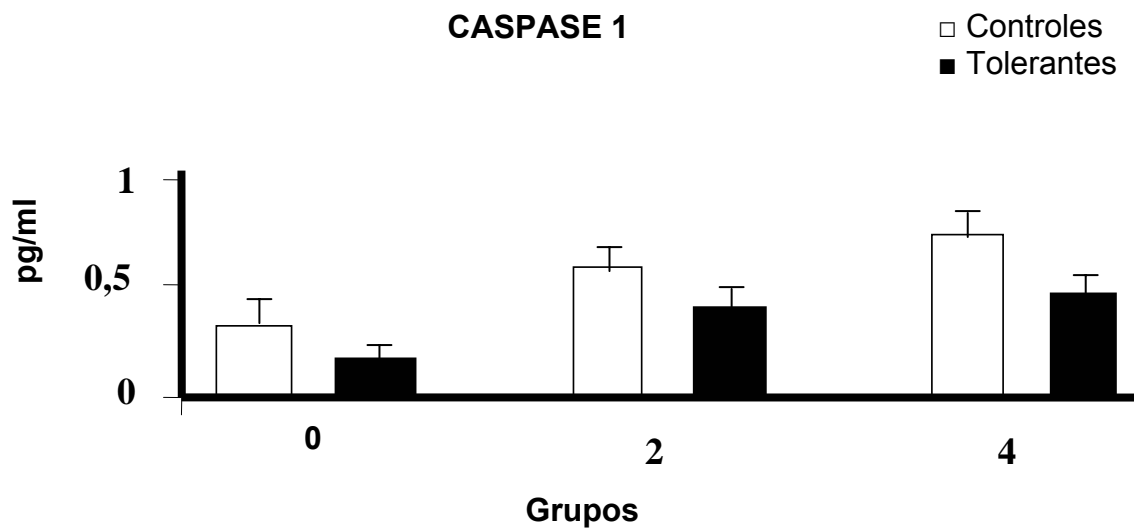


Figura 21: Atividade Caspase 1

Legenda:

0 h- células dos baços dos grupos controles e tolerantes sem a dose letal de LPS (20mg/kg).

2 h- células dos baços dos grupos controles e tolerantes com a administração da dose letal de LPS (20 mg/kg) seguidos do sacrifício dos animais em 2 horas após a dose letal.

4 h- células dos baços dos grupos controles e tolerantes com a administração da dose letal de LPS (20 mg/kg) seguidos do sacrifício dos animais em 4 horas após a dose letal.

N: 5 animais/ grupo

4.11 Citometria de Fluxo

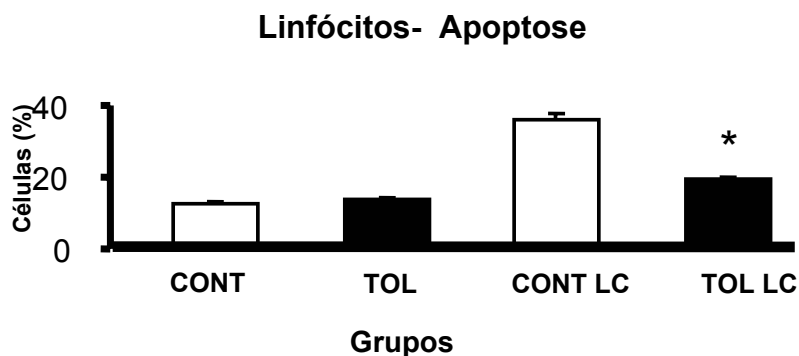


Figura 22: Citometria de Fluxo- Linfócitos- Apoptose

Observamos diferença entre os grupos CONT LC e TOL LC, sendo * $p < 0,03$

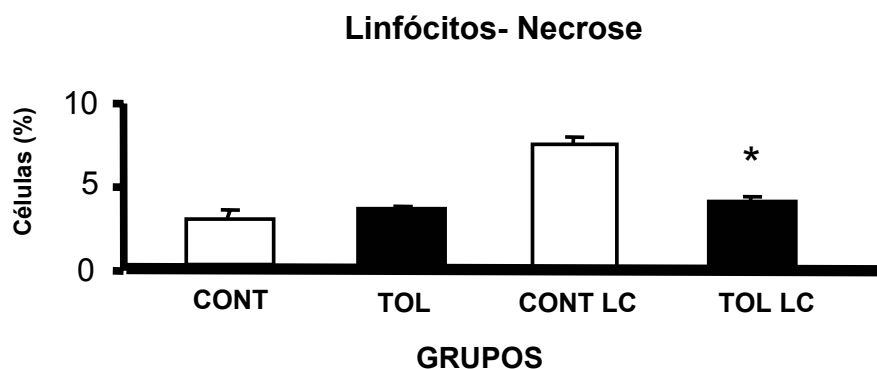


Figura 23: Citometria de Fluxo- Linfócitos- Necrose

Observamos diferença entre os grupos TOL LC e CONT LC, sendo * $p < 0,05$

Legenda:

CONT: Grupo controle.

TOL: Grupo tolerante, receberam 1mg/kg de LPS durante 5 dias.

CONT LC: Grupo controle, receberam SF 0,5ml subcutâneo durante 5 dias e no 7° dia realizamos Ligadura cecal (LC).

TOL LC: Grupo tolerante, receberam LPS (1mg/kg) subcutâneo durante 5 dias e no 7° dia realizamos Ligadura cecal (LC).

(Utilizamos 10 animais / grupo)

5) Curva de Mortalidade: Ligadura Cecal

O estudo de mortalidade revela que a taxa de sobrevivência aumenta nos animais que receberam tratamento com LPS–dose tolerante 1mg/Kg (tolerantes), quando comparados aos animais que receberam salina (0,5 ml) (figura 24). Houve sobrevivência de 98% dos animais tolerantes. Em todos os animais realizamos a ligadura cecal (fio de algodão 3.0) de aproximadamente 5 mm e 2 furos com agulha de 0,9x30mm na porção ligada.

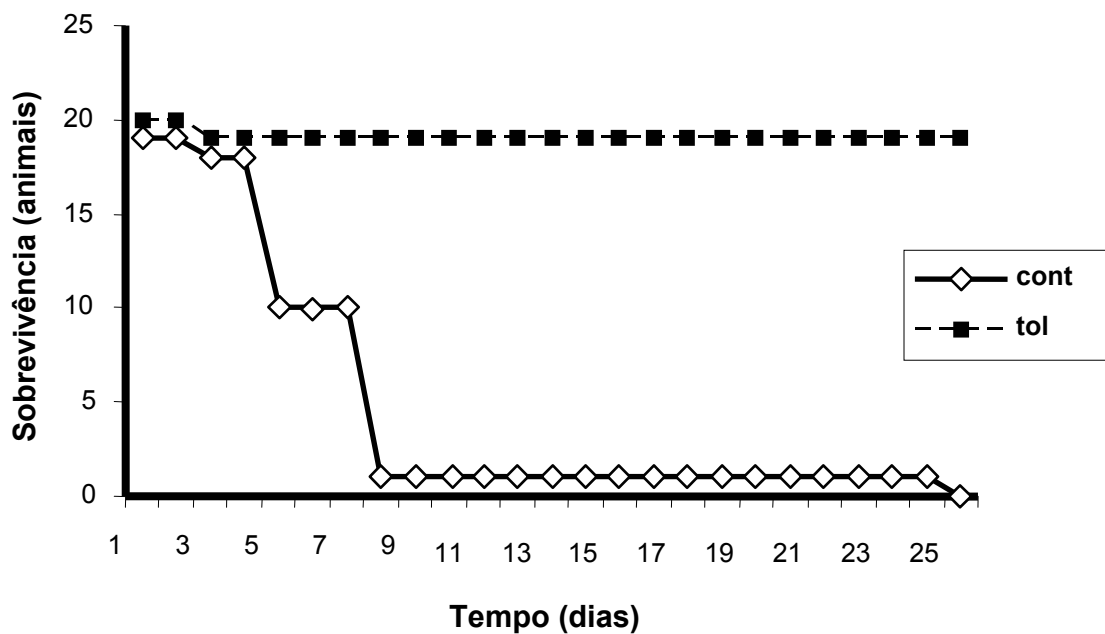


Figura 24: Curva de mortalidade para um período de 30 dias de observação

5. Discussão

A sepse ocorre em resposta a uma variedade de estímulos infecciosos com liberação excessiva de mediadores pró-inflamatórios, conhecida como síndrome da resposta inflamatória sistêmica. Sugere-se melhor entendimento da Sepse e da SIRS através da criação de modelos de resposta inflamatória e da prevenção e tratamento de todas as condições que favoreçam o desenvolvimento de SIRS [28]. O entendimento dos principais eventos pró e anti-inflamatórios que induzem a danos teciduais é, sem dúvida, o primeiro passo na tentativa de melhorar o prognóstico dessa doença e estabelecer a terapêutica adequada.

5.1 Mediadores inflamatórios envolvidos na sepse

5.1.1 Citocinas

Dentre os mediadores endógenos, liberados, primeiramente, pelas células residentes e, posteriormente, pelas células recrutadas para o foco infeccioso, as citocinas desempenham um papel primordial na resposta do hospedeiro. Citocinas como a interleucina-1 (IL-1), o fator de necrose tumoral (TNF- α), a IL-10 e as demais citocinas promovem o recrutamento de leucócitos para o sítio inflamatório, bem como sua ativação com conseqüente aumento da atividade microbicida, sendo a resposta local fundamental para o

controle da infecção. A evolução de uma infecção localizada para um quadro sistêmico caracteriza-se pela presença de citocinas pró-inflamatórias na circulação e ativação das células circulantes, podendo, também, haver a presença de bactérias, endotoxinas ou exotoxinas.

Citocinas inflamatórias são mediadores liberados predominantemente pelos monócitos e linfócitos. Estas citocinas desempenham então papéis importantes no desenvolvimento da sepse, interferindo no prognóstico, evolução e intensidade do dano tecidual. A resposta inflamatória sistêmica pode ser desencadeada por fatores infecciosos e não infecciosos, porém os modelos mais utilizados para pesquisa são com lipopolissacáride (LPS), componente da membrana externa de bactérias gram negativas, que possui grande poder imunogênico. A endotoxina, LPS, liga-se a um número diferente de carreadores moleculares, sendo o mais importante destes a proteína ligadora de lipopolissacáride (LBP). O complexo LPS-LBP é então capaz de interagir com monócitos através dos receptores de superfície celular chamado CD14 [31].

A interação com outros alvos do hospedeiro, como as células endoteliais que não expressam CD14 na sua superfície, é mediada por molécula de CD14 solúvel, que então se liga ao complexo LPS-LBP. Toxinas bacterianas com grande capacidade antigênica (superantígenos) causam hipotensão e falência orgânica em modelos animais [27]. Essas proteínas ativam linfócitos T e estimulam sua proliferação via interação inespecífica com moléculas da classe II do complexo de histocompatibilidade maior das células apresentadoras de antígeno e via receptores variáveis de células T de cadeia b [4].

A neutralização do LPS representa a primeira tentativa na terapia anti-mediadora da sepse. Entretanto a maioria dos ensaios clínicos falhou em demonstrar a diminuição da mortalidade após a aplicação de anticorpos anti-LPS em modelos com infecção por bactérias gram - negativas [6-9]. As limitações atuais no diagnóstico precoce de infecções por bactérias gram - negativas, associadas aos limitados benefícios terapêuticos dos anticorpos monoclonais anti-LPS e do elevado custo, desencorajam sua aplicação clínica.

Em meados de 1970, descobriu-se o TNF (fator de necrose tumoral) como resultado de longas pesquisas sobre mecanismos que caracterizavam os efeitos induzidos por endotoxinas [30-31]. Entretanto, somente após a clonagem dos genes para o TNF é que as investigações sobre seus efeitos tornaram-se mais claras. O envolvimento do TNF como mediador do choque endotóxico foi descrito inicialmente por Beutler *et al.* e Tracey *et al.*, demonstrando que a imunização passiva contra o TNF protegia ratos dos efeitos letais das endotoxinas, como hipotensão, taquicardia e taquipnéia [30-31]. Em nosso modelo observamos uma menor produção de TNF nos animais tolerantes após uma exposição a doses altas de LPS, podemos verificar também o mesmo comportamento quanto à análise dos genes envolvidos com a expressão do TNF, evidenciando sempre menor expressão no grupo tolerante em relação ao controle, resultado comprovado também em relação à análise do PCR. Sabe-se que o TNF estimula a liberação de outras citocinas, como a IL-1 e IL-6, Interferon- γ e IL-12.

A interleucina-1 é formada por duas moléculas diferentes; IL-1 β e IL-1 α . Quando administrada em animais ou humanos, produz vários dos efeitos

observados semelhante ao TNF exógeno, como febre, anorexia, sonolência e hipotensão [22-25]. A IL-1 produz aumento na concentração de fatores estimuladores de colônia, aumento de IL-6, aumento das proteínas de fase aguda hepática, reabsorção óssea, inibição da lipoproteína-lipase, indução de PGE2 e da síntese do colágeno [18]. Estudamos a IL1- β e verificamos diferença entre o grupo controle e tolerante em 0 e 4 horas, com aumento da produção no grupo controle, assim como o observado na análise dos genes por microarray e sua confirmação por RT-PCR, a IL6 mostrou aumento na expressão do grupo controle em 2 horas em relação ao tolerante, com isso podemos supor que a expressão de IL1 em 2 horas estaria influenciando diretamente este aumento de IL-6. A IL-6 participa, principalmente, na indução da febre e na produção, pelo fígado, de proteínas de fase aguda. Paralelamente à liberação das citocinas pró-inflamatórias, o organismo responde a agentes infecciosos, liberando citocinas anti-inflamatórias como IL-4, IL-10, IL-13, TGF- β , o antagonista de receptor da IL-1 (IL-1ra), além de receptores solúveis para IL-1 (IL-1R tipo II), IL-6 e outros. Esses mediadores são encontrados tanto nos soros como em exsudatos obtidos de pacientes com sepse ou em modelos experimentais, e parecem tanto contrabalançar as ações dos mediadores pró-inflamatórios, através da redução da síntese e da liberação desses mediadores, quanto antagonizar seus efeitos [28]. Em modelos de endotoxemia, em camundongos, a IL-10 apresenta um efeito protetor que estaria relacionado à inibição da produção de TNF- α [28, 29, 30]. Em nossos resultados não encontramos diferença na produção da IL-10 entre os grupos controle e o tolerante.

Baseados nos resultados apresentados até então, pode-se sugerir que a exacerbação da liberação de citocinas pró ou anti-inflamatórias está fortemente relacionada com a severidade e mortalidade na sepse, sendo primordial o equilíbrio desses mediadores para a resolução dessa doença [19].

Além das citocinas, os mediadores lipídicos (como as prostaglandinas, PAF e leucotrienos) e os componentes plasmáticos (cininas, fatores da coagulação e complemento) também participam do desenvolvimento da sepse, induzindo, dentre outros efeitos, a migração e ativação celular, a vasodilatação, a agregação plaquetária e o aumento de permeabilidade vascular.

5.1.2 Óxido Nítrico

O acúmulo de leucócitos e sua ativação pelos mediadores descritos acima levam à formação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, como ânion superóxido (O_2^-) e óxido nítrico (NO), respectivamente. Além dos seus efeitos próprios, esses radicais também podem reagir entre si, produzindo o peroxinitrito (ONOO⁻), um potente agente oxidante [3]. O NO é formado a partir da oxidação do nitrogênio terminal do aminoácido L-arginina pela ação da enzima sintase de óxido nítrico (*nitric oxide synthase* – NOS). Existem, pelo menos três, isoformas bem definidas dessa enzima, que são:

- 1) NOS neuronal (NOS_n ou NOS I), descrita inicialmente nos neurônios;
- 2) NOS induzida (NOS_i ou NOS II), presente em leucócitos ativados e
- 3) NOS endotelial (NOS_e ou NOS III), primeiramente encontrada nas células endoteliais. Dentre seus inúmeros efeitos, o NO é uma molécula que

apresenta atividade vasodilatadora e citotóxica, e sua produção, quando desregulada, contribui significativamente para a patogênese da sepse e para o choque séptico [16]. Hoje está claro que o NO responsável pela maioria dos efeitos patológicos na sepse é procedente da atividade da enzima induzida, que é capaz de produzir NO em concentração micromolar, em comparação à enzima constitutiva que produz esse mediador apenas em concentração nanomolar. A NOS II é induzida por citocinas, como TNF- α , IL-1 β , interferon- α , β e γ (IFN- α , β e γ), liberadas tanto durante um processo inflamatório, ou infeccioso [7] como durante a endotoxemia [4].

O óxido nítrico (NO) está normalmente presente tanto no coração como na parede dos vasos, e após exposição à endotoxina lipopolissacáride ou TNF, em nível de células endoteliais e musculatura lisa da parede vascular, ocorre indução da isoforma cálcio-independente NO sintetase, denominada NO sintetase induzida. Esta indução leva a grande produção de NO, contribuindo assim para a vasodilatação e resistência à vasoconstritores característicos do choque séptico. A endotoxina também induz síntese de NO no músculo liso venoso, além do miocárdio e endocárdio, contribuindo para a diminuição do retorno venoso e disfunção do miocárdio.

Em indivíduos com choque séptico, baixas doses de N^G-monometil-L-arginina (inibidor NO sintetase), associado à terapia básica, reverte a hipotensão. Experiências em animais sugerem que a administração de arginina em altas doses leva a abolição completa da produção de NO pela inibição das NO sintetase induzida e constitutiva, gerando vasoconstricção intensa, lesão de órgão alvo e morte rápida. Encontramos os genes

localizados em F02a (óxido nítrico sintase 3) e O10a (óxido nítrico sintase 1), sendo que há maior expressão no grupo controle em relação ao tolerante.

Portanto, a descoberta do óxido nítrico (NO) como mediador de hipotensão, LPS e TNF-induzida, foi considerada uma grande descoberta, que levaria a rápida solução para o problema da hipotensão na sepse. Nossos animais tolerantes estariam então, de acordo com os resultados analisados, com uma menor quantidade na expressão de NO. No entanto, o NO é considerado uma molécula com propriedades tanto protetoras como deletérias. O NO sintase atua como mensageiro molecular e parece ser ativador endógeno do GMPc, que é responsável por vasodilatação, inibição da agregação plaquetária e modulação da adesão dos leucócitos no endotélio. As células endoteliais constituem uma barreira importante entre o sangue e o espaço extra-celular. É fonte também de síntese e secreção de moléculas que desempenham importante papel fisiológico e que caem na corrente sanguínea, influenciando a integridade funcional e estrutural da circulação.

Está claro que mediadores como TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8 e NO apresentam papéis fundamentais na sepse, e que os mediadores anti-inflamatórios estão presentes, concomitantemente, modulando os efeitos e a liberação dos mediadores inflamatórios. A relação desses mediadores é fundamental para a evolução ou resolução do processo, porém o fator determinante para uma direção, ou para outra, não está claro ainda hoje. Vale a pena ressaltar a participação das citocinas e do NO na migração de neutrófilos e a importância desse evento para a resolução da doença. A

falência da migração de neutrófilos, durante o choque séptico, correlaciona-se com a alta mortalidade, e o NO parece ser a molécula efetora no processo de redução da migração.

5.1.3 Estresse oxidativo

Vários mecanismos fundamentais da inflamação envolvem a geração de radicais livres. A síntese de prostaglandinas e leucotrienos a partir do ácido aracdônico constituem duas séries de mediação dos radicais livres na lipoperoxidação que pode iniciar por radicais livres adjacentes. A proteção contra microorganismos exercida pelos fagócitos teciduais e pelos neutrófilos circulantes é facilitada pela geração inicial de superóxido por uma membrana especializada contendo uma oxidase associada e a subsequente geração de ácido hipocloroso e secundariamente clorameinas reativas pela mieloperoxidase. Evidências recentes sugerem que a enzima xantina-oxidase geradora de radicais livres, localizada na superfície luminal de células endoteliais microvasculares pode agir como ativador do mecanismo de aprisionamento, ingestão e morte de microorganismos circulantes dentro do sistema reticulo-endotelial. Neste local ela pode ser ativada rapidamente pela proteólise ainda que inicial e estimulada por citocinas circulantes (fator de necrose tumoral, interleucina-3), bactérias, endotoxinas ou outros estímulos inflamatórios.

Realizamos análise do MDA plasmático através do TBARS (Teste das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico). A lipoperoxidação é um marcador para a lesão das membranas celulares e, no método de TBARS, é

aferida através da formação de um composto intermediário da lipoperoxidação, o malondialdeído. Os níveis desse composto mostraram-se aumentados no grupo tolerante em 4 horas, evidenciando um aumento do estresse oxidativo. Essa elevação pode ser atribuída à geração dos radicais triclorometil ($-CCl_3$), o qual se combina com oxigênio e forma o radical triclorometil-peróxil ($-O_2CCl_3$), após a metabolização do tetracloreto de carbono no complexo enzimático citocromo p-450. Este resultado sugere que a tolerância promova a peroxidação lipídica provocada pelo CCl_4 , aumentando a capacidade de eliminação das bactérias.

5.2 Heat Shock Proteins

Nos últimos dez anos, mais de 10.000 trabalhos científicos foram publicados a respeito das HSP (Heat Shock Proteins), ou proteínas do choque térmico, e da resposta ao choque térmico, ou HSR (Heat Shock Response). Muitos outros vieram à luz focalizando outras respostas celulares ao estresse. O conhecimento destes fenômenos básicos é indispensável à compreensão de inúmeras condições patológicas. Múltiplas pesquisas estão em andamento, há ainda muito que se descobrir, mas a relevância do assunto justifica plenamente o seu estudo. Verificou-se, posteriormente, que a HSP era um fenômeno praticamente universal entre todos os seres vivos. Esta resposta é caracterizada por um aumento extremamente rápido na expressão de um grupo seletivo de proteínas, as

HSP, o que não ocorre apenas após exposição ao calor, mas também quando as células são expostas a diversos outros desafios metabólicos, incluindo análogos de aminoácidos, diversos metais pesados, agentes que modificam as sulfidrilas protéicas, diversos ionóforos e outros venenos metabólicos. Células submetidas a estresse podem sobreviver ou morrer, na dependência do tipo celular, tipo e intensidade do estresse e de outros fatores. A exposição prévia das células a estresses não-mortais pode suscitar a HSR, com a síntese de HSP. Uma nova exposição das células a estresses vai produzir menos lesões. As células que sintetizaram as HSP ficam protegidas contra novas exposições, o que se reflete em menores lesões também no organismo ou em partes dele. Verificamos na análise dos genes a expressão do 47-kDA Heat Shock protein precursor (F05c), uma grande redução na expressão do grupo tolerante em relação ao controle. Os níveis aumentados de proteínas do estresse dão às células meios para: a) identificar e talvez facilitar redobramento de proteínas afetadas de modo adverso pelo estresse metabólico; b) identificar e fazer ligação com proteínas anormalmente dobradas, de modo que estas sejam marcadas e enviadas a um sistema proteolítico adequado, assim facilitando a eliminação das proteínas defeituosas; c) facilitar a síntese e a maturação de novas proteínas, que irão substituir aquelas destruídas no estresse metabólico.

Têm coerência as observações de que as HSP protegem células e tecidos dos efeitos deletérios da inflamação, o que ocorreria através da prevenção da quebra de cadeias de DNA e peroxidação lipídica, bem como através de proteção da estrutura e função das mitocôndrias. *In vivo*, o

choque térmico protege órgãos contra uma série de lesões associadas com produção aumentada de citocinas. Dentre as respostas celulares ao estresse hoje conhecidas, a HSR parece ser aquela que muitos benefícios poderá gerar. É fácil entender que, sendo as proteínas as substâncias básicas mais importantes nas funções celulares, sua desnaturação pode acarretar lesões sérias, enquanto sua preservação e defesa podem aumentar a resistência das células e organismos contra uma longa série de lesões. Estas terminam por induzir necrose ou apoptose celulares por caminhos que são convergentes e comuns, independentemente do mecanismo inicial das doenças ou eventos traumáticos.

5.3 Apoptose

5.3.1 Seps e Apoptose

Os mecanismos da seps envolvem processos inflamatórios exacerbados, evoluindo para a falência de múltiplos órgãos e óbito do paciente. O evento mais importante para a evolução do quadro séptico é a apoptose das células efetoras do sistema imune, como linfócitos e células dendríticas [32-34]. A eliminação de um grande número de células do sistema imune compromete a defesa efetiva do hospedeiro. A apoptose na seps foi alvo de estudos, demonstrando que a prevenção dos eventos apoptóticos aumenta a sobrevivência de maneira relevante em modelos animais de seps [35,36,48,49,50,51].

5.3.2 Apoptose e seus mecanismos

A apoptose é de extrema importância em diversos eventos celulares, como por exemplo, durante a embriogênese [37-39], nas modificações normais do tecido, na maturação e mecanismos efetores do sistema imune [40], desenvolvimento de órgãos, do sistema nervoso e remodelação de tecidos hormônio- dependentes [41].

Defeitos ligados à regulação da apoptose, tanto pela falta, incapacidade de atuar, resistência aumentada ou mesmo sua hiperestimulação, têm sido ligados ao desenvolvimento de doenças auto-imunes, patologias tumorais, infecções virais, sepsis e falência múltipla de órgãos [42]. Atualmente os estudos dos mecanismos de regulação e indução de apoptose são de grande importância para a melhor compreensão da fisiopatogenia dessas doenças.

O processo apoptótico envolve uma seqüência de eventos, entre eles: a diminuição do volume celular, o aumento da densidade citoplasmática, condensação e separação da cromatina em massas circunscritas que se aderem à membrana nuclear e podem formar protusões tipo vesículas. Inicialmente a mitocôndria e o Complexo de Golgi não mostram sinais de edema e a membrana nuclear permanece intacta por um longo período de tempo. Por outro lado, células necróticas mostram acúmulo de cromatina dentro de massas mal definidas, intenso edema de organelas e, em um estágio tardio, a quebra das membranas e a desintegração celular. A regulação genética da apoptose envolve um grande número de genes classificados em 3 grupos distintos: Os genes supressores da apoptose

(pertencentes à família Bcl-2); genes que atuam como efetores da apoptose, como os das caspases e alguns da família Bcl-2, e genes intermediários, como Fas/ Fas ligante, p53, myc e WAF 1 [32]

Ohta e Yamashita em 1999 [38], descreveram que os fatores que controlam a apoptose podem ser classificados em indutores, salientadores, efetores e inibidores. A apoptose pode ser induzida por vários estímulos fisiológicos e patofisiológicos, incluindo receptores de moléculas específicos, como por exemplo, CD95, TLRs, Trail ou o receptor para TNF (fator de necrose tumoral), mas também por outros fatores de estresse celular como ausência de fatores de crescimento, irradiação, luz ultravioleta e calor excessivo (Fig. 25). A cascata de eventos que levam à apoptose envolvem as caspases [44].

Caspases são proteinases cisteína-aspartato específicas, conhecidas por seu papel na apoptose e na maturação de citocinas pró-inflamatórias (caspases inflamatórias), são essenciais para a iniciação e execução da apoptose e para a maturação de citocinas pró-inflamatórias IL1- β e IL-18. Em humanos a família das caspases inclui 13 membros que são classificados em 3 grupos: as caspases iniciadoras (2, 8, 9 e 10), as executoras da apoptose (3, 6, 7) e as caspases inflamatórias (1, 4, 11). Tanto as caspases inflamatórias como as apoptóticas são sintetizadas como zimógenos inativos e são constituídas por um pró-domínio e uma região catalítica [44].

Nossos conhecimentos sobre os mecanismos que levam à ativação das caspases inflamatórias têm aumentado nos últimos anos. Sabemos que produtos bacterianos, ATP ou Nigericina resultam em acidificação citosólica,

levando à ativação da caspase 1, entretanto não são conhecidos os sinais que levam a esta ativação [41]. Sabe-se que a apoptose pode ser regulada geneticamente, por meio de proteínas codificadas que atuam, de forma sinérgica, tanto na promoção de morte como da proliferação celular, ativando ou inibindo enzimas pró-apoptóticas. O Bcl-2 codifica proteínas reguladoras da apoptose [43], localizadas na membrana mitocondrial e no retículo endoplasmático, controlando canais que regulam o influxo de cálcio intracelular [41]. Duas famílias de proteínas codificadas já foram reconhecidas: uma para inibição da apoptose, tais como Bcl-2 e Bcl-xl, que estabilizam a membrana da mitocôndria [45] e outra família para a sua promoção, composta por Bax, Bad, Bak, Bcl-xs, MOMP, Bad, Bim, Noxa, Puma [42,43,45]. Estas últimas levam a um aumento na permeabilidade da membrana da mitocôndria e, assim, permitem a liberação de citocromo-C (Apaf-2) para o citosol. Já o citocromo-C pode ser regulado pelo fator indutor de apoptose (IAF), liberado simultaneamente ao citosol, que promove a sua atuação e desta forma permite a ativação da caspase 9 [41]. Por outro lado, o fator inibidor de caspase (IAP) antagoniza a ação da caspase 9, prevenindo a apoptose [42]. Além do Bcl-2, outro grupo de genes pode participar na regulação da apoptose.

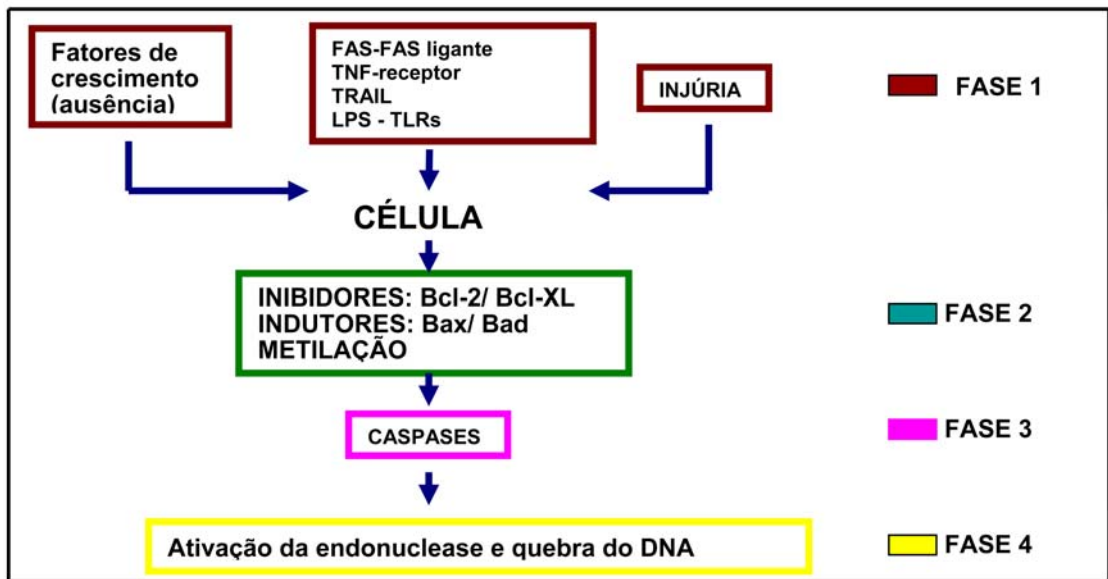


Figura 25: Representação esquemática dos eventos apoptóticos

A **fase 1** na figura representa os múltiplos estímulos de apoptose. Esses incluem TNF, TLRs- LPS, Fas-ligante, ausência de fatores de crescimento ou hormônios e agentes de injúria e células citotóxicas.

A **fase 2** é a fase de controle e integração, influenciada pelos membros da família de proteínas Bcl-2, que podem inibir ou promover a morte celular e pela metilação que pode ativar caspase 3.

A **fase 3** é a fase das caspases executoras da apoptose, onde ocorre a ativação da endonuclease citoplasmática, e a protease degrada o citoesqueleto e proteínas nucleares. Isso leva a uma degradação intracelular, incluindo a fragmentação da cromatina e a quebra do citoesqueleto.

A **fase 4** representa a formação dos corpos apoptóticos, contendo várias organelas intracelulares e outros componentes do citoplasma.

5.3.3 Mecanismos apoptóticos na sepse

A apoptose na sepse pode ocorrer por 2 vias distintas, que ativam as caspases efetoras, a primeira via seria através dos receptores de morte, envolvendo a ativação de membros da família do receptor para TNF, com o envolvimento do domínio de morte intracelular como Fas e ativação do receptor TLR através do LPS, ocorrendo então o recrutamento das caspases iniciadoras, como a caspase 8 que ativa caspases 3, 6 e 7 que são as caspases executoras. A segunda via apoptótica é também chamada de via intrínseca, mediada através das mitocôndrias, regulada pela família Bcl-2, ativando caspases e executando a morte celular. Alguns autores propõem a interligação dessas vias através da ativação do Bid, que é um componente pró-apoptótico presente na família do Bcl-2, ele é clivado e ativado pela caspase 8, resultando num Bid truncado (t Bid), entretanto os mecanismos exatos não são conhecidos [33] (Fig. 26).

Em nossos estudos mostramos que há uma importante redução na expressão dos genes ligados a componentes principais das vias apoptóticas nos animais tolerantes quando comparados aos controles, como por exemplo: caspases 7, 8 e 11, Bid e Apaf 1.

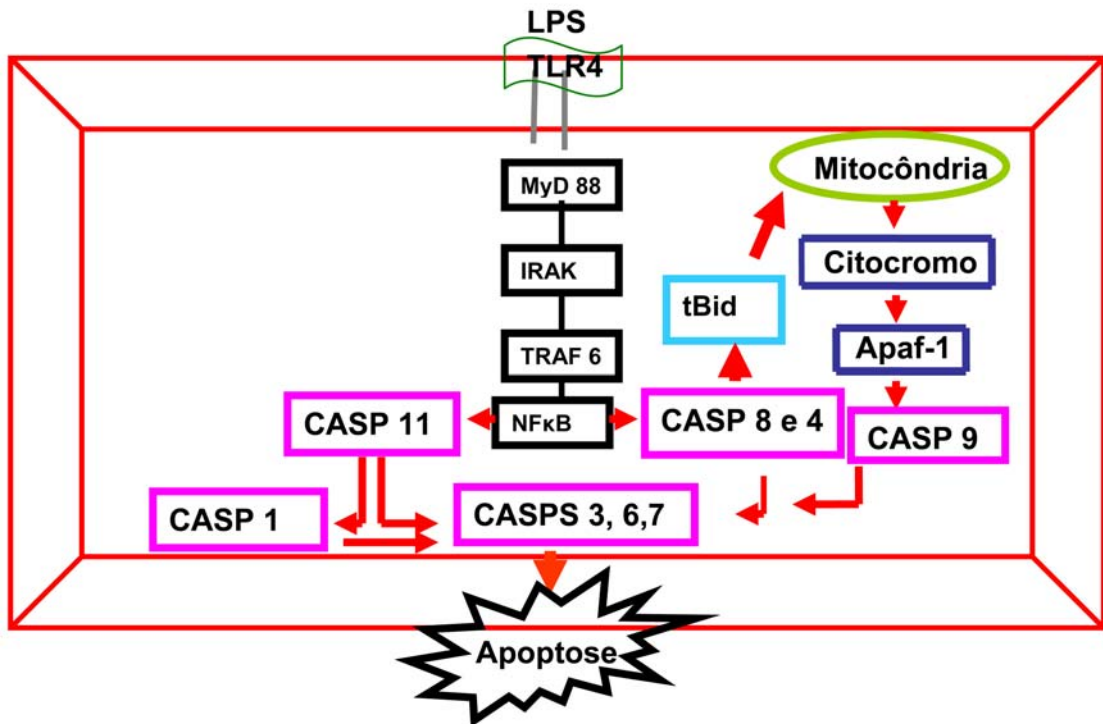


Figura 26: Representação dos eventos apoptóticos na sepse

Na **figura 26** observamos que os TLRs são responsáveis pela sinalização celular para o início da cascata apoptótica induzida por LPS. O LPS estimula a célula, ativando as vias de sinalização inflamatórias, como MyD 88, IRAK e TRAF6, que ativa NF-κB. O NF-κB ativa Caspase 11 e Caspases 8 e 4, ambas ativam Caspases 3, 6 e 7, sendo que a Caspase 11 ativa também Caspase 1, que também atua sobre as Caspases 3, 6 e 7, além de agir diretamente para a promoção da morte celular através da degradação do material nuclear. A apoptose via mitocondrial, ocorre através da ativação do citocromo-c, levando a liberação da APAF-1, que ativa caspase 9, ativando as caspases efetoras e promovendo a apoptose. Através do tBid ocorre a interligação entre as 2 vias.

5.3.4 A Tolerância ao LPS inibe a apoptose

Mostramos que animais de experimentação submetidos à exposição com doses sub-letais de LPS induzem um estado de resistência adquirida e se tornam resistentes a doses letais, pirogênicas e metabólicas de LPS.

As fases inicial e tardia da tolerância com características diferentes seguem a injeção inicial do LPS. A fase inicial pôde ser detectada dentro das primeiras 24 horas depois de exposição ao LPS e durou até 8 dias. A tolerância ao LPS relaciona-se à produção e liberação reduzida de citocinas pelos fagócitos em re-exposição ao LPS. Além disso, foi demonstrado que a exposição prévia ao LPS resulta em alteração do padrão de expressão gênica das citocinas.

Nossos animais tolerantes ao LPS apresentaram diminuição dos eventos apoptóticos. Mostramos uma redução na expressão dos genes ligados às caspases 7, 8 e 11 nos animais tolerantes, em relação aos controles, assim como a redução dos genes ligados ao Bid e Apaf-1 também no grupo tolerante ao LPS. A proteína enzimática Bid (presente na mitocôndria e pertencente à família do Bcl-2) promove uma queda do potencial de membrana, permitindo que a mitocôndria libere, para o citoplasma, moléculas pró-apoptóticas como o citocromo-C (Apaf-2). O citocromo-C se liga à Apaf-1, que ativam a caspase 9, que atua sobre a caspase 3, onde as endonucleases são ativadas e inicia-se o processo de degradação do material nuclear. Porém o papel das caspases nos eventos apoptóticos via mitocondrial ainda é pouco conhecido [34].

Do mesmo modo, verificamos a diminuição da apoptose através da redução na expressão do gene ligado ao receptor Fas, nos animais tolerantes ao LPS em relação aos controles, diminuindo a ativação da pró-caspase 8 e conseqüentemente menor ativação das caspases efetoras com redução da apoptose.

Kang et al, em 2002 [35] mostrou que camundongos deficientes para caspase 11 são resistentes ao choque séptico induzido por LPS e que a caspase 11 ativa caspase 1, promovendo a transformação de pró IL1 β e pró IL18 em IL1 β e IL18, portanto as caspases 1 e 11 são chamadas de caspases inflamatórias.

Com estes resultados podemos propor que a tolerância seria benéfica na redução da apoptose e controle do quadro séptico, intervindo nas 2 vias da apoptose, além disso, a diminuição na expressão do gene ligado à caspase 11 estaria contribuindo para a diminuição do quadro inflamatório, pois a caspase 11 é um mediador essencial na resposta ao choque séptico. A modulação das caspases inflamatórias seria importante para atenuar o quadro séptico.

5.4 Outros genes envolvidos no processo séptico

Nos últimos cinco anos houve uma grande explosão a respeito do conhecimento do genoma humano e da resposta inflamatória do paciente com doença infecciosa. A resposta inflamatória já é conhecida por ativar

dezenas de genes, tornando o seu estudo e compreensão mais difíceis. O surgimento da ferramenta de macroarray ampliou este horizonte, encontramos inúmeros genes que ainda não foram analisados em detalhes, em oportunidades futuras serão estudados, contribuindo assim para o aumento do conhecimento sobre a sepse.

6. Conclusões

Os achados deste estudo permitem concluir:

1. A tolerância induzida com a dose de 1mg/kg de LPS mostrou ausência de mortalidade em camundongos Balb-C quando comparados à dose de 0,5mg/kg de LPS que apresentou 60% de sobrevivência;
2. Há uma redução na expressão dos genes: relacionados às citocinas, heat shock proteins, óxido nítrico e apoptose nos animais tolerantes;
3. Ocorre uma redução na expressão dos genes relacionados à apoptose na sepse tanto na via intrínseca, extrínseca como na via mitocondrial. Fator importante na redução da morte celular e na mortalidade dos animais no quadro séptico.

7. Referências

1. Vincent, J.L., *Update on sepsis: pathophysiology and treatment*. Acta Clin Belg, 2000. 55(2): p. 79-87.
2. Abraham, E., et al., *Consensus conference definitions for sepsis, septic shock, acute lung injury, and acute respiratory distress syndrome: time for a reevaluation*. Crit Care Med, 2000. 28(1): p. 232-5.
3. Bohuslav, J., et al., *Regulation of an essential innate immune response by the p50 subunit of NF-kappa B*. J Clin Invest, 1998. 102(9): p. 1645-52.
4. Mills, C.D., M.D. Caldwell, and D.S. Gann, *Evidence of a plasma-mediated "window" of immunodeficiency in rats following trauma*. J Clin Immunol, 1989. 9(2): p. 139-50.
5. Moore, F.A., E.E. Moore, and R.A. Read, *Postinjury multiple organ failure: role of extrathoracic injury and sepsis in adult respiratory distress syndrome*. New Horiz, 1993. 1(4): p. 538-49.
6. Brun-Buisson, C., et al., *Incidence, risk factors, and outcome of severe sepsis and septic shock in adults. A multicenter prospective study in intensive care units. French ICU Group for Severe Sepsis*. Jama, 1995. 274(12): p. 968-74.
7. Salvo, I., et al., *The Italian SEPSIS study: preliminary results on the incidence and evolution of SIRS, sepsis, severe sepsis and septic shock*. Intensive Care Med, 1995. 21 Suppl 2: p. S244-9.
8. Angus, D.C., et al., *Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care*. Crit Care Med, 2001. 29(7): p. 1303-10.

9. Bone, R.C., *Sepsis, the sepsis syndrome, multi-organ failure: a plea for comparable definitions*. Ann Intern Med, 1991. 114(4): p. 332-3.
10. Cipolle, M.D., M.D. Pasquale, and F.B. Cerra, *Secondary organ dysfunction. From clinical perspectives to molecular mediators*. Crit Care Clin, 1993. 9(2): p. 261-98.
11. Pollack, M. and C.A. Ohi, *Endotoxin-based molecular strategies for the prevention and treatment of gram-negative sepsis and septic shock*. Curr Top Microbiol Immunol, 1996. 216: p. 275-97.
12. Grinnell, B.W. and D. Joyce, *Recombinant human activated protein C: a system modulator of vascular function for treatment of severe sepsis*. Crit Care Med, 2001. 29(7 Suppl): p. S53-60; discussion S60-1.
13. Cao, C., et al., *Involvement of cyclooxygenase-2 in LPS-induced fever and regulation of its mRNA by LPS in the rat brain*. Am J Physiol, 1997. 272(6 Pt 2): p. R1712-25.
14. Medzhitov, R. and C. Janeway, Jr., *Innate immunity*. N Engl J Med, 2000. 343(5): p. 338-44.
15. Medzhitov, R. and C.A. Janeway, Jr., *An ancient system of host defense*. Curr Opin Immunol, 1998. 10(1): p. 12-5.
16. Skidmore, B.J., et al., *Immunologic properties of bacterial lipopolysaccharide (LPS): correlation between the mitogenic, adjuvant, and immunogenic activities*. J Immunol, 1975. 114(2 pt 2): p. 770-5.
17. Strieter, R.M., S.L. Kunkel, and R.C. Bone, *Role of tumor necrosis factor-alpha in disease states and inflammation*. Crit Care Med, 1993. 21(10 Suppl): p. S447-63.
18. Dembic, Z., *Immune system protects integrity of tissues*. Mol Immunol, 2000. 37(10): p. 563-9.

19. Pinsky, M.R., et al., *Serum cytokine levels in human septic shock. Relation to multiple-system organ failure and mortality.* Chest, 1993. 103(2): p. 565-75.
20. Rietschel, E.T., et al., *Bacterial endotoxin: Chemical constitution, biological recognition, host response, and immunological detoxification.* Curr Top Microbiol Immunol, 1996. 216: p. 39-81.
21. Oberholzer, A., C. Oberholzer, and L.L. Moldawer, *Interleukin-10: A complex role in the pathogenesis of sepsis syndromes and its potential as an anti-inflammatory drug.* Crit Care Med, 2002. 30(1 Supp): p. S58-S63.
22. Kourilsky, P. and P. Truffa-Bachi, *Cytokine fields and the polarization of the immune response.* Trends Immunol, 2001. 22(9): p. 502-9.
23. Kaisho, T. and S. Akira, *Dendritic-cell function in Toll-like receptor- and MyD88-knockout mice.* Trends Immunol, 2001. 22(2): p. 78-83.
24. Lien, E. and R.R. Ingalls, *Toll-like receptors.* Crit Care Med, 2002. 30(1 Supp): p. S1-S11.
25. Ryan, A.J., et al., *Acute heat stress protects rats against endotoxin shock.* J Appl Physiol, 1992. 73(4): p. 1517-22.
26. West, M.A. and W. Heagy, *Endotoxin tolerance: A review.* Crit Care Med, 2002. 30(1 Supp): p. S64-S73.
27. Christians, E.S., L.J. Yan, and I.J. Benjamin, *Heat shock factor 1 and heat shock proteins: Critical partners in protection against acute cell injury.* Crit Care Med, 2002. 30(1 Supp): p. S43-S50.
28. Staudt, L.M., *Gene expression physiology and pathophysiology of the immune system.* Trends Immunol, 2001. 22(1): p. 35-40.

29. Tian, J., et al., *Lipopolysaccharide-activated B cells down-regulate Th1 immunity and prevent autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice.* J Immunol, 2001. 167(2): p. 1081-9.
30. Parekh, V.V., et al., *B cells activated by lipopolysaccharide, but not by anti-Ig and anti-CD40 antibody, induce anergy in CD8+ T cells: role of TGF-beta 1.* J Immunol, 2003. 170(12): p. 5897-911.
31. Chung, T.P., et al., *Functional genomics of critical illness and injury.* Crit Care Med, 2002. 30(1 Supp): p. S51-S57.
32. Sung-Mi, K., Hae-Jin, K., Nakwon, Choe., Ji-Young, K., Kook, H., Seo, S.B. The histone methyltransferase activity of WHISTLE is important for the induction of apoptosis and HDAC1-mediated transcriptional repression. *Experimental cell Research*, 2007; 313: 975-83.
33. Scott, A. M., Saleh, M. The inflammatory caspases: guardians against infections and sepsis. *Nature*, 2007; 14: 23-31.
34. Saquib, A., Lakhani, et al. Caspases 3 and 7: Key mediators of mitochondrial events of apoptosis. *Science*, 2006; 311: 847-51.
35. Kang, S.J., Wang, K., Kuida, K., Yuan, J. Distinct downstream pathways of caspase-11 in regulating apoptosis and cytokine maturation during septic shock response. *Nature*, 2002; 17: 14-21.
36. Hotchkiss, R.S., Nicholson, D.W. Apoptosis and caspases regulate death and inflammation in sepsis. *Nature*, 2006; 6: 813-22.
37. Kerr, J.F.R., Wyllie, A.H. and Currie, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, 1972; 26: 239-57.

38. Otha, K., Yamashita, N. Apoptosis of eosinophils and lymphocytes in allergic inflammation. *J Allergy Clin Immunol.* 1999; 104: 14-21
39. Clarke, P.G. Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms. *Anat Embryol.* 1990; 181: 195-213.
40. Allen, P.D., Bustin, S.A., Macey, M.G., Johnston, D.H., Williams, N.S., Newland, A.C. Programmed cell death (apoptosis) in immunity and haematological neoplasia. *Br J Biomed Sci.* 1993; 50: 135-49.
41. Strange, R., Li, F., Saurer, S., Burkhardt, A., Friis, R.R. Apoptotic cell death and tissue remodeling during mouse mammary gland involution. *Development.* 1992; 115: 49-58.
42. Pritchard, D.M., Watson, A.J.M. Apoptosis and gastrointestinal pharmacology. *Pharmacological Therapeutics*, 1996; 72: 149- 69.
43. Vignola, A.M., Chanez, P., Chiapparra, G., Siena, L., Merendino, A., Reina, C., Gagliardo, R., Profita, M., Bousquet, J., Bonsignore, G. Evaluation of apoptosis of eosinophils, macrophages, and T lymphocytes in mucosal biopsy specimens of patients with asthma and chronic bronchitis. *J Allergy Clin Immunol.* 1999; 103: 563-73.
44. Nadiri, A., Wolinski, M.K., Saleh, M. The inflammatory caspases: key players in the host response to pathogenic invasion and sepsis. *Journal of Immunology.* 2006; 4039-45.
45. Jung, D.Y., Lee, H., Jung, Y. TLR4, but not TLR2, Signals autoregulatory apoptosis of cultured microglia: A critical role of IFN- β as a decision maker. *The journal of Immunology*, 2005: 109-14.
46. Irmeler, M., Thome, M., Hahne, M., Schneider, P., Hofmann, K., Steiner, V., Bodmer, J.L., Mattmann, C. Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature*, 1997; 388: 190-5.

47. Rafaeli, Y., Parijs, L., London, C.A., Tschoop, J., Abbas, A.K. Biochemical mechanisms of IL-2 regulated Fas mediated T cell apoptosis. *Immunity*, 1998; 8: 615-23.
48. Fire, A., XU, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E., Melo, O C.C. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 1998; 391:806-11.
49. Elbashir, S.M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K., Tuschl, T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*. 2001; 411:494-8.
50. Tijsterman, M., Ketting, R.F., Okihara, K.L., Sijen, T., Plasterk, R.H. RNA helicase MUT-14-dependent gene silencing triggered in *C. elegans* by short antisense RNAs. *Science*. 2002; 295(5555):694-7.
51. Fraser, A.G., Kamath, R.S., Zipperlen, P., Martinez-Campos, M., Sohrmann, M., Ahringer, J. Functional genomic analysis of *C. elegans* chromosome I by systematic RNA interference. *Nature*. 2000; 408(6810):325-30.

Apêndice



APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 25.05.06, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº 331/06, intitulado: " Alterações de expressão gênica na tolerância ao LPS. Análise da participação dos linfócitos B na regulação gênica da tolerância" apresentado pelo Departamento de Clínica Médica.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10.10.1996, inciso IX. 2, letra "c")

Pesquisador(a) Responsável: **Prof. Dr. Francisco Garcia Soriano**

Pesquisador (a) Executante: **Edielle de Sant'Anna Melo**

CAPPesq, 25 de Maio de 2006.

PROF. DR. EUCLIDES AYRES DE CASTILHO
Presidente da Comissão de Ética para Análise
de Projetos de Pesquisa