

LUCIANO CÉSAR PONTES DE AZEVEDO

**Efeito inotrópico negativo de exossomos
plaquetários circulantes em pacientes com
choque séptico: um novo mecanismo de
disfunção miocárdica**

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

Área de Concentração: Emergências Clínicas

Orientador: Prof. Dr. Francisco Rafael Martins Laurindo

São Paulo

2004

**“I've studied now Philosophy
And Jurisprudence, Medicine,
And even, alas! Theology
All through and through with ardour keen!
Here now I stand, poor fool, and see
I'm just as wise as formerly.
Am called a Master, even Doctor too,
And now I've nearly ten years through
Pulled my students by their noses to and fro
And up and down, across, about,
And see there's nothing we can know!”**

Fausto, de J.W. Goethe – monólogo inicial.

*Aos meus pais, José Arnaldo e Soledade e
meu irmão Luis Guilherme*

*À trupe, Ana Beatriz, Ana Victoria,
Luiz Arnaldo e Ana Cristina*

AGRADECIMENTOS

A grande vantagem de se realizar a tese de doutorado em vários lugares diferentes é o grande número de amigos que se incorpora ao seu convívio. Assim sendo, gostaria de agradecer a todas as pessoas listadas abaixo e as eventualmente esquecidas, que tanto contribuíram para que esse trabalho fosse realizado.

Ao meu orientador **Prof. Dr. Francisco Laurindo**, exemplo de médico e cientista, pela clareza de idéias, capacidade abstrata e espírito investigativo que tanto me impressionaram desde os primeiros momentos em que iniciei em seu laboratório, em 1998.

A minha amiga **Vera Pontieri**, sem a qual essa tese não poderia ser realizada, pela disposição em colaborar e incentivo nos momentos negativos.

Ao meu amigo **Marcelo Park**, exemplo maior de figura humana, humildade e dedicação aos pacientes, pelas idéias discutidas, colaboração na análise estatística e incontáveis períodos de cobertura na UTI das Emergências Clínicas, enquanto eu tentava concluir esse estudo.

A **Leonora Loppnow**, por ter me ensinado tão bem a realizar os estudos experimentais e, acima de tudo, por ter se tornado uma grande amiga.

Aos **Drs. Marcelo de Almeida Pedro** e **Mariano Janiszewski**, por terem me levado pela primeira vez ao laboratório do InCor e pelas inúmeras discussões e idéias sempre bem elaboradas.

Ao **Prof. Dr. Paulo Tucci**, do Laboratório de Fisiologia Cardiovascular da UNIFESP-EPM, por me receber de forma tão calorosa em seu laboratório e pela indispensável colaboração nos estudos com preparação de músculo papilar, assim como os colegas do laboratório **Ednei, Danilo, Andrei, Dalton, Junior**, pela amizade e gentileza com que sempre me trataram.

Ao acadêmico **Estevão Bassi**, pela realização dos estudos de reatividade vascular.

Ao amigo **Victor Debbas**, pela indispensável ajuda nos estudos de Western blotting.

A **Sra. Laura Brandizzi**, pela disponibilidade na realização dos estudos com derivados do NO.

Ao **Sr. Célio Xavier** e **Sra. Maria Bertolini**, pela realização dos estudos com cromatografia e pela paciência em explicar HPLC “for dummies”.

Aos colegas do Laboratório de Biologia Vascular do InCor **Célio, Estevão, João, Kenya, Laura, Luciana, Marcel, Nelo, Paulo Leite, Veruska, Victor**, pelos cafés, discussões e agradável convivência de todos esses meses no laboratório.

Aos colegas do LIM-51, **Prof. Dr. Augusto Scalabrini, Prof. Dr. Heraldo Souza, Prof. Dr. Francisco Soriano, Carol, Denise, Fátima, Hermes, Márcia, Sueli, Vera** pela simpática acolhida em seu local de trabalho e pelas palavras de incentivo.

Aos colegas, técnicos e funcionários da Divisão de Experimentação do InCor , especialmente **Ricardo, Elenice, Eliete, Nelson, Leonora, Poli, Suely, Rui, Cristiane** pela convivência, cafés e papos sobre os mais variados temas e por estarem sempre disponíveis para ajudar.

Às secretárias da pós-graduação das Emergências Clínicas **Angélica e Rose**, pelos muitos galhos quebrados e por sofrerem tanto quanto nós com os prazos da pós-graduação.

A todos os colegas da Disciplina de Emergências Clínicas e especialmente **Alexandre, André Amaral, André Hovnanian, Daniel, Danilo, Fábio, José Paulo, Leonardo, Luiz Monteiro, Marcelo, Reis, Sylas, Vladimir** pelo incentivo e por literalmente terem dado o “sangue” para que eu pudesse concluir esta tese.

Aos **Pacientes da UTI** da Disciplina de Emergências Clínicas, por insistirem em permanecer vivos, mesmo quando as condições são tão adversas.

ÍNDICE

Lista de Abreviações	03
Resumo	06
Summary	08
1. INTRODUÇÃO	10
1.1. Disfunção miocárdica da sepse: mecanismos e produção de estresse oxidativo.....	10
1.2. Endocitose celular e seus mecanismos.....	20
1.3. Distribuição de moléculas na membrana dos exossomos, sua biogênese e secreção.....	25
1.4. Composição molecular dos exossomos.....	28
1.5. Células produtoras e funções dos exossomos.....	31
1.6. Exossomos derivados de plaquetas.....	39
2. HIPÓTESE	42
3. OBJETIVOS	43
4. CASUÍSTICA E MÉTODOS	44
4.1. Reagentes.....	44
4.2. Casuística.....	45
4.3. Isolamento de exossomos.....	46
4.4. Caracterização dos exossomos.....	47
4.4.1. Microscopia eletrônica.....	47
4.4.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS e Western blotting.....	48
4.4.3. Cromatografia líquida de alta performance (HPLC).....	50
4.4.4. Quantificação de óxidos de nitrogênio em amostras de exossomos.....	51
4.5. Avaliação da disfunção cardiovascular induzida por exossomos.....	52
4.5.1. Infusão de exossomos em coração isolado de coelho.....	52
4.5.2. Experimentos com inibidores.....	53
4.5.3. Infusão de exossomos após exposição prévia a LPS.....	54
4.5.4. Preparação de músculo papilar isolado de rato.....	55
4.5.5. Avaliação da reatividade vascular em vasos isolados.....	57

4.5.6. Quantificação de óxidos de nitrogênio em tecido miocárdico de preparações de coração isolado.....	58
4.6. Análise estatística.....	59
5. RESULTADOS.....	60
5.1. Dados demográficos e características dos pacientes.....	60
5.2. Caracterização dos exossomos.....	62
5.2.1. Quantificação de proteínas.....	62
5.2.2. Microscopia eletrônica.....	62
5.2.3. SDS-PAGE e Western blotting de exossomos de pacientes sépticos.....	64
5.2.4. Cromatografia líquida de alta performance (HPLC).....	67
5.2.5. Quantificação de óxidos de nitrogênio nos exossomos.....	69
5.3. Avaliação da disfunção cardiovascular induzida pelos exossomos.....	69
5.3.1. Efeito dos exossomos sobre corações isolados de coelho.....	69
5.3.2. Efeito dos exossomos em animais endotoxêmicos.....	74
5.3.3. Efeito dos inibidores sobre a disfunção induzida por exossomos.....	77
5.3.4. Efeito dos exossomos sobre músculos papilares isolados de rato.....	80
5.3.5. Efeito dos exossomos sobre a reatividade vascular.....	83
5.3.6. Quantificação de óxidos de nitrogênio em tecido miocárdico.....	86
6. DISCUSSÃO.....	88
6.1. Caracterização dos exossomos oriundos de pacientes sépticos.....	88
6.2. Disfunção cardiovascular induzida pelos exossomos.....	92
6.3. Limitações do estudo.....	97
7. CONCLUSÕES.....	99
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	100
Anexos – Artigos publicados durante o doutorado.....	120

LISTA DE ABREVIÇÕES

APC - células apresentadoras de antígenos
CD63, CD9, CD81 e CD82 - tetraspaninas
DC – células dendríticas
DM – diabetes mellitus
DPI - difenilenoiodônio
DPOC – doença pulmonar obstrutiva crônica
DTNB - ácido 5,5´ ditio-bis (2-nitrobenzóico)
EDTA - ácido etilenodiaminotetraacético
EE - endossomos precoces
EPM - erro padrão da média
EROs - espécies reativas de oxigênio
FDC - células dendríticas foliculares
gp91^{phox} – subunidade do citocromo b558 da NAD(P)H oxidase
GSH - glutationa reduzida
GSSG - glutationa oxidada
HAS – hipertensão arterial sistêmica
H₂O₂ – peróxido de hidrogênio
HPLC - cromatografia líquida de alta performance
Hrs - proteína de ligação ao fosfatidil-inositol-3-fosfato
HSP – “heat-shock proteins”
ICAM1 - moléculas de adesão intercelular – 1
ICC – insuficiência cardíaca congestiva
li - cadeia Invariante
IL-1 β – interleucina -1 beta
IL-10 – interleucina -10
IL-6 – interleucina - 6
KI - iodeto de potássio
LAMP - glicoproteínas integrais da membrana lisossomal

LBPA - ácido lisobifosfatídico

LE - endossomos tardios

$L_{máx}$ - comprimento diastólico associado com tensão isométrica máxima

LNMMMA - N^G-Monometil-L-arginina

LPS - lipopolissacáride

MHCII - complexo de histocompatibilidade maior classe II

MIIC - compartimentos ricos em MHC classe II

MPR – receptores manose-6 fosfato

MVB - corpos multivesiculares

NAC - N-acetil-cisteína

NADPH - nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

NO - óxido nítrico

NOS - sintases de óxido nítrico

NSF - fator sensível a N-etilmaleimida

PAGE – eletroforese em gel de poliacrilamida

PDI – dissulfeto isomerase protéica

PIP3 -fosfatidil-inositol-3-fosfato

PMSF - fenilmetilsulfonilfluoreto

$p22^{phox}$ – subunidade do citocromo b558 da NAD(P)H oxidase

Rab - proteínas de atividade GTP-ase associadas a membranas

RE - retículo endoplasmático

SDS – dodecil sulfato de sódio

SIRS - síndrome resposta inflamatória sistêmica

SNARES - receptores de proteínas de adesão solúveis

SOD – superóxido dismutase

TBS – tampão tris salina

TBS-T – tampão TBS com Tween

TCR - receptor de células T

TD - tensão desenvolvida

TGF β - fator de crescimento transformador β

TNF- α - fator de necrose tumoral- α

TPT – tempo para atingir tensão pico

TR - tensão de repouso

TR50 - tempo para a tensão desenvolvida decrescer 50% de seu valor máximo

TRAP - peptídeo ativador do receptor de trombina

Tris – tris-hidroximetil-aminometano

UTI - unidade de terapia intensiva

VCAM-1 - molécula de adesão a células vasculares 1

VE - ventrículo esquerdo

VnCl₄ - cloreto de vanádio

VPS27 - proteína de distribuição vacuolar 27

(-)dp/dt – derivada temporal negativa da pressão ventricular

(+)dp/dt - derivada temporal positiva da pressão ventricular

(-)dT/dt - derivada temporal negativa da tensão desenvolvida

(+)dT/dt - derivada temporal positiva da tensão desenvolvida

Resumo

A disfunção miocárdica é uma ocorrência comum em pacientes com choque séptico. Contudo, os mecanismos relacionados a esse fenômeno estão pouco esclarecidos. Um estudo prévio de nosso laboratório demonstrou no plasma de pacientes com choque séptico a presença de exossomos, que são partículas produzidas no sistema endocítico-lisossomal de diversas linhagens celulares. Estes exossomos são derivados de plaquetas e tem capacidade de produzir superóxido, bem como de induzir apoptose em células vasculares em cultura por mecanismos redox. Nossa hipótese é que a presença de exossomos circulantes em pacientes sépticos poderia contribuir para a disfunção contrátil observada nessa população. Foi colhido sangue de 55 pacientes com choque séptico e 12 indivíduos saudáveis para separação de exossomos. A caracterização dos exossomos derivados de plaquetas demonstrou que são partículas sem estrutura vesicular, em torno de 80 a 110 nm de diâmetro, apresentam distribuição protéica entre 20 e 220 KDa, expressam a enzima dissulfeto isomerase protéica (PDI) e não expressam sintases de óxido nítrico (NOS) nem superóxido-dismutases extracelular e Cobre-Zinco. Não foi constatada presença de glutathione nos exossomos por cromatografia líquida de alta performance (HPLC), contudo a mesma metodologia demonstrou que essas partículas são ricas em urato. A incubação de corações isolados com exossomos de pacientes sépticos em concentração igual à metade da concentração plasmática reduziu em 17% e 30% as derivadas temporais positiva e negativa da pressão ventricular [(+)dp/dt e (-) dp/dt] (n=9, p<0,05). Exossomos de controles saudáveis diminuíram em 9% e 19% a (+)dp/dt e (-)dp/dt (n=5, p=NS). A exposição de músculos papilares a exossomos de pacientes sépticos induziu uma diminuição na tensão desenvolvida (TD) (5,3±0,4 g pré vs 4,7±0,5 g pós, p=0,009, n=8) e em sua derivada temporal positiva (+dT/dt) (52,6±5,5 g/s pré vs 46,6±5,8 g/s pós, p=0,01, n=8), ao passo que a incubação com exossomos de controles não gerou diminuição estatisticamente

significante nessas variáveis. Em corações de coelhos previamente expostos a lipopolissacarídeo (LPS) (1 mg/kg EV), a incubação com exossomos de pacientes sépticos reduziu em 38% a (+)dp/dt ($p=0,011$, $n=4$) e em 40% a (-)dp/dt ($p=0,012$, $n=4$). Inibidores da NAD(P)H oxidase, PDI, ciclooxigenase ou um doador de tióis (N-acetil-cisteína) pouco alteraram o efeito contrátil negativo induzido pelos exossomos. A incubação com exossomos de pacientes sépticos gerou um aumento significativo nas concentrações de nitrato (310 ± 31 vs 130 ± 30 $\mu\text{M}/\text{mg}$, $p=0,019$, $n=4$) no tecido miocárdico quando comparado com controles saudáveis. Assim, concluímos que exossomos provenientes de plaquetas de pacientes sépticos são capazes de induzir disfunção miocárdica em preparações de coração isolado e em músculos papilares, disfunção esta exacerbada pela administração prévia de LPS. O aumento das concentrações dos metabólitos de NO no miocárdio identifica uma possível ativação da NOS como mediadora da disfunção. A presença de exossomos circulantes em pacientes sépticos poderia contribuir para o fenômeno de disfunção miocárdica freqüentemente identificado nesta condição.

Summary

Myocardial dysfunction is a common feature of septic shock. However, the mechanisms underlying inotropic failure are incompletely understood. A previous report from our laboratory identified in plasma of septic shock patients the presence of exosomes. Exosomes are small particles produced in the endocytic-lysosomal system of several cell lines. Exosomes from septic shock patients are released mainly by platelets, produce superoxide and are able to induce apoptosis in vascular cells by a redox-dependent pathway. We hypothesized that circulating exosomes in plasma of septic patients could contribute to inotropic dysfunction in this population. We collected blood samples from 55 patients with septic shock and 12 healthy volunteers for exosome separation. Exosomes were characterized as particles without vesicular structure, with diameters ranging from 80 to 110 nm and protein distribution between 20 and 220 KDa. Exosomes express the enzyme protein disulfide isomerase, although they do not express nitric oxide synthases or superoxide-dismutases (extracellular or Copper/Zinc). High performance liquid chromatography showed absence of glutathione in exosomes, although these particles are enriched in urate. Incubation of isolated heart preparations with exosomes from septic patients at half of plasmatic concentration induced a decrease of 17% and 30% in positive and negative derivatives of ventricular pressure, respectively [(+)dp/dt e (-) dp/dt] (n=9, p<0.05). Exosomes from healthy individuals reduced (+)dp/dt by 9% and (-)dp/dt by 19% (n=5, p=NS). Exposure of isolated rat papillary muscles to exosomes from septic patients reduced developed tension (5.3 ± 0.4 g pre vs 4.7 ± 0.5 g post, p=0.009, n=8) and its first positive derivative (+dT/dt) (52.6 ± 5.5 g/s pre vs 46.6 ± 5.8 g/s post, p=0.01, n=8). Incubation with exosomes from healthy volunteers induced no significant reduction in these variables. In hearts from rabbits previously exposed to lipopolisaccharide (LPS) (1 mg/kg IV), incubation with exosomes from septic patients decreased (+)dp/dt in 38% (p=0.011, n=4) and (-)dp/dt in 40% (p=0.012, n=4). Inhibitors of NAD(P)H oxidase, PDI and ciclooxigenase or a thiol donor (N-acetyl-cystein) did not block

the negative inotropic effect of exosomes. However, incubation of isolated hearts with exosomes from septic patients induced a significant increase in myocardial nitrate content (310 ± 31 vs 130 ± 30 $\mu\text{M}/\text{mg}$, $p=0.019$, $n=4$). We conclude that exosomes derived from platelets of septic patients induce myocardial dysfunction in isolated heart and papillary muscle preparations. This phenomenon is enhanced by previous exposure of the rabbits to LPS. The increase in NO metabolites after incubation with exosomes from septic shock patients may indicate a possible NOS activation as a mediator of the dysfunction. Circulating exosomes in septic shock patients may contribute to the myocardial dysfunction of sepsis.

1. Introdução

Sepse é a síndrome clínica que resulta da resposta do hospedeiro a um determinado estímulo infeccioso e que se caracteriza pela produção de diversas moléculas pró e anti-inflamatórias. Após um contato inicial com o estímulo infeccioso (como a endotoxina de bactérias gram-negativas ou exotoxinas de *S. aureus*), a cascata inflamatória é iniciada. A amplificação da resposta do organismo se dá pela estimulação de leucócitos, monócitos/macrófagos e células endoteliais, com liberação de inúmeros mediadores responsáveis pela deflagração e potencialização do processo. Entre as principais moléculas envolvidas na regulação deste fenômeno encontram-se o fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) e a interleucina-1 beta (IL-1 β), os quais atuam como moléculas pró-inflamatórias e o fator de crescimento transformador β (TGF β) e o antagonista do receptor de IL-1 β , que têm atuação anti-inflamatória. Do balanço entre essas moléculas origina-se a resposta que pode culminar com toda a evolução da sepse, inclusive com síndrome de disfunção de múltiplos órgãos (KUMAR et al, 2001)

1.1 Disfunção miocárdica da sepse: mecanismos e produção de estresse oxidativo

Uma das mais importantes manifestações clínicas da sepse é a disfunção miocárdica. Contudo, quando se observa o perfil hemodinâmico de pacientes sépticos, à primeira vista o débito cardíaco pode estar dentro dos limites da

normalidade, porém às custas de aumento da frequência cardíaca e/ou redução da resistência vascular periférica. Desta forma, a capacidade inotrópica do miocárdio pode estar reduzida, mesmo na vigência de débito cardíaco elevado (VINCENT, 1998). De fato, um percentual variável de pacientes com sepse grave e choque séptico desenvolve um desarranjo intrínseco da contratilidade cardíaca que foi denominado de disfunção miocárdica da sepse.

Um dos estudos iniciais mais importantes que detectou a presença de disfunção cardíaca em pacientes sépticos foi o realizado por PARKER et al (1984). Os autores identificaram, por angiografia nuclear e medida de débito cardíaco por termodiluição, uma diminuição da fração de ejeção de ventrículo esquerdo (VE) em 75% de sua casuística. A realização dos métodos citados acima e a tentativa de correlação dos achados com a sobrevida permitiram ainda a divisão desses pacientes sépticos em dois grupos. O grupo dos sobreviventes compunha-se basicamente de indivíduos que apresentavam dilatação do VE associada a valores mais baixos de frações de ejeção, por mecanismos não conhecidos. Tipicamente, nesse grupo, a dilatação do VE era reversível, tendendo o miocárdio a voltar ao seu tamanho e fração de ejeção normais após 7 a 10 dias de evolução. Os não-sobreviventes, por seu turno, não apresentavam dilatação ventricular e tinham fração de ejeção normal, sugerindo que a dilatação ventricular poderia ser um mecanismo adaptativo ao estado hipermetabólico da sepse (KUMAR et al, 2001). Em outro estudo, a resposta à reposição volêmica de pacientes com choque séptico usando cateter de artéria pulmonar estava tipicamente diminuída, com baixa melhora contrátil após desafio volêmico, indicando assim reduzida capacidade inotrópica (WEISEL et al, 1977).

Além de anormalidades sistólicas, a disfunção diastólica também pode estar presente na sepse. A realização de ecocardiograma transesofágico em pacientes com choque séptico em uso de vasopressor demonstrou uma seqüência de anormalidades, que incluíam desde disfunção diastólica isolada até combinações variáveis de disfunção sistólica e diastólica (POELAERT et al, 1997). Em outro estudo, a realização de ecocardiograma transtorácico em pacientes com sepse grave permitiu identificar, nos não-sobreviventes, um padrão de pior relaxamento ventricular esquerdo do que os indivíduos sobreviventes (MUNT et al, 1998). Esses dados também foram referendados por resultados obtidos em cães que demonstraram redução da fração de ejeção e complacência ventricular reduzida em modelos de sepse por peritonite (STAHL et al, 1990, NATANSON et al, 1986).

Embora o fenômeno de depressão miocárdica da sepse já seja reconhecido há cerca de 25 anos, considerável debate persiste sobre seus mecanismos causadores. Um das hipóteses aventadas diz respeito a uma hipoperfusão cardíaca global resultando em lesão isquêmica do miocárdio. Esses resultados foram obtidos basicamente a partir de modelos de endotoxemia em cães, nos quais se detectou hipoperfusão miocárdica global por hipofluxo coronariano (ELKINS et al, 1973, PEYTON et al, 1976). Contudo, dois estudos em humanos contribuíram para desacreditar essa hipótese. CUNNION et al (1986), utilizando cateter de termodiluição no seio coronário, demonstraram fluxo sanguíneo coronário normal ou mesmo aumentado na vigência de sepse e sem correlação do fluxo com depressão miocárdica ou produção aumentada de lactato pelo coração. DHAINAUT et al (1987), por sua vez, em estudo com maior casuística, corroboraram os dados anteriores e identificaram ausência de produção de lactato

em quantidades elevadas pelo miocárdio deprimido. Contudo, nenhum destes estudos enfocou a microcirculação, de tal modo que poderiam existir áreas isquêmicas por déficit circulatório entremeadas com áreas normais, gerando então produção de lactato dentro de limites aceitáveis. De fato, um estudo com sepse em porcos demonstrou retenção de leucócitos na microcirculação, o que poderia contribuir para a redução da contratilidade (GRANTON et al, 1997). Apesar destes resultados, dados em modelos animais demonstraram ausência de comprometimento energético grave do miocárdio, o que seria de se esperar em casos de isquemia miocárdica por hipofluxo em microcirculação (HOTCHKISS & KARL, 1992). Desta forma, a teoria da hipoperfusão coronariana como causadora do déficit inotrópico foi praticamente deixada de lado e os estudos foram centralizados na busca do fator depressor miocárdico da sepse.

As origens da teoria de depressão miocárdica em estados de choque remontam ao estudo realizado por WIGGERS em 1947, no qual há a descrição de um fator depressor do miocárdio em um modelo de choque hemorrágico experimental. A seguir, na década de 60, dados obtidos em modelos animais e estudos de sepse em humanos ajudaram a solidificar o conceito, embora estivessem baseados em premissas hemodinâmicas que depois se mostraram equivocadas à luz dos conhecimentos atuais (KRISHNAGOPALAN et al, 2002).

De fato, o primeiro estudo que demonstrou de forma inequívoca a presença de uma disfunção contrátil em pacientes sépticos e sua ligação com um efeito depressor miocárdico de seu soro foi realizado por PARRILLO et al (1985). A exposição de cardiomiócitos isolados a soro de pacientes sépticos com disfunção miocárdica induziu importante alteração contrátil, com redução desse efeito à

medida que os indivíduos iniciavam o período de convalescença. Foi documentada ainda uma correlação significativa entre o grau de redução da fração de ejeção do VE *in vivo* com o efeito depressor miocárdico demonstrado *in vitro* com o soro dos mesmos pacientes.

A partir de então, diversos mediadores foram identificados como indutores de disfunção inotrópica em modelos de avaliação de função contrátil cardíaca, com os estudos demonstrando efeitos isolados ou em sinergia dessas substâncias.

Um dos primeiros mediadores avaliados em termos de possível efeito cardíaco na sepse foi a própria endotoxina, ou LPS. Demonstrou-se que, embora a endotoxina infundida isoladamente não seja capaz de induzir depressão da contratilidade, sua administração a diversas espécies causa choque séptico com depressão miocárdica associada (PARKER et al, 1979, PARKER et al, 1981, HUNG et al, 1993). Da mesma forma, o LPS só é capaz de reduzir a contratilidade de miócitos *in vitro* quando associado a macrófagos ativados (MCKENNA et al, 1988). Em conjunto, esses dados indicam que os efeitos inotrópicos do LPS *in vivo* parecem ser indiretos e mediados provavelmente por substâncias endógenas liberadas por leucócitos em resposta ao estímulo.

A Interleucina-1 β (IL-1 β) tem sido estudada como implicada na depressão miocárdica da sepse. Estudos animais demonstraram que a administração de IL-1 β em modelos animais mimetiza muitas das características hemodinâmicas da sepse, principalmente redução da fração de ejeção (COURT et al, 2002). Em modelos *in vitro* e *ex vivo*, a exposição de tecido miocárdico a IL-1 β diminui a

contratilidade cardíaca (EVANS et al, 1993) e a sua imunoadsorção neutraliza parcialmente a atividade depressora miocárdica de soro de pacientes sépticos (KUMAR et al, 1996). Estudos demonstraram ainda que a ação sinérgica da IL-1 β com o TNF- α é capaz de potencializar a depressão miocárdica, uma vez que a concentração necessária dessas citocinas para induzir disfunção quando associadas é muito menor do que a quantidade necessária quando as mesmas são administradas isoladamente (KUMAR et al, 1996).

O fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) é uma das citocinas mais bem estudadas na avaliação da disfunção inotrópica da sepse. Dados humanos e animais, em estudos *in vivo* e *ex vivo* demonstraram que, quando TNF- α é administrado, o resultado é uma depressão da contratilidade dependente da concentração (FINKEL et al, 1992, KUMAR et al, 1996, GU et al, 1998). A remoção de TNF- α do soro de pacientes sépticos também é capaz de atenuar a disfunção miocárdica (KUMAR et al, 1996).

Aparentemente, o efeito inotrópico negativo mediado por TNF- α tem um curso temporal bifásico. Um efeito inicial, que ocorre minutos após a exposição de tecido miocárdico à citocina, parece depender de alterações agudas nas concentrações intracelulares de cálcio, notadamente por inibição da liberação de cálcio pelo retículo sarcoplasmático (MELDRUM, 1998). Essa inibição pode ser mediada por metabólitos esfingolipídicos como a esfingosina, os quais são segundos mensageiros intracelulares que participam na transdução de sinal após ligação do TNF- α ao seu receptor tipo 1. A administração de anticorpos anti-esfingosina bloqueia os efeitos miocárdicos negativos e a administração da própria

esfingosina mimetiza os efeitos depressores do TNF- α , demonstrando assim o papel desse metabólito lipídico na alteração inotrópica induzida por TNF- α (ORAL et al, 1997).

Por outro lado, o efeito tardio mediado por TNF- α , que se dá horas após a administração, não parece ser mediado por esfingosina e sim por espécies reativas de oxigênio/nitrogênio, mais precisamente o óxido nítrico (NO). Aparentemente, o NO é responsável por alterações no influxo celular de cálcio, mais precisamente por dessensibilização dos miofilamentos ao cálcio intracelular (MELDRUM, 1998). Contudo, outros estudos implicaram o NO também na indução de disfunção miocárdica precoce em modelos animais de sepse (COURT et al, 2002). De todo modo, dados que demonstraram a participação do NO no mecanismo de disfunção miocárdica induzida por TNF- α , bem como indicações de sua importância na regulação do fluxo sanguíneo tissular e na função cardiovascular levaram à investigação com maior profundidade do possível papel do NO na disfunção miocárdica da sepse.

No organismo, o NO é produzido enzimaticamente a partir do grupo guanidina-terminal do precursor L-arginina pela atuação de três NO sintases (NOS): a NOS endotelial ou NOS-III existe constitutivamente em células endoteliais e é responsável pela produção basal e fisiológica de NO, por um mecanismo dependente de cálcio-calmodulina. A NOS-I ou NOS neuronal existe também de forma constitutiva em neurônios e é responsável pela produção basal de NO cerebral que participa de processos de sinalização celular neste local. Por outro lado, o estímulo mediado por citocinas como TNF- α , IL-1, IL-6 é capaz de

deflagrar a atividade da NOS-II, ou NOS induzível, enzima responsável pela produção de grandes quantidades de NO após estímulo inflamatório, o qual é, em última análise, o mecanismo responsável pela vasoplegia que acomete os pacientes com sepse (PARRATT, 1998, KOJDA & KOTTENBERG, 1999).

Em condições basais, a produção vascular de NO mediada pela NOS-III mantém o tônus vascular e possivelmente o estado inotrópico do miocárdio (KRISHNAGOPALAN et al, 2002). Contudo, embora o efeito do NO na regulação da vasculatura tenha sido bem estudado e seja relativamente conhecido, sua importância na regulação da contratilidade cardíaca possui ainda muitos pontos a serem esclarecidos. Os primeiros estudos que avaliaram esse fenômeno foram realizados com doadores de NO (nitroprussiato de sódio, por exemplo), os quais induziram redução da contratilidade quando em contato com miócitos (BRADY et al, 1993), demonstrando assim que o NO está envolvido na indução da disfunção contrátil.

Os dados atuais da literatura permitem implicar o NO como mediador tanto da disfunção miocárdica precoce quanto da tardia na sepse. Um estudo utilizando um modelo de cardiomiócitos de ave demonstrou que, após estímulo com IL-6, ocorre uma redução da contratilidade celular que pode ser bloqueada por inibidores da NOS e por quelantes de cálcio, indicando assim um mecanismo mediado por NO e dependente de Ca-Calmodulina (provavelmente NOS-III) (KINUGAWA et al, 1994).

Em relação à disfunção tardia, a participação do NO como mecanismo efetor tem sido mais estudada. Em ratos endotoxêmicos, 6 horas após a administração de LPS, ocorre uma redução da contratilidade miocárdica associada

a aumento nos níveis plasmáticos de nitrito/nitrato e da produção de NO pelo miocárdio, bem como expressão aumentada de NOS induzível (KHADOUR et al, 2002). Do mesmo modo, a administração de um bloqueador específico para NOS-II restaura a contratilidade miocárdica em um modelo de músculo papilar de ratos submetidos a desafio com LPS (AFULUKWE et al, 2000). Em resumo, o NO é um dos possíveis mecanismos de disfunção miocárdica precoce e tardia na sepse, sendo a disfunção precoce mediada por um mecanismo dependente de cálcio (NOS-III) e a disfunção tardia mediada por um efeito independente de cálcio (NOS-II).

Os estudos com NO na disfunção cardiovascular da sepse influenciaram o surgimento de outros estudos que avaliaram a presença de espécies reativas de oxigênio (EROs) relacionadas ao metabolismo do NO no contexto inflamatório-infeccioso. Desta forma, identificou-se um aumento nas EROs durante a endotoxemia, notadamente no que diz respeito ao superóxido e ao peroxinitrito (BRANDES et al, 1999, FERDINANDY et al, 2000, KHADOUR et al, 2002).

O ânion radical superóxido pode ser produzido por diversas fontes no organismo. Em células vasculares e no miocárdio, uma das principais enzimas produtoras é a NAD(P)H oxidase, enzima que se assemelha à sua homóloga responsável pela geração de superóxido no neutrófilo. Na endotoxemia, existe uma produção aumentada de superóxido na parede vascular mediada por NAD(P)H oxidase vascular e xantina-oxidase (BRANDES et al, 1999, JAVESGHANI et al, 2003). Este aumento da produção pode ter como efeito bloquear o aumento do NO produzido pela NOS-II. Da mesma forma, no miocárdio submetido a tratamento com endotoxina, ocorre um aumento da atividade xantina-

oxidase, com conseqüente geração de radical superóxido (FERDINANDY et al, 2000, KHADOUR et al, 2002). Contudo, o efeito dessa geração aumentada de superóxido permanece incerto.

Uma conseqüência do aumento da produção de superóxido é a formação de peroxinitrito, por uma rápida e favorável reação entre NO e superóxido. O peroxinitrito tem efeito oxidante potente para várias biomoléculas. Dados da literatura demonstraram aumento da produção de peroxinitrito em tecido miocárdico submetido a endotoxemia (KHADOUR et al, 2002) ou a estímulo com citocinas (FERDINANDY et al, 2000). Assim, uma das hipóteses levantadas é que o aumento da geração de NO pode ter seu efeito deletério na contratilidade cardíaca não apenas de forma direta, como também através da formação aumentada de peroxinitrito.

Um estudo recentemente realizado em nosso laboratório demonstrou a presença de micropartículas no plasma de pacientes com choque séptico internados em UTI (JANISZEWSKI et al, 2004). Tais partículas apresentam atividade NAD(P)H oxidase intrínseca e induzem produção de superóxido e apoptose em células musculares lisas e endoteliais em cultura, através de um mecanismo redox. Sua caracterização demonstrou que são predominantemente exossomos, os quais são partículas com diâmetro em torno de 100 nm produzidos pelo sistema endocítico-lisossomal de diversos tipos celulares. Desta forma, uma correlação entre a produção de EROs na sepse, apoptose de células vasculares e a presença de exossomos circulantes no plasma de indivíduos sépticos foi estabelecida. O mecanismo de formação dos exossomos, sua composição,

funções conhecidas e a caracterização mais detalhada dos exossomos de pacientes sépticos serão descritos em detalhes a seguir.

1.2. Endocitose celular e seus mecanismos

As células eucarióticas secretam proteínas produzidas constitutivamente a partir de exocitose de partículas secretórias ou por liberação regulada de grânulos secretórios ou de armazenamento após estimulação adequada (DENZER et al, 2000 a). Todavia, nos últimos anos, diversos estudos têm demonstrado que a via da endocitose pode constituir-se numa via alternativa de secreção celular (PAN & JOHNSTONE, 1983). A endocitose é um conjunto de processos realizados pela célula com o objetivo de internalizar regiões específicas da membrana plasmática bem como pequenas quantidades de fluido extracelular (APODACA, 2001). Por esse mecanismo secretório da endocitose, compartimentos intracelulares participantes da via endocítica denominados corpos multivesiculares (MVB) que se compõem de numerosas vesículas são capazes de se fundir com a membrana plasmática, liberando essas vesículas no exterior. Este processo foi primeiramente descrito por PAN & JOHNSTONE (1983), através da caracterização da liberação extracelular do receptor protéico de transferrina por partículas oriundas de reticulócitos. Recentemente, esse sistema foi caracterizado em diversos outros grupos celulares e as partículas liberadas do lúmen dos MVB pela fusão dos mesmos com a membrana plasmática denominadas de exossomos (DENZER et al, 2000 a, THERY et al, 2002 b).

O mecanismo mais conhecido pelo qual ocorre a endocitose é dependente de depressões revestidas por clatrina, que são domínios de membrana especializados no carregamento de moléculas que devem ser internalizadas pela célula (JOHANNES & LAMAZE, 2002). Nos últimos anos, outros mecanismos de endocitose independentes de clatrina têm sido descritos em células eucarióticas (HEIJNEN et al, 1998).

O sistema endocítico se compõe das etapas de partículas de endocitose, endossomos precoces (EE), endossomos tardios (LE) e lisossomos. Após a incorporação à célula, o material absorvido é acumulado em endossomos precoces, os quais são os maiores sítios de entrada para as moléculas capturadas. Endossomos são organelas de classificação celular ativa que distribuem seus constituintes coletados em direções distintas, tais como o Complexo de Golgi e as membranas plasmáticas apicais e basolaterais (STOORVOGEL et al, 2002). Esses processos de distribuição têm participação ativa do citoesqueleto celular, notadamente dos microtúbulos e da actina e são mediados por partículas de transporte que se destacam dos endossomos (APODACA, 2001). É nos EE que ocorre a separação entre muitos ligantes-receptores, através do pH ácido do seu lumen e a partir dos quais muitos receptores se reciclam para a superfície celular (LUZIO et al, 2000). A partir dos EE ocorre a formação dos LE, que se caracterizam por serem mais esféricos, terem menor pH intra-luminal e uma distribuição protéica diferente, notadamente com a presença de GTPases da família rab e dois receptores manose-6 fosfato (MPR) (PIPER & LUZIO, 2001). Não está claro o mecanismo pelo qual os EE passam a LE. Sabe-se que os LE recebem partículas de transporte de diversos

compartimentos celulares, notadamente o Complexo de Golgi. Todavia, se ocorre apenas maturação do EE em LE ou se a incorporação dessas vesículas de transporte ocasiona o surgimento do LE ainda não é conhecido (PIPER & LUZIO, 2001).

Embora o EE também possa apresentar partículas internas, é no LE que a presença de corpos vesiculares no seu interior é mais bem caracterizada. Dependendo do tipo celular onde estão caracterizados, os LE também podem denominar-se MVB. Uma vez formados, os MVB têm como destino os seguintes processos: Servirem como sítios de armazenamento (como por exemplo, para antígenos do Complexo de Histocompatibilidade Maior Classe II – MHCII) (STOORVOGEL et al, 2002); Dirigirem proteínas para serem degradadas através de sua fusão com lisossomos (tais como o receptor para fator de crescimento epitelial) (FELDER et al, 1990); Fundirem-se com a membrana plasmática, liberando assim suas vesículas (exossomos) no meio extracelular.

O mecanismo de formação e secreção do MHC II por células apresentadoras de antígenos (APC) como macrófagos, linfócitos-B e células dendríticas ilustra de forma bastante adequada as vias endocíticas celulares (Fig. 1). O MHCII é responsável pela apresentação de peptídeos antigênicos exógenos às células T. Por esse mecanismo, os antígenos são englobados pela célula por endocitose, acumulados nos EE e gradualmente degradados em peptídeos antigênicos. Durante o processo, os endossomos recebem do complexo de Golgi os complexos MHCII associados à Ii (Cadeia Invariante - molécula que se liga aos MHC II recém-produzidos, impede sua ligação prematura no retículo endoplasmático e os transporta para os endossomos) (GEUZE, 1998). Após a

chegada aos endossomos, ocorre proteólise da Ii, com liberação do domínio de ligação dos MHCII para associação dos mesmos com os peptídeos antigênicos exógenos (MURK et al, 2002). Nesse ínterim, está ocorrendo maturação de EE para LE, com formação de partículas em seu interior que darão origem aos exossomos. Uma vez formadas as partículas, os LE passarão a ser denominados corpos multivesiculares (MVB) ou, se o processo ocorrer em células apresentadoras de antígenos, compartimentos ricos em MHC classe II (MIIC) (DENZER et al, 2000 a).

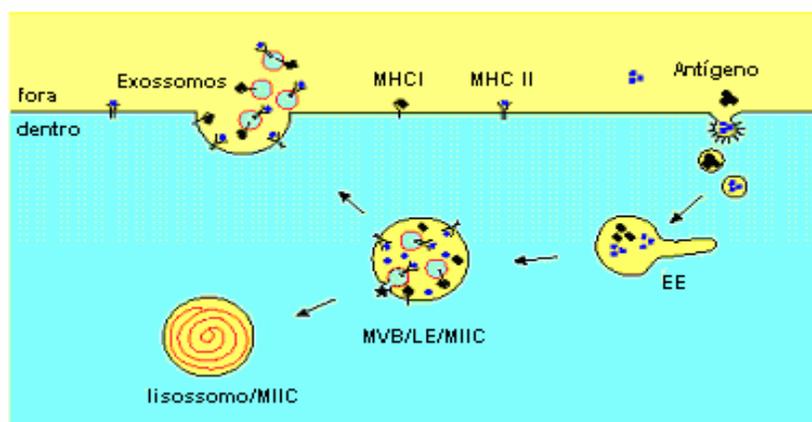


Fig. 1. Mecanismo de formação de MHCII e produção de exossomos em APC. Adaptado de DENZER et al, 2000 (a).

Como já descrito, os MVB podem servir como depósitos de armazenamento de MHCII (KLEIJMEER et al, 2001). Células dendríticas (DC) imaturas localizadas em tecidos periféricos como a pele, após estímulo por sinais inflamatórios associados aos antígenos, migram para os linfonodos onde vão realizar a apresentação de antígenos para as células T. Nesse local, enquanto não ocorrer

estímulo, as DC estarão mantidas em estado imaturo, com seus MVB servindo como organelas de armazenamento. Após um estímulo de maturação, ocorre redistribuição do pool de MHCII da APC em direção à superfície e sua transferência para a membrana celular, em um mecanismo mediado pelos MVB (KOBAYASHI et al, 2000). Não se sabe se MVB em outros tipos celulares que não células dendríticas são capazes de manter esta função de armazenamento.

Outro dos destinos compartilhados pelos MVB é a fusão com lisossomos para degradação de seu conteúdo (GRUENBERG et al, 1989). Lisossomos são organelas que constituem, junto com os LE, o maior sítio de degradação protéica e lipídica da célula. A fusão dos MVB ou LE com os lisossomos poderia representar o surgimento de uma organela híbrida, capaz de realizar a degradação protéica celular. Experimentos realizados demonstraram que estão presentes nas células compartimentos com características híbridas. Alguns expressam proteínas de endossomos (como MPR), enquanto outros evidenciam proteínas características de lisossomos (PIPER & LUZIO, 2001), como as glicoproteínas integrais da membrana lisossomal (LAMP), tetraspaninas (CD63) e β -hexosaminidase (SKOKOS et al, 2001 a). O mecanismo pelo qual ocorre a fusão entre LE e lisossomos ainda não foi completamente esclarecido, mas parece depender de receptores de proteínas de adesão solúveis (SNARES), que são proteínas de membrana que regulam fusão entre organelas e especificidade de alvos no sistema vacuolar (LUZIO et al, 2000).

Por fim, um dos outros possíveis destinos dos LE/MVB é a fusão de suas membranas limitantes com a membrana plasmática, com liberação dos

exossomos para o meio externo, aonde vão exercer suas funções de sinalização celular.

1.3. Distribuição de moléculas na membrana dos exossomos, sua biogênese e secreção

A formação das partículas internas dos endossomos se inicia no estágio de EE e se completa quando da “maturação” do mesmo para LE. O mecanismo formador dessas partículas parece ser invaginação da membrana limitante endossomal, de tal forma que o conteúdo acumulado em seu interior corresponde ao conteúdo citoplasmático. Uma vez formadas, essas partículas tem um diâmetro de cerca de 50 a 100 nm e são compostas de uma dupla camada lipídica associada a proteínas de membrana, com conteúdo interno protéico e lipídico.

A despeito da formação das vesículas internas dos MVB ter sido descrita há cerca de 30 anos (HIRSCH et al, 1968), os mecanismos responsáveis pela distribuição de moléculas na membrana limitante dos endossomos e formação dos exossomos ainda não estão completamente esclarecidos. Aparentemente, três fatores podem contribuir para o processo: Ubiquitinação de proteínas na membrana dos MVB que poderia servir como sinal para formação vesicular; Presença de domínios semelhantes aos da membrana plasmática que funcionariam como intermediários no surgimento das vesículas; Presença de depressões revestidas por clatrina na face citoplásmica dos MVB (MURK et al, 2002).

A ubiquitina é uma proteína de baixo peso molecular que pode se ligar de forma covalente a si própria ou a outras proteínas. Dados em leveduras demonstram que a ubiquitinação de moléculas endossomais serve como sinal para sua distribuição na membrana das partículas, através da interação entre um complexo protéico de distribuição endossomal necessário para transporte (ESCRT-1) com uma proteína de distribuição vacuolar 27 (VPS27) presente em exossomos (AGUILAR et al, 2003).

Por outro lado, proteínas que não requerem ubiquitinação para serem distribuídas nos MVB, como as tetraspaninas, podem interagir com a membrana através de suas próprias características físico-químicas ou através de distribuição em microdomínios lipídicos na membrana. Tais microdomínios podem funcionar como dispositivos de coleta seletiva de moléculas ou mesmo ter um papel na geração de invaginações da membrana (IKONEN, 2001).

Por fim, a distribuição de moléculas na membrana vesicular pode depender de depressões revestidas por clatrina, que é recrutada para endossomos por intermédio de uma proteína de ligação ao fosfatidil-inositol-3-fosfato (PI3P), denominada Hrs. O bloqueio desta proteína causa formação de MVB aberrantes (KOMADA et al, 1999) e demonstrou-se também a associação entre Hrs e clatrina nos endossomos vacuolares maduros (BEAN et al, 2000).

Os melhores candidatos para proteínas responsáveis pela invaginação e formação das membranas luminais nos MVB são representados pelas proteínas VPS. Estudos em mutantes com ausência de síntese dessas proteínas indicam que esses organismos não são capazes de produzir vesículas internas em MVB (GILLOOLY et al, 2000). Além destas, diversas outras proteínas como Hrs e Snx-1

podem interagir entre si por intermédio de reações de fosforilação e ubiquitinação, atuando na distribuição molecular e na invaginação das membranas dos compartimentos da cadeia endossomal (PIPER & LUZIO, 2001). Embora muito do corrente estudo sobre a endocitose seja focado nessas proteínas e em sua interação espacial, ainda não está claro qual o verdadeiro papel dessas moléculas e nem sua contribuição específica na formação das partículas internas.

Sendo os exossomos formados a partir de invaginações das membranas internas dos EE, logo eles contêm citossol e em suas membranas externas devem ficar expostos os domínios extracelulares das proteínas transmembranas. De fato, anticorpos que reconhecem proteínas citossólicas presentes em exossomos não marcam um número significativo de partículas por microscopia imuno-eletrônica, ao passo que anticorpos dirigidos contra domínios extracelulares de moléculas presentes em exossomos como MHCII e CD9 são capazes de marcá-los de forma importante (THERY et al, 2002 b).

As evidências demonstrando a secreção de exossomos a partir de MVB têm se acumulado na literatura. Exossomos têm sido isolados de sobrenadantes de culturas de vários tipos celulares e essas partículas apresentam composição similar às partículas dos MVB (RAPOSO et al, 1996, KLEIJMEER et al, 2001). Tais partículas são depletadas de muitos dos marcadores moleculares de membrana, excluindo assim a possibilidade de que representem pedaços liberados da membrana plasmática. Do mesmo modo, estudos com microscopia eletrônica foram capazes de demonstrar a liberação dos exossomos pela fusão dos MVB com a membrana (ESCOLA et al, 1998, HEIJNEN et al, 1999).

Muito pouco é conhecido a respeito das vias que mediam a fusão dos MVB com a membrana plasmática e a posterior liberação dos exossomos. Sabe-se que, no geral, a fusão de organelas e membranas celulares é mediada por uma maquinaria celular específica que inclui moléculas como o fator sensível a N-etilmaleimida (NSF) e SNAREs específicos em ambas as superfícies que vão se fundir no processo. Os SNAREs produzidos em cada superfície é que vão ditar a especificidade dos eventos de fusão (PELHAM, 2001). Contudo, o real mecanismo pelo qual esses receptores proporcionam a interação entre as membranas ainda não é conhecido.

1.4. Composição molecular dos exossomos

A presença de proteínas em preparações de exossomos tem sido analisada através de western blotting, citometria de fluxo e microscopia imuno-eletrônica. Basicamente, a composição protéica final dos exossomos depende das células que lhe deram origem. Estudos em células dendríticas, linfócitos B, células epiteliais intestinais e em outros tipos celulares demonstraram uma composição protéica comum, bem como a presença de proteínas específicas a cada tipo celular (Fig. 2).

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

(GRUENBERG, 2001). Estas últimas provavelmente estão associadas a transporte e fusão de membranas intracelulares. Exossomos são constituídos ainda por moléculas envolvidas na transdução de sinal (proteínas-kinase, proteínas G heterotriméricas) e “heat-shock proteins” como HSC70 e HSP90. As chaperonas estão associadas à apresentação de antígenos, na medida em que podem se ligar a peptídeos antigênicos e participar na interação destes a moléculas do sistema MHC (SRIVASTAVA, 2002). Exossomos também contém moléculas MHC classe I e, por fim, entre as proteínas mais comuns e mais abundantes encontram-se as tetraspaninas, cujos membros CD63, CD9, CD81 e CD82 encontram-se virtualmente presentes em todos os tipos de exossomos. Embora sua função não seja completamente conhecida, acredita-se que façam parte de outro tipo de microdomínio de membrana diferente dos domínios lipídicos, estejam envolvidas em interação com integrinas e moléculas MHCII e colaborem em muitas das funções de ativação celular dos exossomos (HEMLER, 2003).

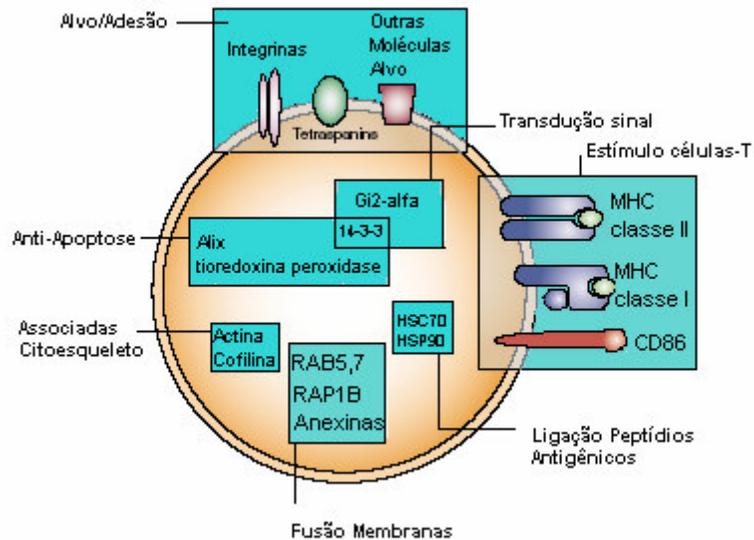


Fig. 2. Representação esquemática da composição protéica de exossomos derivados de células dendríticas. Adaptado de THERY, C. et al, 2002 (b).

Os exossomos também contêm proteínas envolvidas em funções celulares específicas. Exossomos de APC contêm grandes quantidades de MHC II, assim como os de células dendríticas contêm CD86, molécula bastante associada a funções estimuladoras de linfócitos T (THERY et al, 2001). É descrito ainda uma grande quantidade de moléculas provavelmente associadas ao endereçamento dos exossomos para células alvo. Dentre estas, destacam-se as cadeias alfa e beta das integrinas (integrina $\beta 2$ em células T e $\alpha 1\beta 1$ em reticulócitos), membros da família das imunoglobulinas (como as moléculas de adesão intercelular – ICAM1), CD54 em células B e p-selectina em plaquetas (THERY et al, 2002 b).

A presença de lipídios na composição interna dos exossomos parece ser de fundamental importância tanto na sua formação como na sua interação com células alvo. Estudos com metabolismo fosfolipídico indicam que a formação de partículas internas dos endossomos pode ser inibida pelo bloqueador de fosfatidil-

inositol 3-kinase wortmannin o qual causa um edema importante do sistema endossomal (FERNANDEZ-BORJA, 1999). O ácido lisobifosfatídico (LBPA), por sua vez, pode estar associado ao transporte de moléculas através dos endossomos, na medida em que regula o transporte intracelular de colesterol e os exossomos têm conteúdo aumentado de LBPA e colesterol (GRUENBERG, 2001). Outros lipídios presentes são a esfingomielina e a fosfatidiletanolamina. A esfingomielina, juntamente com o colesterol, é parte integrante e fundamental dos microdomínios lipídicos de membrana, importante para interação dos exossomos com células-alvo (STOORVOGEL et al, 2002).

1.5. Células produtoras e funções dos exossomos

A tabela 1 identifica as principais linhagens celulares produtoras de exossomos e os estudos que demonstraram sua produção.

Tabela 1. Células produtoras de exossomos

Células	Referências
Linfócito B	ESCOLA et al, 1998, RAPOSO et al, 1996
Linfócito T	PETERS et al, 1989, PETERS et al, 1991
Plaquetas	HEIJNEN et al, 1999, JANISZEWSKI et al, 2004
Células Dendríticas	THERY et al, 1999, THERY et al, 2001
Células Intestinais	VAN NIEL et al, 2001, KARLSSON et al, 2001
Mastócitos	RAPOSO et al, 1997, SKOKOS et al, 2001 (b)
Macrófagos	DENZER et al, 2000 (a)
Reticulócitos	JOHNSTONE et al, 1987, RIEU et al, 2001

A primeira descrição da presença de exossomos foi realizada em reticulócitos (PAN E JOHNSTONE, 1983). Tais células são eritrócitos imaturos, anucleados, que contém ribossomos e remanescentes do compartimento subcelular, como o retículo endoplasmático (RE), complexo de Golgi e o sistema endossomal. Em reticulócitos, o receptor de transferrina obsoleto é incorporado aos endossomos, dirigido aos MVB e transferido para os exossomos, sendo então excretado para o meio extracelular (PAN & JOHNSTONE 1983, JOHNSTONE et al, 1987). Assim, em reticulócitos, o exossomo funcionaria como um sistema de retirada do “lixo” celular. Uma outra proteína reciclada durante a eritropoiese e conseqüentemente acumulada em exossomos derivados de reticulócitos é a Integrina $\alpha 4\beta 1$ (RIEU et al, 2000). A presença dessa integrina facilita a ligação dos

exossomos à fibronectina ou à célula endotelial através da molécula de adesão a células vasculares 1 (VCAM-1), indicando desta forma uma possível função fisiológica dessas partículas. Possivelmente, o clearance de $\alpha 4\beta 1$ evita o surgimento de complicações vasculares, à medida que reduz a possibilidade de adesão dos reticulócitos às células endoteliais ou à fibronectina. Uma outra possível consequência dessa interação entre exossomo e célula endotelial é que essa última pode, através da sua ligação com o exossomo, proteger-se do ataque do sistema complemento, pela presença de CD55 e CD59, duas moléculas presentes em exossomos de reticulócitos (RABESANDRATANA et al, 1998).

Em Linfócitos T citotóxicos CD8⁺, os lisossomos são organelas secretórias envolvidas em armazenamento e liberação do conteúdo extracelular para danos às células alvo. Estudos prévios demonstraram a presença, em linfócitos T, de lisossomos que mais se assemelham a MVB, os quais contêm partículas internas ricas em perforina e granzimas (PETERS et al, 1991). Após estímulo ocorre liberação dessas partículas no meio extracelular, as quais, por intermédio do receptor de células T (TCR) que possuem em sua superfície, são capazes de guiar adequadamente a liberação de outros lisossomos com produtos tóxicos diretamente à célula alvo, evitando desta forma lesão a células das proximidades (PETERS et al, 1990). Embora o conteúdo protéico exato dessas partículas ainda esteja por ser determinado, um estudo recente demonstrou que estas apresentam muitas características similares às dos exossomos, inclusive com expressão de moléculas associadas com adesão celular, como o complexo TCR/CD3, CD2 e

CD18, o que sugere um papel dos exossomos na interação célula-célula mediada por linfócitos T (BLANCHARD et al, 2002).

A mais bem estudada população celular com capacidade para produção de exossomos são as APC. Tal profusão de estudos se deve ao fato dos exossomos estarem associados à produção de respostas de contra-ataque a tumores, o que gera um considerável interesse nessas partículas por pesquisadores da área oncológica. Exossomos carregados com antígenos tumorais já foram testados em estudos fase I em pacientes portadores de melanoma metastático, com resultados parciais indicando regressão clínica das lesões em pele e em linfonodos (ANDRE et al, 2001). Um outro estudo fase I com exossomos conduzido em pacientes com neoplasia pulmonar não pequenas células irrissecável demonstrou estabilização clínica prolongada após o tratamento com exossomos. Neste momento, estudos fase II com imunoterapia baseada em exossomos estão em andamento nestas populações de pacientes (THERY et al, 2002 b).

A primeira descrição de produção de exossomos por APC foi realizada por RAPOSO et al (1996). Esses autores demonstraram que clones de células B eram capazes de secretar partículas derivadas de MVB indutoras de proliferação *in vitro* de clones de células T CD4⁺ humanas, de forma dependente do antígeno apresentado. Curiosamente, a resposta de ativação das células T induzida pelos exossomos não era tão significativa quanto a resposta induzida pela presença das próprias células B. Tal fato poderia dever-se às quantidades relativamente menores de MHCII presentes nos exossomos em comparação com as células inteiras, bem como à maior superfície de contato das células B (RAPOSO et al, 1996). Em outro estudo, demonstrou-se que, de forma semelhante, exossomos

derivados de células dendríticas carregados com antígenos específicos seriam capazes de induzir atividade de células T CD4⁺ (via MHCII) e T CD8⁺ (via MHCI) *in vitro* (MURK et al, 2002). Em conjunto, estes resultados mostram que os exossomos funcionariam como moléculas de sinalização intercelular implicadas na ativação da resposta imune inata e adquirida.

Apesar de já haver avanços na caracterização do papel *in vivo* dos exossomos produzidos por APC, muito ainda há por ser esclarecido. Um estudo recente demonstrou a presença abundante de exossomos em células dendríticas foliculares (FDC) de linfonodos. Estas são células acessórias do sistema imune envolvidas com a diferenciação de linfócitos B em plasmócitos ou linfócito B de memória que não produzem exossomos e nem tem capacidade de sintetizar MHCII por si só, precisando então adquirir estas moléculas a partir de células doadoras (DENZER et al, 2000 b). A presença de partículas com características de exossomos ricas em MHCII na superfície dessas células, bem como a capacidade demonstrada de exossomos oriundos de linfócitos B de se ligarem especificamente e unicamente a elas sugere que as FDC poderiam funcionar como alvo fisiológico dos exossomos. Neste sentido, as FDC poderiam funcionar como “bibliotecas antigênicas”, estimulando as células T antígeno-específicas responsáveis pela ativação da diferenciação das células B ao nível dos folículos germinativos (DENZER et al, 2000 b).

Um aspecto interessante da estimulação de linfócitos por exossomos é que, freqüentemente, há necessidade da presença de APC para que essa estimulação ocorra. Por exemplo, a proliferação de células T CD4⁺ imaturas *in vitro* induzida por exossomos só ocorre com a presença associada de células dendríticas

maduras. Do mesmo modo, exossomos humanos derivados de células dendríticas carregados com MHC I foram capazes de ativar os clones T CD8⁺ correspondentes em cultura, desde que houvesse presença concomitante de DC (THERY et al, 2002 a). Essa necessidade de interação entre APC, exossomos e células efetoras poderia indicar que, sob determinadas circunstâncias, a ação dos exossomos poderia ocorrer ao nível de sinapse imunológica entre APC e linfócitos T.

Exossomos também têm sido associados à indução de respostas anti-tumor. ZITVOGEL et al (1998) demonstraram que exossomos isolados de DC em cultura e carregados com peptídeos MHC I derivados de tumor foram capazes de induzir resposta anti-tumorais de linfócitos T citotóxicos *in vivo*, inclusive com erradicação de tumores estabelecidos em animais. Do mesmo modo, células tumorais também têm capacidade de produzir exossomos carregados de antígenos tumorais, os quais, após transferência para células dendríticas, podem por sua vez induzir efeitos anti-tumorais mediados por células CD8⁺ (WOLFERS et al, 2001). Esta é a gênese dos estudos que tentam utilizar os exossomos como imunoterapia para o tratamento do câncer. Por esta abordagem, exossomos modificados para carregar o material genético do tumor contra o qual deveria haver resposta do organismo seriam administrados na tentativa de se erradicar tumores estabelecidos. Contudo, alguns problemas desta técnica devem ser enfatizados como, por exemplo, a incapacidade de exossomos isolados induzirem respostas tão eficazes quanto as APC ou mesmo a necessidade da presença de APC para adequado estímulo por parte dos exossomos em algumas linhagens celulares. Por outro lado, a interação exossomo-célula tumoral é muito mais complexa do que até agora foi descrito, pois os exossomos podem ser produzidos

tanto por células tumorais quanto por células de defesa do organismo. Dados da literatura demonstram que células tumorais de diversas linhagens são capazes de produzir partículas muito semelhantes aos exossomos associadas à indução de apoptose em linfócitos T, desta forma ajudando as células tumorais a escapar da destruição pelas células do organismo (ANDREOLA et al, 2002). Do mesmo modo, exossomos isolados de pacientes com derrames pleurais ou ascite por neoplasia foram captados por células dendríticas derivadas de monócitos e apresentados a linfócitos dos mesmos pacientes *in vitro*, o que induziu a produção de Interferon- γ e causou lise de células tumorais (ANDRE et al, 2002).

Os mastócitos sempre foram considerados como células responsáveis pela atividade alérgica do organismo, principalmente por mecanismo mediado por IgE. A descoberta que os mastócitos contém em seu interior grânulos com citocinas levou a realização de estudos para avaliar a possível interação entre mastócitos e células B e T, quer seja por mecanismos dependentes ou independentes de IgE. Um das formas pelas quais os mastócitos podem interagir com linfócitos B e T é através da produção de exossomos. RAPOSO et al (1997) identificaram a presença de partículas contendo MHCII em mastócitos e sua exteriorização da célula após estímulo. Mais recentemente demonstrou-se que essas partículas eram exossomos e estavam associadas à ativação de linfócitos B e T *in vitro* (SKOKOS et al, 2001 b), bem como maturação funcional de DC imaturas (SKOKOS et al, 2003), demonstrando assim uma interação entre mastócitos e APC por um mecanismo mediado por exossomos.

Recentemente, células epiteliais foram descritas como podendo secretar na circulação, sob condições inflamatórias, partículas muito semelhantes aos exossomos (VAN NIEL et al, 2001, KARLSSON et al, 2001). Essas partículas são carregadas com antígenos MHCII e provavelmente estariam associadas à indução e manutenção da tolerância periférica a antígenos exógenos do conteúdo intestinal (VAN NIEL et al, 2002). Essas partículas foram denominadas tolerossomos e demonstrou-se a possibilidade de se expor as células epiteliais a antígenos exógenos e recolher os tolerossomos carregados com tais antígenos do soro. Outras células associadas com formação de partículas semelhantes a exossomos são as células epiteliais prostáticas. Tais partículas, denominadas prostassomos, estariam associadas com proteção do esperma em relação ao meio ácido, melhora da motilidade espermática e imunomodulação local (KRAVETS et al, 2000).

Em *Drosophila*, a formação de “padrões” característicos durante o desenvolvimento evolutivo depende da distribuição dos morfógenos nos tecidos. Morfógenos são moléculas cuja presença determina a identidade futura de células precursoras no tecido embrionário. Alguns desses morfógenos são capazes de se dispersar a largas distâncias em associação com pequenas partículas denominadas argossomos, os quais, em muitas características, se assemelham a exossomos. Estas partículas já foram detectadas no interior dos endossomos e poderiam estar ligadas a transferências de material célula a célula, demonstrando assim um possível papel dos exossomos na biologia do desenvolvimento dessa espécie (GRECO et al, 2001).

1.6. Exossomos derivados de plaquetas

A discussão sobre os exossomos derivados de plaquetas será mais detalhada, em virtude de nossos dados prévios terem demonstrado que os exossomos plaquetários são os mais freqüentes em plasma de pacientes com choque séptico, assunto deste estudo (JANISZEWSKI et al, 2004).

Plaquetas são fragmentos celulares originados de megacariócitos da medula que circulam na corrente sanguínea em estado não ativado. Após lesão vascular, as plaquetas passam a exibir propriedades de adesão ao endotélio, agregação e liberação de substâncias a partir de seus grânulos (alfa e densos). A ativação plaquetária é mediada por adesão à superfície (colágeno) ou por agonistas específicos (trombina), os quais podem ativar também a cascata de coagulação.

O armazenamento de substâncias para posterior liberação a partir dos grânulos alfa pode advir de diversas origens. O fator de Von Willebrand e a β -tromboglobulina são sintetizados nos megacariócitos enquanto o fibrinogênio, por sua vez, é exclusivamente recrutado do plasma (HARRISON et al, 1989), indicando então que a endocitose poderia ser responsável pela incorporação de fibrinogênio aos grânulos-alfa (HEIJNEN et al, 1998).

Uma investigação mais detalhada da biogênese dos grânulos-alfa demonstrou que os MVB são organelas intermediárias em sua formação. HEIJNEN et al (1998), utilizando técnicas de microscopia eletrônica, demonstraram a presença de MVB em megacariócitos em cultura e em linhagem

celular megacariocítica, bem como identificaram a presença de partículas no interior dos α -grânulos. Essas partículas poderiam corresponder a exossomos, na medida em que eram ricas em CD63 e poderiam estar ligadas à sinalização celular, pois apresentavam conteúdo rico em p-selectina e Fator de Von Willebrand.

Um estudo posterior do mesmo grupo (HEIJNEN et al, 1999) identificou mais detalhadamente a produção de exossomos por plaquetas ativadas. O estímulo plaquetário com TRAP (peptídeo ativador do receptor de trombina) ou com alfa-trombina deu origem à produção plaquetária de dois tipos de partículas diferentes. As partículas maiores, também denominadas micropartículas, são derivadas de brotamento da membrana, medem entre 100 e 1000 nm, são detectáveis por citometria de fluxo, expressam grandes quantidades de anexina V em sua superfície e são capazes de induzir ativação da cascata da coagulação. Micropartículas com essas características podem também ser produzidas por diversos tipos celulares e estão presentes no plasma nas mais diversas situações clínicas, apresentando um perfil de atividade redox característico (PEDRO et al, 2003).

Por outro lado, a ativação plaquetária por esses agonistas induz a liberação de exossomos derivados dos α -grânulos. Tais exossomos expressam fracamente anexina V em sua superfície e têm pouca capacidade de ligação ao Fator X da coagulação e à protrombina, indicando assim uma baixa atividade pró-coagulante (HEIJNEN et al, 1999).

Recentemente identificamos em nosso laboratório a presença de exossomos no plasma de pacientes com choque séptico internados em UTI (JANISZEWSKI et al, 2004). A caracterização utilizando citometria de fluxo demonstrou que esses exossomos tem antígenos de superfície compatíveis com origem predominantemente plaquetária (Fig. 3). Os exossomos de pacientes sépticos têm atividade produtora de EROS intrínseca e induzem apoptose em células vasculares em cultura. A análise por Western blotting de sua composição demonstrou que estão presentes duas proteínas ($p22^{phox}$ e $gp91^{phox}$) constituintes da NAD(P)H oxidase, o que indica que parte do estresse oxidativo da sepse pode ser produzido pelos exossomos circulantes.

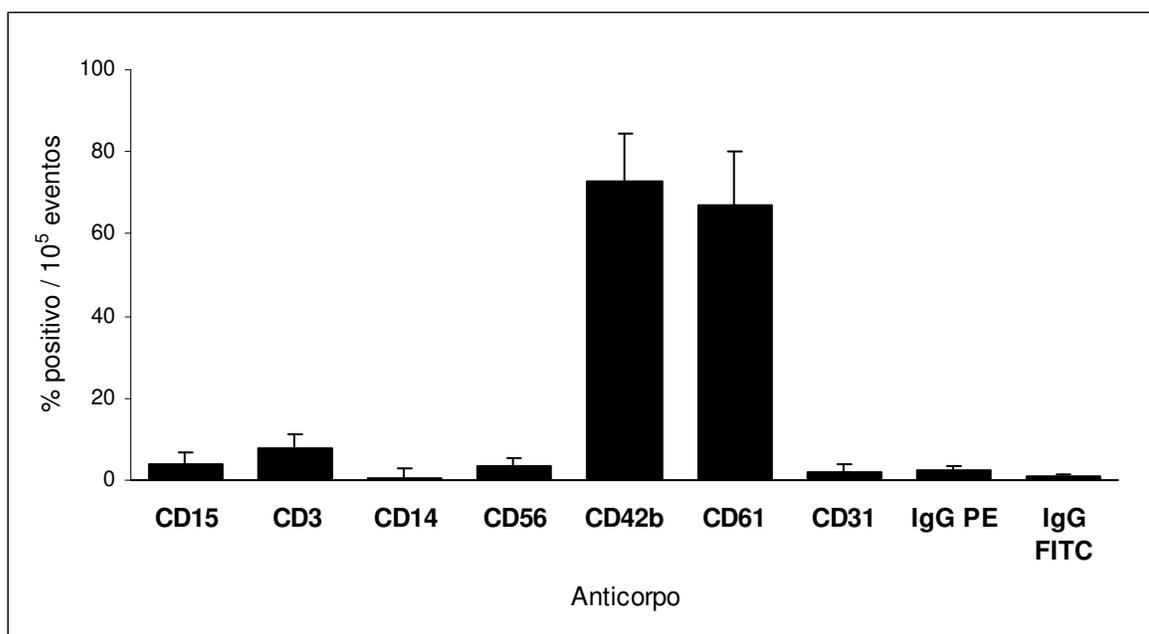


Fig. 3. Porcentagem de eventos positivos em citometria de fluxo da contagem de 100000 exossomos de pacientes sépticos para antígenos de superfície específicos (CD15: granulócitos, CD14: monócitos, CD3: linfócitos, CD56: células NK, CD31: células endoteliais, CD61 e CD42b: plaquetas – IgG PE e IgG FITC são controles negativos). Adaptado de JANISZEWSKI et al, 2004.

2. Hipótese

Considerando-se que a disfunção cardiovascular da sepse pode estar relacionada à produção aumentada de espécies reativas de oxigênio e que exossomos derivados de plaquetas de pacientes sépticos tem atividade NAD(P)H oxidase e induzem estresse oxidativo em células vasculares em cultura, formulamos a hipótese de que a presença de exossomos plaquetários circulantes em pacientes sépticos pode estar relacionada à alteração da reatividade vascular e a disfunção contrátil cardíaca observados na sepse.

3. Objetivos

3.1. Ampliar a caracterização de exossomos derivados de plaquetas de pacientes sépticos, quanto a seu perfil óxido-redutor e expressão de proteínas relacionadas a estresse oxidativo.

3.2. Avaliar, em preparações de coração isolado, músculo papilar e vaso isolado, se exossomos de pacientes sépticos poderiam estar envolvidos na alteração do tônus vascular e na disfunção cardíaca contrátil observadas na sepse.

4. Casuística e Métodos

4.1. Reagentes

Todos os reagentes utilizados nos experimentos foram adquiridos da empresa Sigma-Aldrich Chemical Co. (EUA), a não ser quando especificados serem de outra origem, tendo sido diluídos e estocados conforme as orientações do fabricante. Anticorpos monoclonais produzidos em camundongo anti-humano para NOS I, II e III foram adquiridos de Transduction Laboratories (EUA). Anticorpo monoclonal para PDI murino anti-humano foi adquirido de Affinity Bioreagents (EUA). SOD extracelular e anticorpo policlonal para ecSOD cabra anti-humano foram gentilmente cedidos pelo Prof. Stephan Marklund (Universidade de Umea, Suécia). Anticorpo policlonal para CuZn SOD anti-humano produzido em ovelha foi adquirido de Oxis International (EUA). A CuZn SOD foi obtida da Roche Molecular Biochemicals (EUA). Os anticorpos secundários policlonais mula anti-cabra, coelho anti-ovelha e ovelha anti-murino foram adquiridos respectivamente da Santa Cruz Biotechnology (EUA), da Calbiochem Inc. (EUA) e da Amersham-Pharmacia (Grã-Bretanha). A glutathiona reduzida (GSH), glutathiona oxidada (GSSG), glutathiona redutase e a nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) foram obtidos da Merck (Alemanha).

4.2. Casuística

Cinquenta e cinco pacientes internados na UTI da Disciplina de Emergências Clínicas do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP com menos de 48 horas de evolução de choque séptico conforme definido pela Society of Critical Care Medicine (BONE et al, 1992) foram incluídos no estudo. Os critérios para admissão foram os seguintes:

- Evidência de infecção.
- Critérios de Síndrome Resposta Inflamatória Sistêmica (SIRS) (três ou mais dos seguintes): Febre (temperatura central maior que 38° C ou menor que 36° C); taquicardia (acima de 90 batimentos por minuto), taquipnéia (acima de 20 incursões por minuto ou PaCO₂ menor que 32 mmHg), leucocitose (leucometria maior que 12000/mm³ ou menor que 4000/mm³ ou mais que 10% de formas jovens no sangue periférico).
- Choque Séptico: Pressão arterial sistólica menor que 90 mmHg e/ou pressão arterial média menor que 65 mmHg, apesar de ressuscitação volêmica adequada (reposição de pelo menos 500 ml de solução cristalóide), com necessidade de uso de drogas vasoativas ou necessidade de uso de drogas vasoativas em pacientes com volemia já adequada (pressão venosa central maior que 12 mmHg e/ou pressão capilar pulmonar maior que 15 mmHg).

Foram excluídos do estudo os pacientes que apresentassem um dos critérios abaixo:

- Anemia grave (hemoglobina < 7,0 mg/dl) ou vigência de sangramento ativo.
- Pacientes cuja família se recusou a assinar o termo de consentimento.
- Expectativa de vida provável não maior que 24 horas pela gravidade da condição clínica.
- Doenças plaquetárias conhecidas.
- Condições sabidamente causadoras de plaquetopenia (por exemplo, trombocitopenia induzida por heparina ou quimioterapia), excetuando-se sepse.
- Pacientes em vigência de uso pleno de heparina (heparina de baixo peso molecular ou não-fractionada) ou de qualquer outra medicação que interferisse com a função plaquetária.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da instituição e foi obtido consentimento informado por escrito dos responsáveis pelos pacientes. Doze indivíduos saudáveis doaram sangue para realização de experimentos controle.

4.3. Isolamento de Exossomos

De cada paciente foram coletados 50 ml de sangue em amostra única para separação e isolamento de exossomos. Cada amostra foi coletada em tubos estéreis de centrifugação contendo heparina na concentração de 5 U/ml de sangue e todos os procedimentos de separação foram realizados a 4° C.

Inicialmente, o sangue total foi submetido a centrifugação simples a 3000 rpm durante 10 minutos para separação do plasma dos elementos figurados. A seguir, o sobrenadante foi retirado e a ele foram adicionados inibidores de protease: PMSF (3,0 mM), aprotinina (1,0 µg/ml) e pepstatina (1,0 µg/ml). Procedeu-se então à filtração seqüencial do sobrenadante em filtros de náilon de 1,0 µm, 0,45 µm e 0,22 µm para remoção de plaquetas e outras células intactas, fragmentos celulares e corpos apoptóticos. A seguir, a amostra foi submetida a ultracentrifugação a 140000 g durante 150 minutos a 4° C e isolou-se o “pellet” rico em exossomos. O excesso de proteínas plasmáticas foi cuidadosamente removido com lavagem com Tampão Tris (50mM)-salina (150mM NaCl) com ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA) (0,1 mM). A seguir, o “pellet” foi ressuspendido em 1,0 ml do mesmo tampão. As amostras foram estocadas em freezer a -80° C até a realização dos experimentos. A medida de concentração de proteínas foi realizada por kit utilizando ensaio colorimétrico pelo método de Bradford (Bio-Rad, EUA).

4.4. Caracterização dos exossomos

4.4.1. Microscopia Eletrônica

Para a realização de microscopia eletrônica, as amostras foram separadas sem as etapas de filtração e ultracentrifugação, para reduzir a formação de agregados de exossomos. Plasma de pacientes sépticos foi centrifugado a 11000g

por 2 minutos para se obter o plasma pobre em plaquetas, ao qual se acrescentou tampão Tris-NaCl-EDTA com PMSF 3,0 mmol/L. A seguir, submeteu-se o plasma a nova centrifugação a 13000g por 90 minutos a 4°C. O pellet obtido foi ressuspendido em 100 µl do mesmo tampão. Essas amostras foram submetidas à microscopia eletrônica de transmissão sob coloração negativa. Sobre grades de cobre de 0,5 cm², cobertas com película de FORM-VAR®, depositou-se 10 µl de exossomos por 30 segundos, para adsorção à película. A gotícula foi então secada com papel de filtro (por capilaridade), sendo depositados a seguir 10 µl de ácido fosfotúngstico a 1% por mais 30 segundos, e novamente secou-se a gotícula com papel de filtro. As amostras foram então observadas ao microscópio eletrônico (Phillips EM-420), tendo sido feitas micrografias sob diversos aumentos para identificação dos exossomos.

4.4.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS e Western blotting

Após separação, o “pellet” rico em exossomos foi submetido à lise em tampão Hepes 20 mM com NaCl 150 mM, glicerol 10%, triton 1%, EGTA 1, 0 mM e MgCl₂ 1,5mM, na presença dos inibidores de protease PMSF 1,0 mmol/L, aprotinina 1,0 µg/ml e leupeptina 1,0 µg/ml. Após determinação da concentração de proteínas nas amostras pelo método de Bradford, alíquotas de 15 µg de proteína de exossomo foram diluídas em tampão de amostra contendo azul de bromofenol 0,02%, mercaptoetanol 10 mM e SDS 10%. Essas amostras foram aquecidas por 5 minutos a 100°C para desnaturação de proteínas e quebra de pontes dissulfeto. As amostras foram então aplicadas ao gel de eletroforese de

poliacrilamida com SDS (8% a 12%) e submetidas à corrente elétrica contínua de 50 mA por 80 minutos para separação eletroforética das proteínas. Foram também aplicados ao gel controles positivos e um padrão de bandas de pesos moleculares conhecidos (Kaleidoscope®, Bio-Rad, EUA). Os controles positivos utilizados foram: lisado de pituitária de rato (NOS-I – Transduction Laboratories, EUA), macrófagos estimulados com IFN- γ e LPS (NOS-II – Transduction Laboratories, EUA), lisado de endotélio humano (NOS-III – Transduction Laboratories, EUA) e proteína pura (ecSOD e CuZnSOD). Em alguns experimentos, o gel foi corado com solução de Coomassie Blue por 12-18 horas e, após lavagem com solução descorante composta por ácido acético e metanol, foram visualizadas as bandas de proteínas correspondentes, sendo o gel a seguir desidratado e fixado em papel de filtro. Em outros experimentos, após a separação, realizou-se a transferência das proteínas para membrana de nitrocelulose, através do sistema de transferência semi-seco (Semiphor, Hoefer-Pharmacia, Suécia) com corrente elétrica contínua de 0,8 mA/cm² por 90 minutos. A membrana de nitrocelulose foi então corada com solução de Ponceau para visualização da correta transferência de proteínas das amostras e do padrão de pesos moleculares. Após lavagem em tampão TBS-T 0,1%, foi realizado o bloqueio inespecífico das membranas de nitrocelulose com leite em pó desnatado a 5% diluído em TBS-T 0,1% pH 7,60 por 60 minutos em temperatura ambiente, com o objetivo de minimizar a ligação inespecífica de anticorpos. Os seguintes anticorpos primários foram diluídos no título de 1:1000 em TBS-T 0,1% com leite desnatado a 5% e incubados por 12-18 horas a 4° C com as membranas: anti-PDI (monoclonal murino anti-humano), anti

NOS I, II e III (monoclonal murino anti-humano), anti-ecSOD (policlonal cabra anti-humano) e anti-CuZnSOD (policlonal ovelha anti-humano). Após lavagem com TBS-T 0,1% (3 vezes de 5 minutos cada), foi realizada a incubação com anticorpo secundário (1:2000) conjugado com peroxidase por 1 hora à temperatura ambiente. Após novas lavagens, foi procedida à revelação da membrana por método quimioluminescente (peroxidase - H_2O_2 - luminol), utilizando-se para tal fim o kit ECL (Amersham-Pharmacia, Grã-Bretanha). Após 1 minuto de reação, a membrana foi exposta ao filme radiográfico por período de 1 a 5 minutos e revelada em equipamento automatizado.

4.4.3. Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC)

Amostras de exossomos de pacientes sépticos tiveram seu conteúdo protéico precipitado através da diluição em partes iguais com ácido tricloroacético a 10% e centrifugação a 10000 rpm por 10 minutos. A análise dos exossomos por cromatografia foi realizada com auxílio de um sistema de HPLC (Waters Co., EUA), constituído por duas bombas 515, acopladas ao detector de UV-visível 2996. As amostras foram submetidas à separação cromatográfica usando uma coluna X-Terra (4.5 x 250 mm; 5 μ m). Como fase móvel foi utilizada solução de 100 mM KH_2PO_4 (pH 2,5), 200 mg/l heptanossulfonato de sódio, 5 mg/l EDTA em 1% metanol (v/v), em fluxo de 0.5 ml/min. A eluição do urato foi monitorada com detecção UV-visível, enquanto a eluição do GSH foi monitorada com detecção eletroquímica (potencial de oxidação GSH, 600 mV) (HIRAKU et al, 2002). Os compostos foram identificados e quantificados pela comparação de seu tempo de

retenção com padrão autêntico submetido às mesmas condições cromatográficas. A análise de GSSG foi realizada indiretamente pela sua redução enzimática a GSH pela glutathione redutase (0,6 U/ml)/ NADPH (0,2 mg/ml) por 30 min. A quantificação do GSSG foi inferida pela diferença do GSSG total reduzido em relação ao GSH total das mesmas amostras, considerando-se a estequiometria 2GSH/GSSG.

4.4.4. Quantificação de óxidos de nitrogênio em amostras de exossomos

Amostras de exossomos de pacientes sépticos tiveram seu conteúdo protéico precipitado através da diluição em partes iguais com ácido tricloroacético a 10% e centrifugação a 10000 rpm por 10 minutos. A seguir, utilizou-se a técnica de quimioluminescência para quantificação de nitrito (NO_2^-) e nitrato (NO_3^-) nos exossomos, por meio do analisador de NO (Sievers, modelo NOA280, EUA). Essa técnica requer a redução de nitrito e nitrato a NO, o qual reage com ozônio para gerar luz, que é quantificada por fotomultiplicadoras. Para conversão do nitrato a NO, utilizou-se reação com cloreto de vanádio (VnCl_4) em ácido clorídrico a 95°C e para redução do nitrito a NO utilizou-se Iodeto de Potássio (KI) em ácido acético. A curva de calibração em níveis múltiplos foi realizada por padrão externo (nitrito e nitrato de sódio – Aldrich, EUA), utilizando-se programa específico (Sievers, versão 2.2, EUA). Os resultados foram normalizados para a concentração de proteínas presente nas amostras de exossomos.

4.5. Avaliação da Disfunção Cardiovascular Induzida por Exossomos

4.5.1. Infusão de exossomos em coração isolado de coelho (Langendorff)

Cinquenta coelhos machos Nova Zelândia pesando entre 2,5 kg e 3,5 kg foram pré-anestesiados com xilazina 20 mg por via intra-muscular, anestesiados com cloralose (60 mg/kg) e uretana (600 mg/kg) e heparinizados (250 UI). A seguir, foram submetidos a traqueostomia e mantidos sob ventilação mecânica durante todo o procedimento. Foi realizada toracotomia e a aorta foi canulada e perfundida com solução de Krebs-Henseleit (composição NaCl 115mM; KCl 5,4mM; CaCl₂ 1,25mM; NaHCO₃ 25mM; MgSO₄ 1,2mM; NaH₂PO₄ 1,15mM; glicose 11mM) equilibrada com 95% O₂ / 5% CO₂ a uma temperatura constante de 37° C e a um fluxo constante de 15 ml/min com o objetivo de manter perfusão coronariana retrógrada, de acordo com a técnica de Langendorff. A seguir, o coração foi cuidadosamente excisado e colocado em uma câmara a 37° C. Através de uma incisão atrial, foram instalados no ventrículo esquerdo um dreno e um balão de látex preenchido por fluido para obter uma pressão diastólica final de ventrículo esquerdo de 5 mmHg. A frequência cardíaca foi mensurada continuamente e as derivadas máximas pressão-tempo positiva (+dp/dt) e negativa (-dp/dt) foram obtidas através do sinal da pressão ventricular esquerda, por meio de um sistema de aquisição de dados (Biopac Systems, EUA). A

preparação foi mantida a 37°C durante todo o procedimento através da manutenção do coração em uma câmara de vidro com temperatura regulada.

Após estabilização de 15 minutos, foi iniciada a infusão em sistema de recirculação fechado de solução de exossomos, em concentração equivalente à metade da concentração plasmática. Essa concentração foi escolhida após estudos preliminares terem demonstrado efeitos semelhantes à concentração plasmática plena. A perfusão em sistema fechado permaneceu por 20 minutos. A seguir, a preparação foi novamente perfundida em sistema aberto com solução de Krebs-Henseleit livre de exossomos durante 15 minutos para retorno às condições basais.

4.5.2. Experimentos com Inibidores

Para identificar os possíveis mecanismos associados ao efeito dos exossomos no coração isolado, foram realizados experimentos nos quais o coração no sistema de recirculação fechada foi pré-incubado por 20 minutos com inibidores descritos na tabela abaixo.

Tabela 2 – Inibidores utilizados.

Inibidor	Dose	Efeito
NAC	3,0 mM	Doador de grupamentos tióis; anti-oxidante
LNMMMA	0,1 mM	Inibidor de NOS
Indometacina	0,01 mM	Inibidor da Ciclooxigenase
DPI	0,02 mM	Inibidor de Flavoenzimas
DTNB	0,5 mM	Inibidor de Proteína Dissulfeto-Isomerase
Apocinina	1,0 mM	Inibidor da NAD(P)H oxidase

4.5.3. Infusão de exossomos após exposição prévia a LPS

Com objetivo de investigar o papel dos exossomos em um modelo animal mais semelhante à sepse humana, coelhos foram pré-tratados com endotoxina (LPS – *E. coli* sorotipo 026:B6) na dose única de 1,0 mg/kg por via endovenosa. Após 3 horas da infusão do LPS, foi administrado 8,0 ml/kg de solução salina fisiológica, com a intenção de reduzir parcialmente a característica hipodinâmica que normalmente está associada a esse modelo quando não é realizada reposição volêmica (FINK & BAGGS, 1997). Após 6 horas do início da endotoxemia, os animais foram sacrificados e o restante do experimento em coração isolado foi realizado nos mesmos moldes já descritos anteriormente.

4.5.4. Preparação de músculo papilar isolado de rato

Dez ratos Wistar machos pesando entre 350 g e 450 g foram anestesiados com uma mistura de ketamina (100 mg/ml) e xilazina (20 mg/ml), na dose de 0,1 ml/100 mg peso corporal. Foi realizada toracotomia e o coração foi retirado cuidadosamente e mergulhado em solução de Krebs-Henseleit (composição NaCl 118,5 mM; KCl 4,69 mM; CaCl₂ 2,52 mM; NaHCO₃ 25,88 mM; MgSO₄ 1,16 mM; KH₂PO₄ 1,18 mM; glicose 5,50 mM) borbulhada com 95% O₂/5% CO₂ com pH 7,40 e à temperatura constante de 29° C, na qual permaneceu por aproximadamente um minuto. Procedeu-se à retirada do ventrículo direito com o objetivo de se expor o septo interventricular, o qual foi dividido ao meio para que pudesse haver visualização direta dos músculos papilares anterior e posterior. Realizou-se então a dissecação cuidadosa dos músculos papilares em solução de Krebs-Henseleit oxigenada e à temperatura de 29° C. A pressão parcial de oxigênio da solução foi mantida entre 550 e 600 mmHg.

A seguir, os músculos foram fixados através de suas extremidades a dois anéis de aço inoxidável e posicionados verticalmente em uma câmara de vidro contendo 35 ml de solução de Krebs-Henseleit nas mesmas condições descritas anteriormente. A extremidade superior do músculo foi conectada através do anel e de um fio de aço inoxidável de diâmetro 0,038 cm a um transdutor de força (Grass, modelo FT 03, EUA). O anel da extremidade inferior foi conectado a um fio de aço que atravessava a câmara de contração e mantido fixo a um micromanipulador

(Mitutoyo modelo nº 2046F, EUA). Paralelamente ao músculo papilar foram mantidos dois eletrodos de platina, acoplados a um estimulador elétrico (DV&M, modelo ESF-10, EUA), o qual liberava estímulos em onda de 5 ms com voltagem aproximadamente 10 a 15% maior que o mínimo necessário para provocar resposta mecânica máxima do músculo com frequência de estímulos de 0,2 Hz (12 vezes por minuto).

Inicialmente, os músculos papilares foram mantidos sob contração isotônica contra uma mola com tensão de repouso de 0,4 g por 20 minutos. A seguir, procedeu-se à fase de contração isométrica com tensão de repouso de 0,4 g por 20 minutos. Após a estabilização da preparação com auxílio do micromanipulador, o músculo foi lentamente estirado até atingir o ápice da curva comprimento-tensão ($L_{máx}$ - comprimento diastólico da fibra muscular associado com tensão isométrica máxima desenvolvida). Depois de atingido o $L_{máx}$, o sistema foi mantido em equilíbrio por 20 minutos, quando então se iniciou o experimento.

Uma solução rica em exossomos de pacientes sépticos e indivíduos saudáveis foi introduzida no sistema em concentração equivalente à metade da concentração plasmática obtida e mantida por um período de 45 minutos. Nesse período, foram registradas através de software de aquisição de dados (Biopac, EUA) as seguintes variáveis:

- a) Tensão desenvolvida máxima isometricamente em gramas (TD);
- b) Tensão de repouso em gramas (TR);
- c) Tempo decorrido desde o início da contração até que seja atingido o pico de tensão desenvolvida em milissegundos (TPT - Time to Peak Tension);

- d) Velocidade máxima de variação temporal da tensão desenvolvida ($+dT/dt$) e velocidade máxima de variação temporal de relaxamento da tensão desenvolvida ($-dT/dt$), as quais informam variação temporal na força de contração e de relaxamento do miocárdio, respectivamente.
- e) Tempo para a tensão desenvolvida decrescer 50% de seu valor máximo em milissegundos (TR50);

Todos os experimentos foram realizados no Laboratório de Fisiologia Cardiovascular da UNIFESP/EPM, sob a orientação do Prof. Dr. Paulo Tucci.

4.5.5. Avaliação da Reatividade Vascular em Vasos Isolados

Ratos Wistar machos pesando entre 250-350 g foram sacrificados através de câmara de CO₂. A aorta torácica foi cuidadosamente retirada, mantida em tampão Krebs-Hepes (composição: NaCl 120,0 mM; KCl 4,7 mM; CaCl₂ 1,9 mM; NaHCO₃ 25,0 mM; MgSO₄ 1,2 mM; KH₂PO₄ 1,05 mM; glicose 11,1 mM; Hepes 20 mM) a um pH 7,40 e equilibrado com 95% O₂ / 5% CO₂, dissecada e limpa para remoção de qualquer tecido subjacente e trombos. A seguir, o vaso foi dividido em quatro anéis vasculares de 5 mm de comprimento, suspensos em dois fios paralelos intraluminais e introduzidos em um banho de órgãos contendo Krebs-Hepes à temperatura constante de 37° C, equilibrado com 95% O₂ / 5% CO₂. Os anéis foram submetidos a um período de estabilização sob tensão isométrica constante de 2 g por 60 minutos (pré-carga). Neste intervalo, dois segmentos

foram incubados com exossomos de pacientes sépticos e de controles saudáveis, em concentração igual à concentração plasmática. Imediatamente antes da fase de pré-contração, um terceiro anel foi incubado com a mesma concentração de exossomos de pacientes sépticos, com o objetivo de se avaliar um possível efeito agudo dessas partículas no tônus vascular. O quarto anel foi mantido sem incubação (controle). Todos esses vasos foram pré-contraídos com norepinefrina 10^{-7} M e a tensão vascular foi registrada a cada 2 minutos. Após 15 minutos de equilíbrio, foram realizadas curvas de relaxamento em resposta a concentrações crescentes de acetilcolina (10^{-9} a 3×10^{-5} M). Os valores de contração e relaxamento vascular foram registrados através de um sistema de aquisição de dados (Biopac, EUA).

4.5.6. Quantificação de óxidos de nitrogênio em tecido miocárdico de preparações de coração isolado

Em uma série de experimentos que visavam quantificar a produção de metabólitos do NO pelo miocárdio, preparações de coração isolado foram incubadas por 45 minutos com exossomos de pacientes sépticos e de controles saudáveis. Após a infusão de exossomos, o sistema foi aberto e perfundido com solução de Krebs-Henseleit a 4°C por 5 minutos, tendo a seguir o coração sido removido e o tecido miocárdico correspondente à parede livre do VE sido cuidadosamente dissecado em um meio contendo solução de Krebs-Henseleit a

4°C. Os músculos papilares foram retirados e o tecido miocárdico restante foi imediatamente congelado em nitrogênio líquido e transferido para freezer a -80°C. Para quantificação de nitrito e nitrato foram realizados homogenatos de tecidos miocárdicos, por lise tecidual com triturador, seguida de diluição em 3,0 ml de tampão Tris-HCl 50 mM com PMSF 1 mM e 0,1% mercaptoetanol. O tecido lisado foi submetido à centrifugação a 5000 rpm por 5 minutos, a 4°C para remoção de debris e células não lisadas. O sobrenadante foi então recolhido e submetido à quantificação de proteínas por ensaio colorimétrico (Bradford, Bio-Rad, EUA). Amostras equivalentes a 20 µl tiveram seu conteúdo de nitrito e nitrato mensurado, com protocolo similar ao utilizado para quantificação de nitrito e nitrato nos exossomos. Os resultados foram normalizados para a concentração de proteínas das amostras.

4.6. Análise estatística

Todos os dados estão apresentados como média \pm 1 erro padrão da média (EPM). Para análise estatística, utilizou-se análise de variância para medidas repetidas de uma via com teste de Tukey para comparação intra-grupos, teste t emparelhado para medidas no mesmo grupo ou teste t, para comparação entre diferentes grupos. O nível de significância foi 5%. Para análise estatística, utilizou-se o programa SigmaStat 2.0 (Jandel Corporation, EUA).

5. Resultados

5.1. Dados demográficos e características dos pacientes

A tabela 3 evidencia os dados demográficos e as características principais dos 55 pacientes incluídos no estudo, bem como sua mortalidade. Os voluntários saudáveis que doaram sangue para realização de experimentos controle tinham média de idade em torno de 30 anos, eram todos do sexo masculino e não apresentavam doenças prévias.

Tabela 3. Dados demográficos e características principais dos pacientes.

Características	Número de pacientes (%)
Sexo masculino	39 (71)
Idade (anos)	47,8 ± 2,2
HAS	13 (23)
DM	11 (20)
Tabagismo	5 (9)
DPOC	4 (7)
ICC	5 (9)
SIDA	9 (16)
Neoplasias	4 (7)
Foco Pulmonar	31 (56)
Foco Urinário	4 (7)
Foco em pele e anexos	7 (13)
Foco abdominal	5 (9)
Outros Focos	3 (5)
Foco Ignorado	5 (9)
Mortalidade na UTI	24 (43)

5.2. Caracterização dos exossomos

5.2.1. Quantificação de proteínas

Quando analisadas pelo método de Bradford, as amostras de exossomos de pacientes sépticos geraram uma concentração de proteínas de $16,5 \pm 0,99$ mg/ml, ao passo que amostras de indivíduos saudáveis geraram uma concentração protéica de $5,8 \pm 0,96$ mg/ml ($p < 0,001$, teste t).

5.2.2. Microscopia Eletrônica

Amostras de exossomos de paciente sépticos foram analisadas através da técnica de coloração negativa com ácido fosfotúngstico a 1%. Foram evidenciadas estruturas arredondadas com diâmetros entre 50 e 150 nm, onde não se depositou material elétron-denso (coloração negativa) (Fig. 4). As outras estruturas evidenciadas na microscopia são artefatos derivados da técnica e da agregação dos exossomos na preparação.

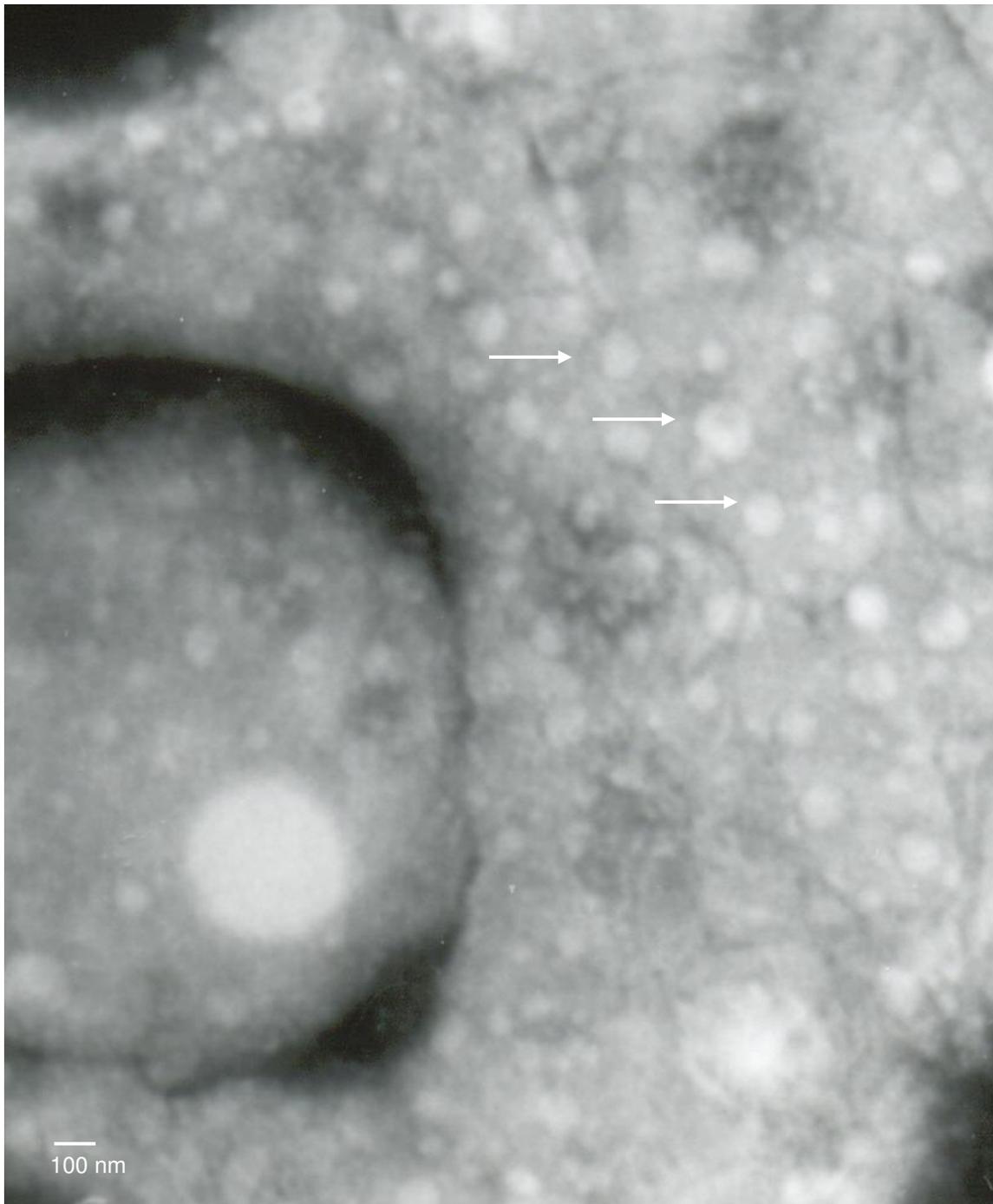


Fig. 4. Microscopia eletrônica com ácido fosfotúngstico identificando estruturas arredondadas, com diâmetro entre 50 e 150 nm sem depósito de material elétron-denso (setas), que correspondem a exossomos (aumento de 41000x).

5.2.3. SDS-PAGE e Western blotting de exossomos de pacientes sépticos

Além das subunidades da NAD(P)H oxidase p22^{phox} e gp91^{phox} já descritas em exossomos (JANISZEWSKI et al, 2004), este trabalho procurou caracterizar a presença de outras enzimas relacionadas ao estresse oxidativo em amostras de exossomos. Para a caracterização inicial do perfil eletroforético protéico dos exossomos foram realizados experimentos de separação por eletroforese com coloração pela técnica de Coomassie Blue. Estes resultados demonstraram que os exossomos são compostos predominantemente por bandas de proteínas com peso molecular compreendidos entre 20 KDa e 220 KDa (Fig. 5 **A**), embora, como esperado, a proporção relativa das bandas seja variável entre diferentes pacientes. A análise por Western blotting detectou a presença, em diferentes pacientes, de dissulfeto isomerase protéica (PDI), como uma banda em torno de 55 KDa. PDI é uma chaperona do RE associada com a regulação e atividade da NAD(P)H oxidase (JANISZEWSKI et al, 2003) (Fig.5 **B**). Por outro lado, a realização de repetidos experimentos com exossomos oriundos de diferentes pacientes foi incapaz de identificar a presença de NOS (em nenhuma de suas isoformas), ou ainda SOD (nas formas extracelular ou cobre-zinco) (Fig. 6 **A e B**).

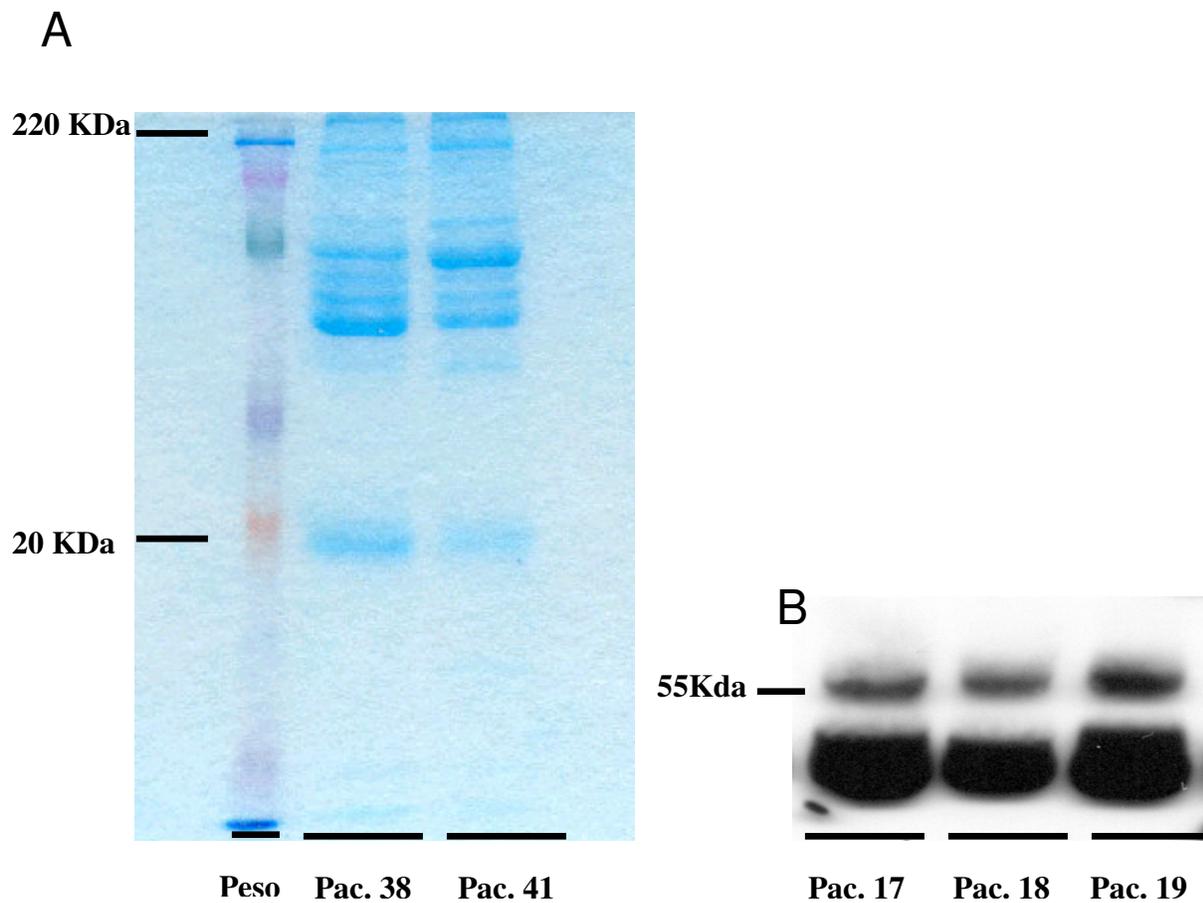


Fig. 5. **A.** SDS-PAGE de amostras de exossomos oriundos de plaquetas de pacientes sépticos. Foram aplicados 15 μ g de proteína em cada trilha e após a corrida, o gel foi corado com solução de Coomassie Blue. **B.** Western blotting para PDI. Amostras de exossomos de pacientes sépticos correspondentes a 15 μ g de proteína foram aplicadas em cada trilha e hibridizadas com anticorpo monoclonal anti-PDI (murino anti-humano 1:1000), seguido de anticorpo secundário policlonal de coelho anti-murino (1:2000).

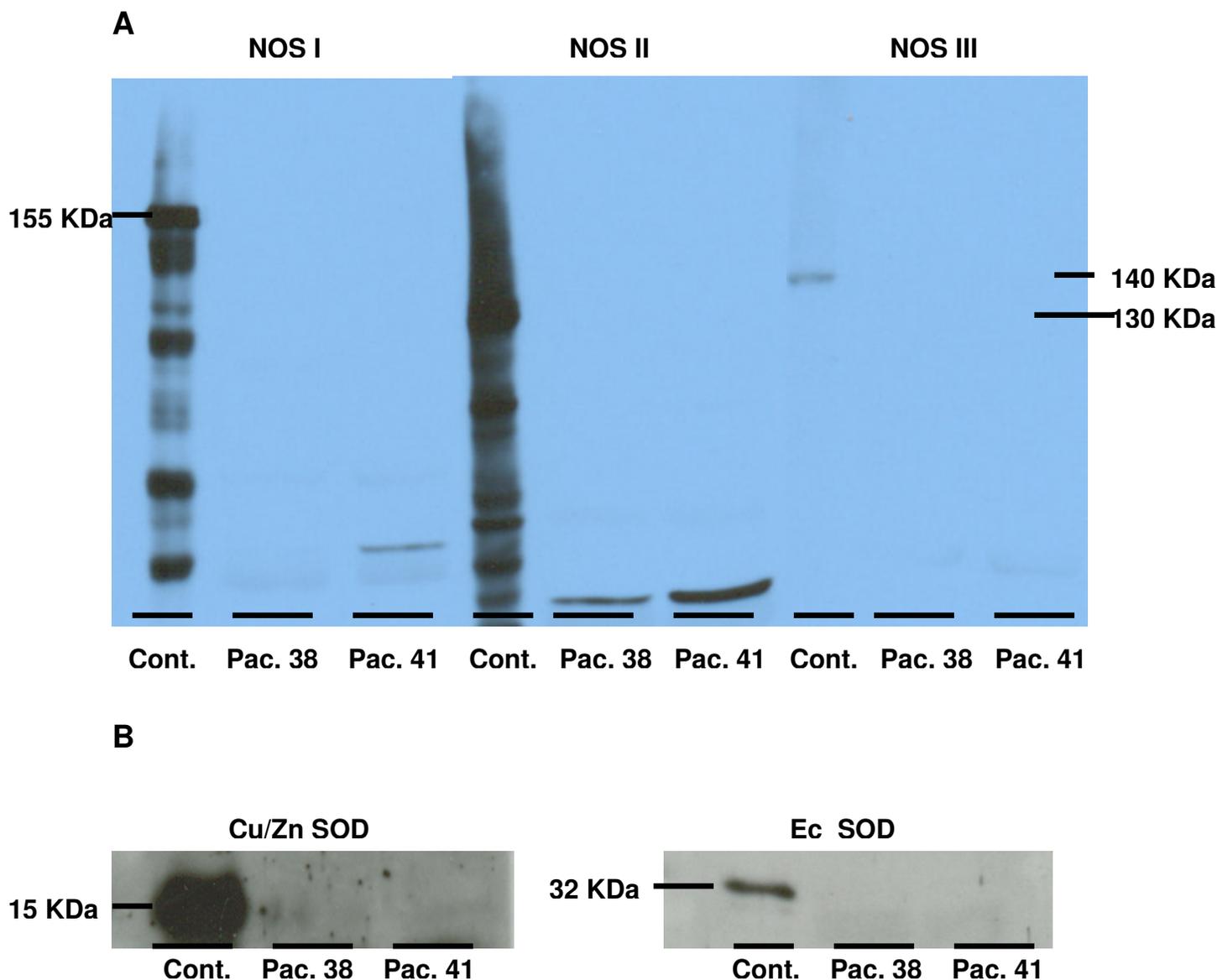


Fig. 6. **A.** Western blotting para NOS. Amostras de exossomos de pacientes sépticos correspondentes a 15 μ g de proteína foram aplicadas em cada trilha e hibridizadas com anticorpo monoclonal murino anti-humano para NOS I, II e III (1:1000), seguido de anticorpo secundário policlonal de ovelha anti-murino (1:2000). **B.** Western blotting para SOD. Amostras de exossomos de pacientes sépticos correspondentes a 15 μ g de proteína foram aplicadas em cada trilha e hibridizadas com anticorpos policlonais para ecSOD (cabra anti-humano) e CuZn SOD (ovelha anti-humano) 1:1000, seguido de anticorpo secundário policlonal de mula anti-cabra e coelho anti-ovelha (1:2000).

5.2.4. Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC)

Por análise de HPLC associada a detecção eletroquímica, não foi verificada a presença de glutathiona-reduzida (GSH) e oxidada em níveis detectáveis (limite de detecção: femtomoles) nos exossomos de pacientes sépticos ou controles saudáveis, mesmo em presença de glutathiona redutase (0.6 U/ml)/NADPH (2 mg/ml) (n=5).

Por outro lado, o cromatograma de HPLC em amostras de exossomos revelou dois picos, sendo o último provavelmente correspondente ao urato (Fig. 7 **A** e **B**). Nessas condições, a quantidade total de ácido úrico foi de aproximadamente 20 nM. Exossomos de pacientes sépticos e controles saudáveis tinham aproximadamente a mesma quantidade de urato, que estava presente em todas as amostras testadas (n=5). O pico 1 apresenta mesmo espectro de UV-visível que o urato (Fig 7, inserção) e pode representar algum produto de oxidação do urato ainda não identificado. Contudo, em experimentos controle, verificou-se que não devem corresponder a alantoína ou ao ácido oxônico, produtos comuns da oxidação do urato por sistemas oxidantes como peroxidase, reagentes de Fenton e derivados do peroxinitrito (SANTOS et al, 1999). Apesar da forte evidência da presença de urato, esses dados necessitam de confirmação por espectrometria de massa.

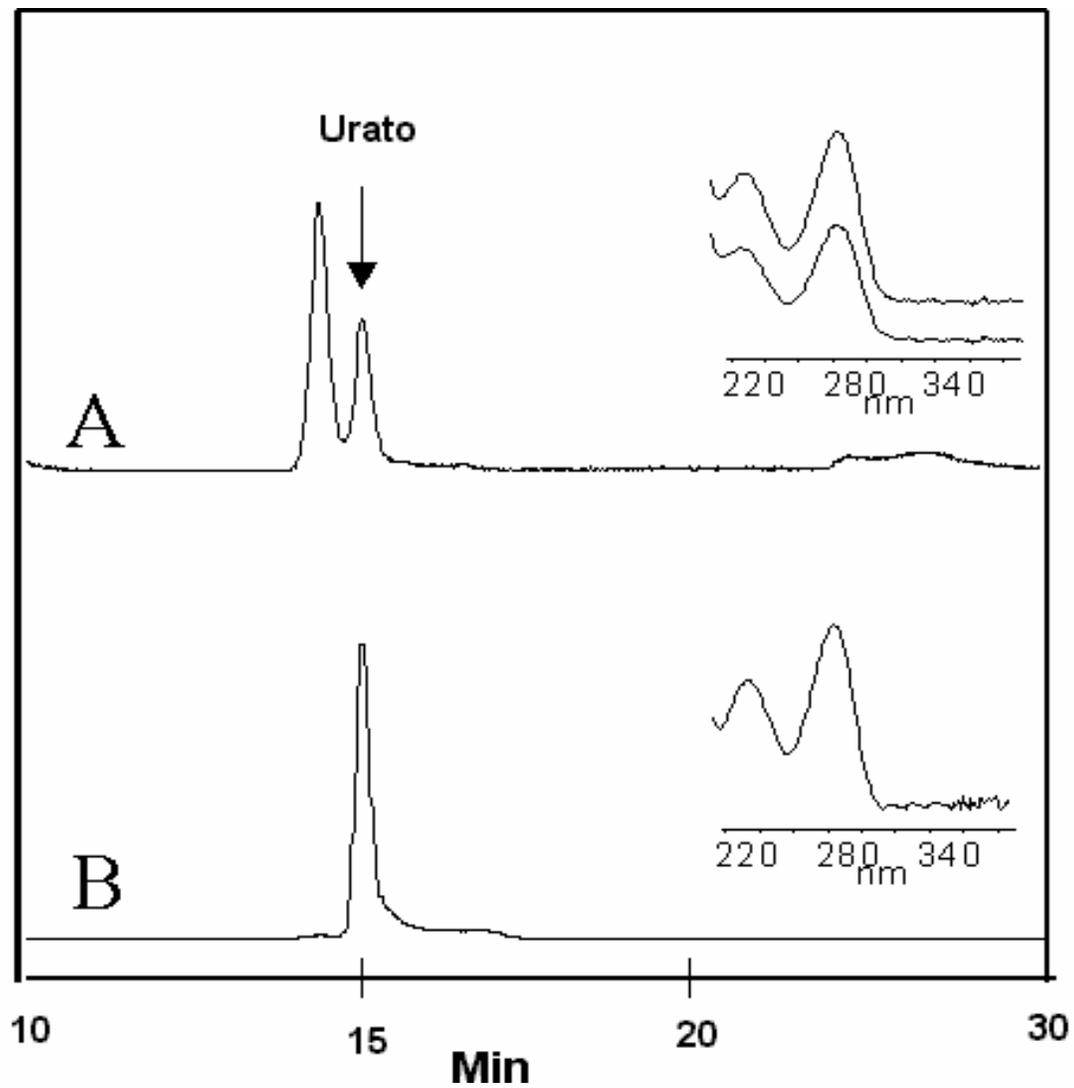


Fig. 7. Cromatogramas representativos da separação por HPLC de Urato (λ 280 nm) presente em exossomos. **A** amostra de exossomos; **B** padrão autêntico de urato (50 nM). A inserção mostra os espectros de UV-visível das amostras correspondentes.

5.2.5 Quantificação de óxidos de nitrogênio nos exossomos

Amostras de exossomos de pacientes sépticos apresentavam quantidades de nitrato em torno de $26,1 \pm 8,5$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína de exossomos (n=4).

A medida da concentração de nitrito em amostra de exossomos de pacientes sépticos (n=7) ou de controles saudáveis (n=4) por quimioluminescência foi incapaz de detectar quantidades mensuráveis de nitrito. O limite de detecção deste método para amostras líquidas é de $0,05$ μM .

5.3. Avaliação da Disfunção Cardiovascular Induzida pelos Exossomos

5.3.1. Efeito dos exossomos sobre corações isolados de coelho

A incubação em sistema fechado de uma concentração igual à metade da concentração plasmática de exossomos de pacientes sépticos induziu um aumento da frequência cardíaca estatisticamente significante 5 minutos após a incubação que se manteve durante todo o período em que houve circulação dos exossomos no sistema (Fig. 8). Após lavagem, documentou-se uma queda da

freqüência cardíaca a níveis próximos dos anteriores. A incubação de corações isolados com exossomos de controles saudáveis na mesma concentração induziu um aumento não significativo no número de batimentos por minuto que voltou ao normal após lavagem do sistema.

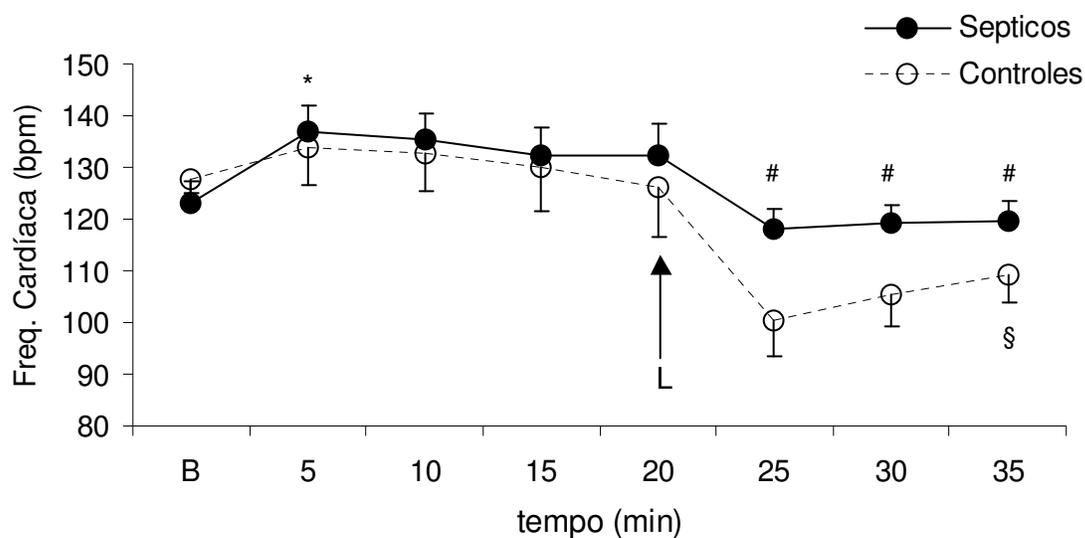


Fig. 8. Curso temporal da freqüência cardíaca em corações isolados após infusão de exossomos. Os valores representam a média \pm EPM de $n=9$ experimentos para exossomos de pacientes sépticos e $n=5$ para exossomos de controles saudáveis. * $p<0,05$ vs basal, # $p<0,05$ vs sépticos 5 min (ANOVA para medidas repetidas – teste Tukey); § $p<0,05$ vs controles 5 min (ANOVA para medidas repetidas – teste Tukey). B = basal, L= lavagem.

A incubação com exossomos de pacientes sépticos induziu um decréscimo constante nos percentuais das derivadas positiva (+dp/dt) e negativa (-dp/dt) da pressão ventricular (Figs. 9 e 10), o qual atingiu significância estatística após 10 minutos e se manteve em queda durante todo o período em que houve contato dos exossomos com a preparação de coração isolado. A redução percentual da derivada negativa foi ainda maior do que a verificada com a derivada positiva, o que identifica um possível efeito depressor dos exossomos no relaxamento ventricular. Por outro lado, a incubação com exossomos derivados de plaquetas de indivíduos sãos não ocasionou redução percentual estatisticamente significativa nos valores de dp/dt positiva e negativa, quando comparados aos percentuais basais e aos obtidos com exossomos derivados de indivíduos sépticos.

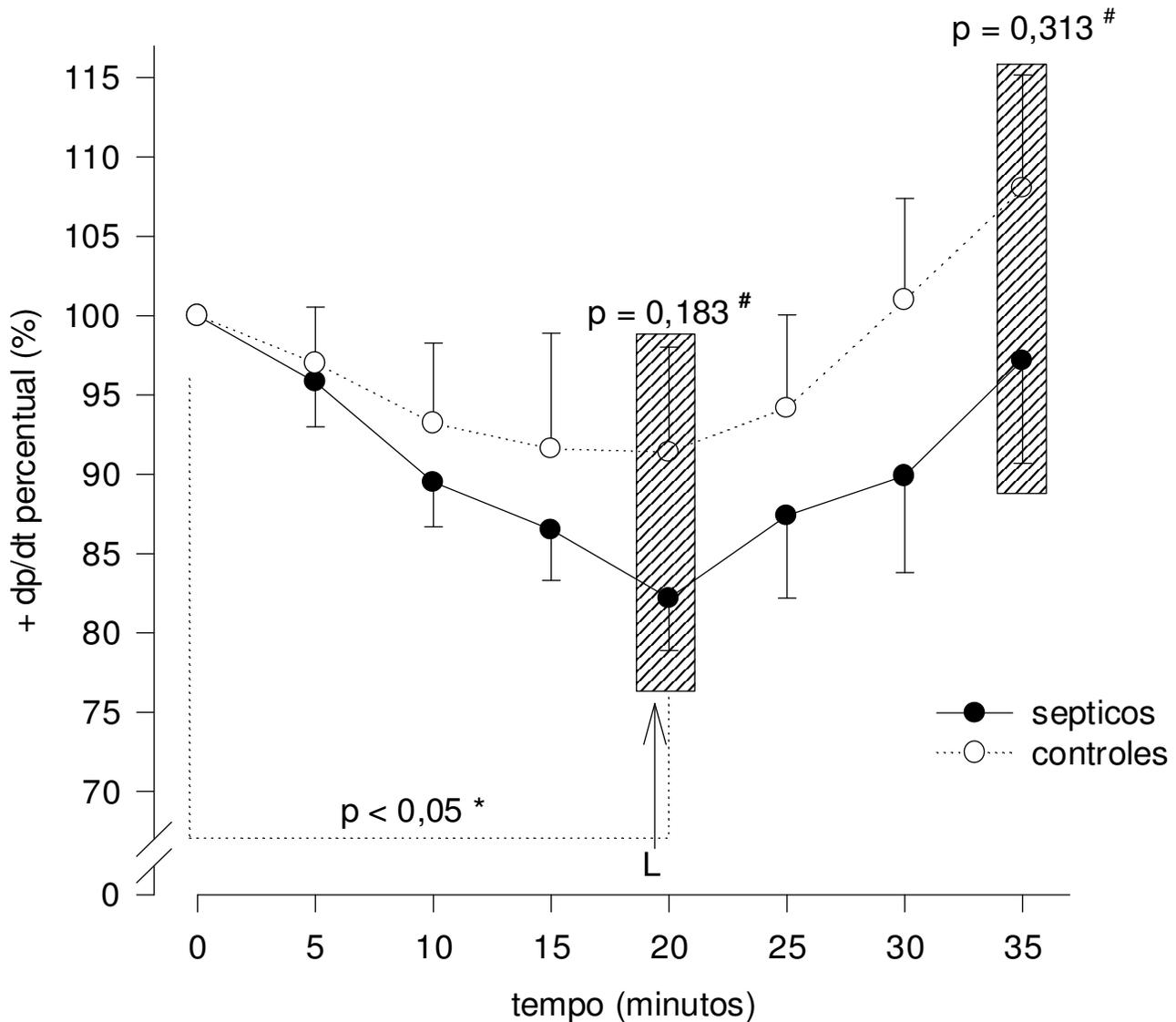


Fig. 9. Evolução temporal da variação percentual da derivada positiva da pressão ventricular esquerda em corações isolados após infusão de exossomos de pacientes sépticos e controles saudáveis. Os valores representam a média \pm EPM de $n=9$ experimentos para exossomos de pacientes sépticos e $n=5$ para exossomos de controles saudáveis. * ANOVA para medidas repetidas – teste Tukey; # teste-t. L= lavagem.

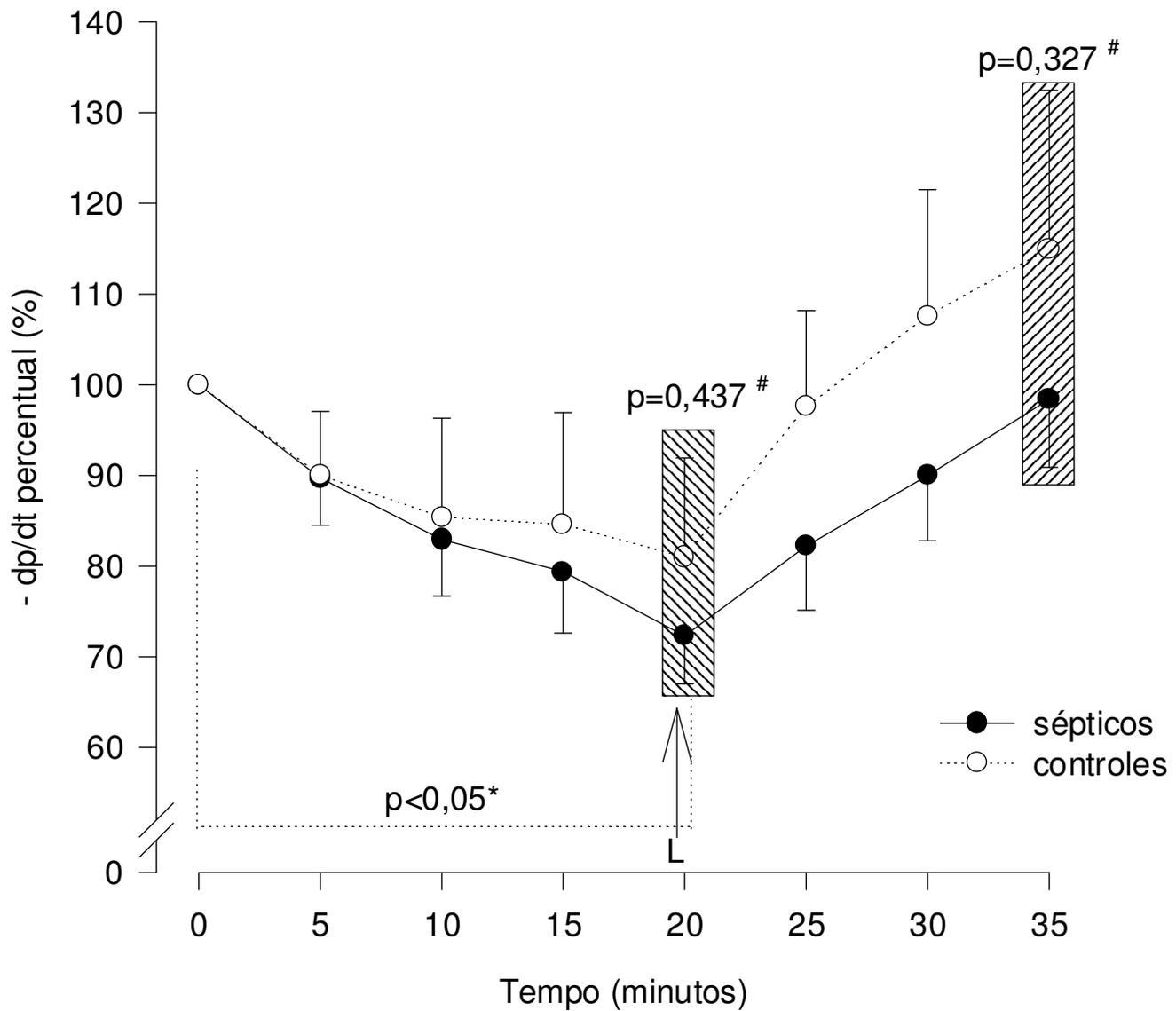


Fig. 10. Curso temporal da variação percentual da derivada negativa da pressão ventricular esquerda em corações isolados após infusão de exossomos de pacientes sépticos e controles saudáveis. Os valores representam a média \pm EPM de $n=9$ experimentos para exossomos de pacientes sépticos e $n=5$ para exossomos de controles saudáveis. * ANOVA para medidas repetidas – teste Tukey; # teste-t. L= lavagem.

5.3.2. Efeito dos exossomos em animais endotoxêmicos

Coelhos tornados endotoxêmicos pela administração de lipopolissacarídeo (1 mg/kg EV) foram sacrificados para avaliar o efeito dos exossomos em um modelo mais similar à sepse humana. Todos os animais tiveram efeitos característicos da infusão de LPS (letargia, febre). Em média, os valores de dp/dt obtidos dos corações isolados destes animais foram entre 30 e 40% menores que os obtidos em preparações de Langendorff de coelhos previamente normais, indicando assim que esses animais já apresentavam um certo grau de disfunção miocárdica induzido pela endotoxemia *per se*. Independentemente dos valores basais, a infusão de exossomos de pacientes sépticos em concentração equivalente à metade da plasmática induziu um decréscimo ainda maior e estatisticamente significativo das dp/dt positiva e negativa, quando comparadas aos valores pré-infusão e aos valores obtidos em preparações de corações isolados de animais normais (Figs. 11 e 12). Tal resultado pode indicar que, em tecido miocárdico com sistemas enzimáticos previamente ativado, os exossomos têm um efeito na redução da contratilidade ainda mais exacerbado.

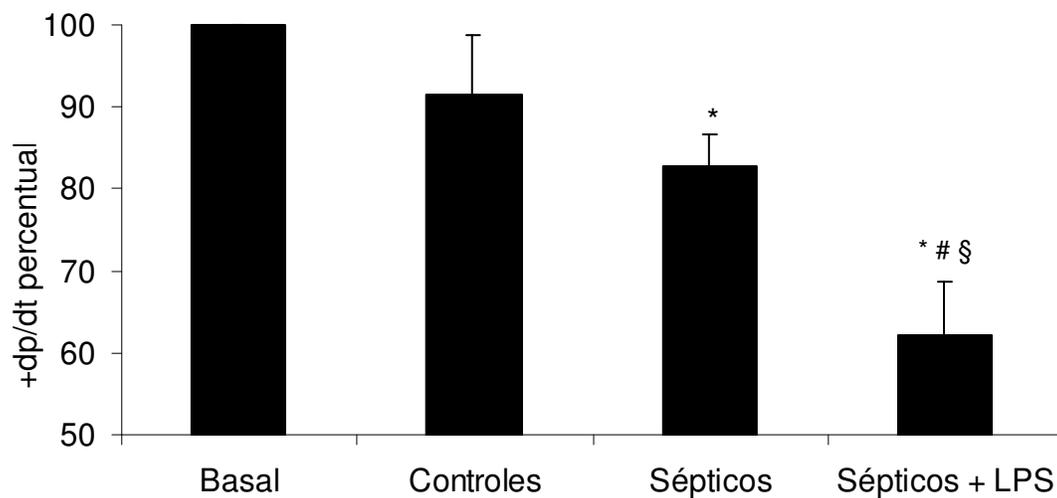


Fig. 11. Efeito da infusão de exossomos na derivada positiva da pressão ventricular em animais endotoxêmicos. Os valores representam a média \pm EPM de $n=9$ experimentos para exossomos de pacientes sépticos, $n=5$ para exossomos de controles, $n=4$ para exossomos de pacientes sépticos + LPS prévio. * $p<0,05$ vs basal (ANOVA para medidas repetidas – teste Tukey); # $p<0,05$ vs controles (teste-t); § $p<0,05$ vs sépticos (teste-t).

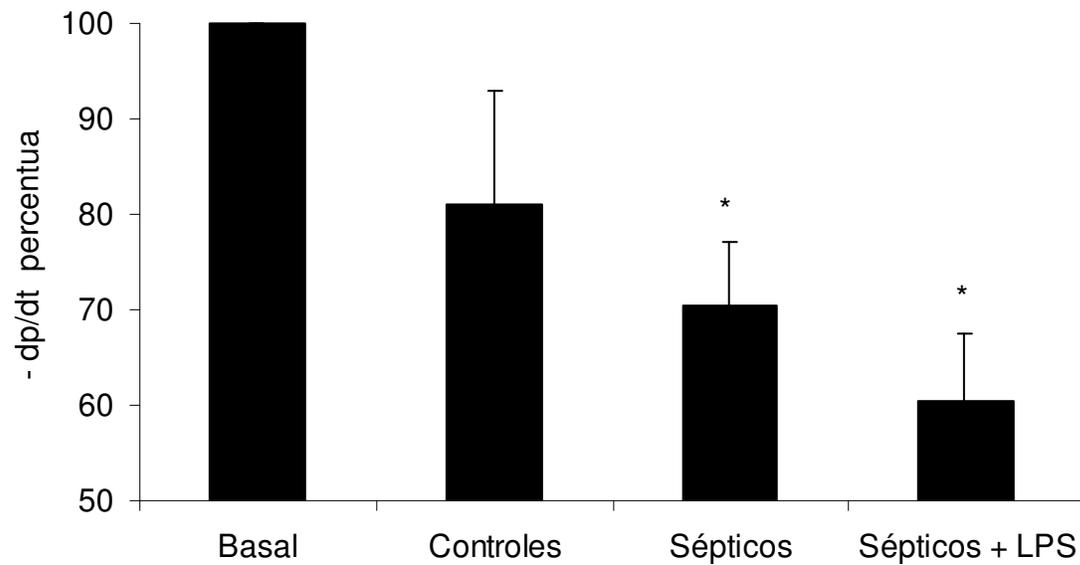


Fig. 12. Efeito da infusão de exossomos na derivada negativa da pressão ventricular em animais endotoxêmicos. Os valores representam a média \pm EPM de $n=9$ experimentos para exossomos de pacientes sépticos, $n=5$ para exossomos de controles, $n=4$ para exossomos de pacientes sépticos + LPS prévio. * $p<0,05$ vs basal (ANOVA para medidas repetidas – teste Tukey).

5.3.3. Efeito dos inibidores sobre a disfunção induzida por exossomos

Com o objetivo de tentar identificar o mecanismo pelo qual os exossomos induzem redução da contratilidade, preparações de coração isolado de coelhos foram pré-incubadas por 20 minutos com diversos inibidores de espécies reativas de oxigênio (Figs. 13 e 14). A incubação com um doador de grupos tióis reduzidos (NAC) foi incapaz de bloquear a redução da contratilidade vista com exossomos de pacientes sépticos. Do mesmo modo, a administração de DTNB, um oxidante de grupos tiol com propriedades inibidoras da PDI foi incapaz de bloquear os efeitos inibitórios dos exossomos nas dp/dt positiva e negativa. Por outro lado, a incubação com apocinina, um inibidor da ativação da NAD(P)H oxidase (por inibir a ligação do p47^{phox} à subunidade de membrana), induziu uma redução ainda maior na dp/dt positiva e negativa, de forma estatisticamente significativa na dp/dt positiva. Tal fenômeno não parece refletir efeito direto do composto, pois não foi observada alteração da contratilidade durante o período de pré-incubação sem os exossomos. Postulamos que este efeito decorre de aumento na disponibilização de NO, ao bloquear a produção de superóxido. Entretanto, a incubação de corações isolados com LNMMA não foi capaz de bloquear o efeito dos exossomos. Tal resultado, todavia, deve ser visto com cautela, pois foi observado um efeito direto do LNMMA sobre a contratilidade miocárdica na ausência de exossomos (durante o período de pré-incubação).

Os outros inibidores testados (DPI, indometacina), não tiveram efeito em bloquear o efeito inotrópico negativo mediado pelos exossomos.

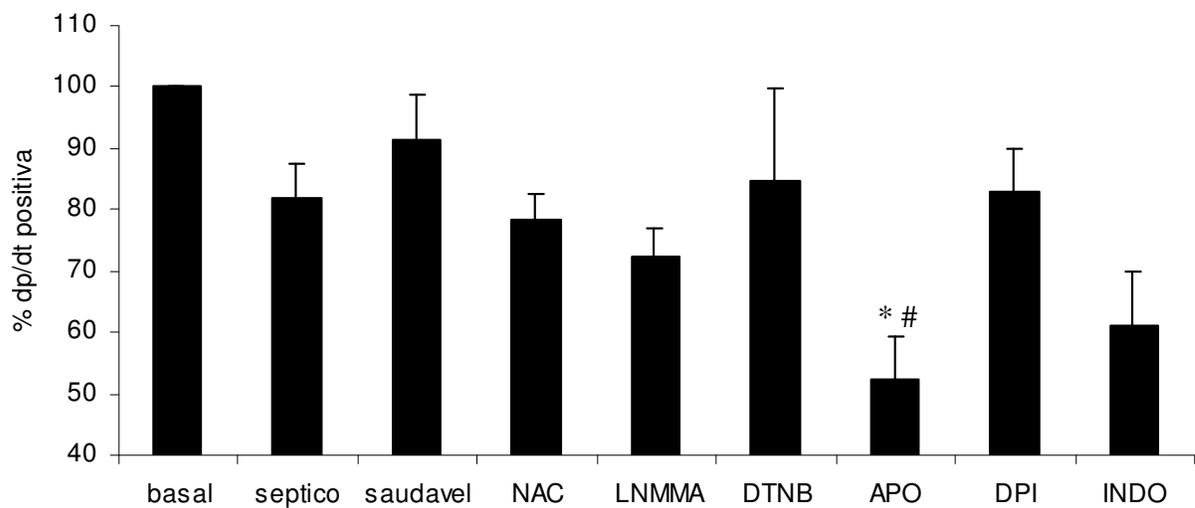


Fig. 13. Efeitos dos inibidores sobre a variação percentual máxima da dp/dt positiva. Os valores representam a média \pm EPM de n=9 experimentos para exossomos de pacientes sépticos, n=5 para controles saudáveis, n=4 para LNMMA, n=4 para NAC, n=3 para apocinina (APO), n=4 para DTNB, n=4 para DPI e n=3 para indometacina (INDO). * p=0,008 vs séptico (teste-t); # p=0,009 vs saudável (teste-t).

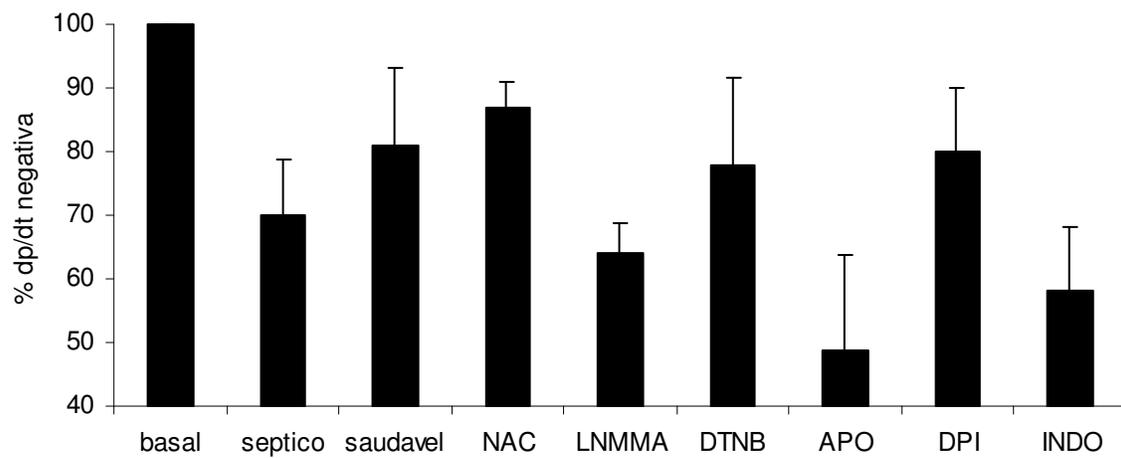


Fig. 14. Efeitos dos inibidores sobre a variação percentual máxima da dp/dt negativa. Os valores representam a média \pm EPM de n=9 experimentos para exossomos de pacientes sépticos, n=5 para controles saudáveis, n=4 para LNMMA, n=4 para NAC, n=3 para apocinina (APO), n=4 para DTNB, n=4 para DPI e n=3 para indometacina (INDO).

5.3.4. Efeito dos exossomos sobre músculos papilares isolados de rato

A incubação de preparações de músculo papilar isolado em regime de tensão isométrica máxima com exossomos de pacientes sépticos numa concentração equivalente à metade da plasmática induziu um decréscimo estatisticamente significativo nos valores da tensão desenvolvida e na derivada positiva da tensão desenvolvida pelos músculos papilares (Figs. 15 e 16). Por outro lado, os valores de tensão de repouso e da derivada negativa da tensão desenvolvida não foram afetados pelos exossomos (Figs. 17 e 18). Da mesma forma, a incubação com exossomos provenientes de indivíduos saudáveis não foi capaz de induzir alterações em quaisquer das variáveis associadas com as tensões desenvolvidas pelos músculos papilares. Já em relação ao TPT e TR50, a despeito de uma considerável variabilidade nos valores pré-incubação, o contato com os exossomos, quer de pacientes sépticos ou de controles normais, não afetou o TPT e induziu uma diminuição estatisticamente significativa no TR50 (tabela 4).

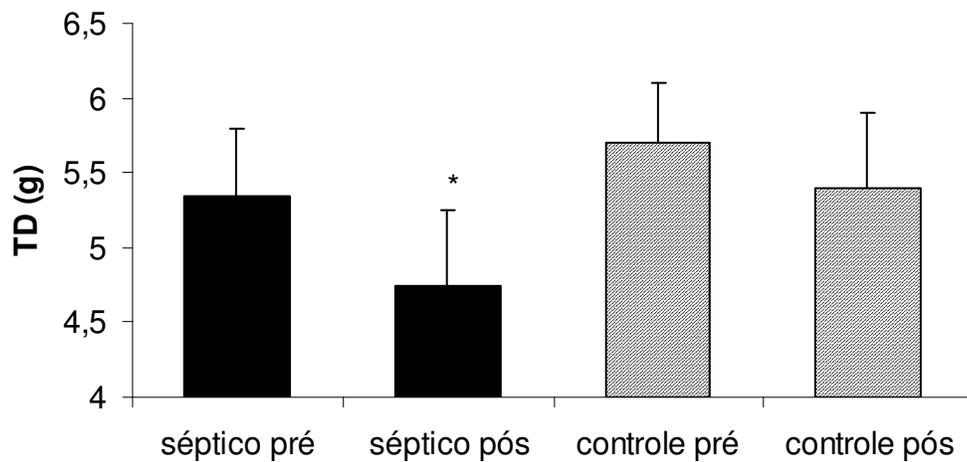


Fig. 15. Efeito da incubação de exossomos sobre a tensão desenvolvida de músculos papilares isolados de ratos. Os valores representam a média \pm EPM de $n=8$ experimentos para músculos pré e pós exossomos de pacientes sépticos e $n=4$ para músculos pré e pós exossomos de indivíduos controles. * $p=0,009$ vs séptico pré (teste t emparelhado).

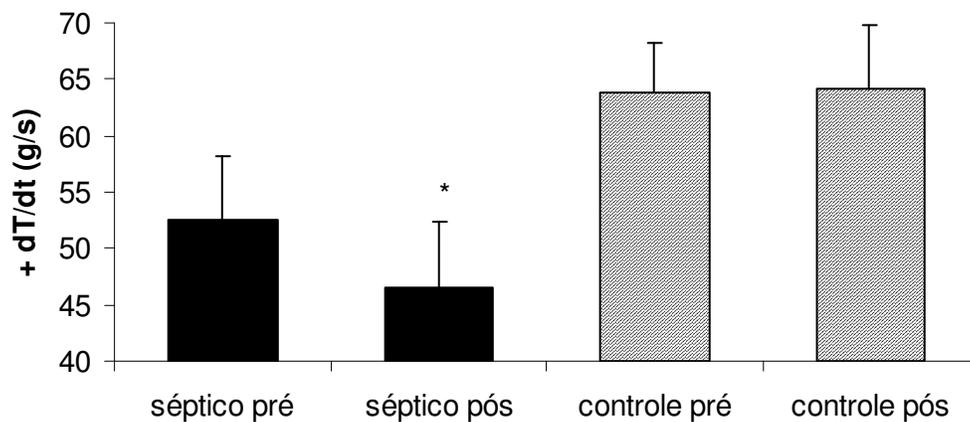


Fig. 16. Efeito da incubação de exossomos sobre a derivada positiva da tensão desenvolvida de músculos papilares isolados de ratos. Os valores representam a média \pm EPM de $n=8$ experimentos para músculos pré e pós exossomos de pacientes sépticos e $n=4$ para músculos pré e pós exossomos de indivíduos controles. * $p=0,019$ vs séptico pré (teste t emparelhado).

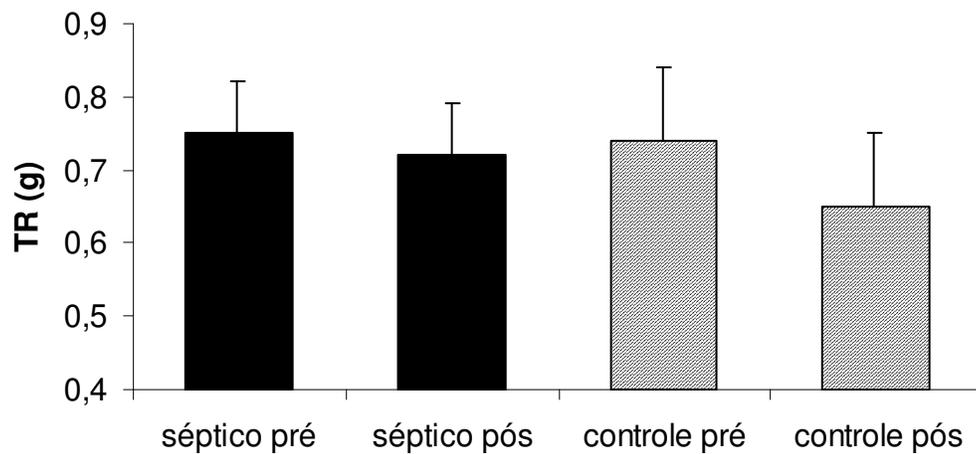


Fig. 17. Efeito da incubação de exossomos sobre a tensão de repouso de músculos papilares isolados de ratos. Os valores representam a média \pm EPM de $n=8$ experimentos para músculos pré e pós exossomos de pacientes sépticos e $n=4$ para músculos pré e pós exossomos de indivíduos controles.

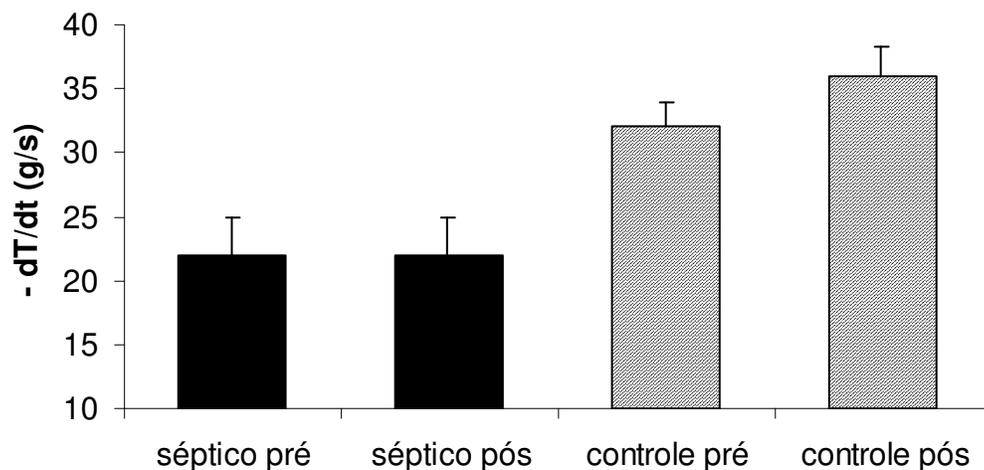


Fig. 18. Efeito da incubação de exossomos sobre a derivada negativa da tensão desenvolvida de músculos papilares. Os valores representam a média \pm EPM de $n=8$ experimentos para músculos pré e pós exossomos de pacientes sépticos e $n=4$ para músculos pré e pós exossomos de indivíduos controles.

Tabela 4. Efeito dos exossomos sobre o tempo para atingir a tensão de pico (TPT) e tempo para relaxar 50% da tensão máxima (TR50).

Variáveis	Sépticos	Controles
TPT pré (mseg)	190,6 ± 16,4	161,2 ± 3,7
TPT pós (mseg)	193,1 ± 14	148,7 ± 7,1
TR50 pré (mseg)	203,7 ± 27,9	125 ± 5,4
TR50 pós (mseg)	167,5 ± 23,3 *	107,5 ± 7,5 *

Os valores representam a média ± EPM de n=8 experimentos para músculos papilares pré e pós exossomos de pacientes sépticos e n=4 para músculos pré e pós exossomos indivíduos controles. * p<0,05 vs TR50 pré (teste t emparelhado).

5.3.5. Efeito dos exossomos sobre a reatividade vascular

Exossomos de pacientes e controles numa concentração igual à plasmática foram incubados em preparações de aorta isolada de ratos. Nestes experimentos, os exossomos de pacientes sépticos foram incubados previamente (1 hora antes do início) ou imediatamente antes do início do período de contração vascular. Os exossomos de controles saudáveis foram incubados apenas uma hora antes do procedimento. De uma forma geral, não houve efeito da preparação de exossomos sobre o vaso isolado, nem em termos de contratilidade mediada por norepinefrina nem de relaxamento vascular mediado por acetilcolina,

considerando-se tanto exossomos de pacientes sépticos (pré ou imediatamente incubados) quanto exossomos de controles saudáveis (Figs. 19 e 20).

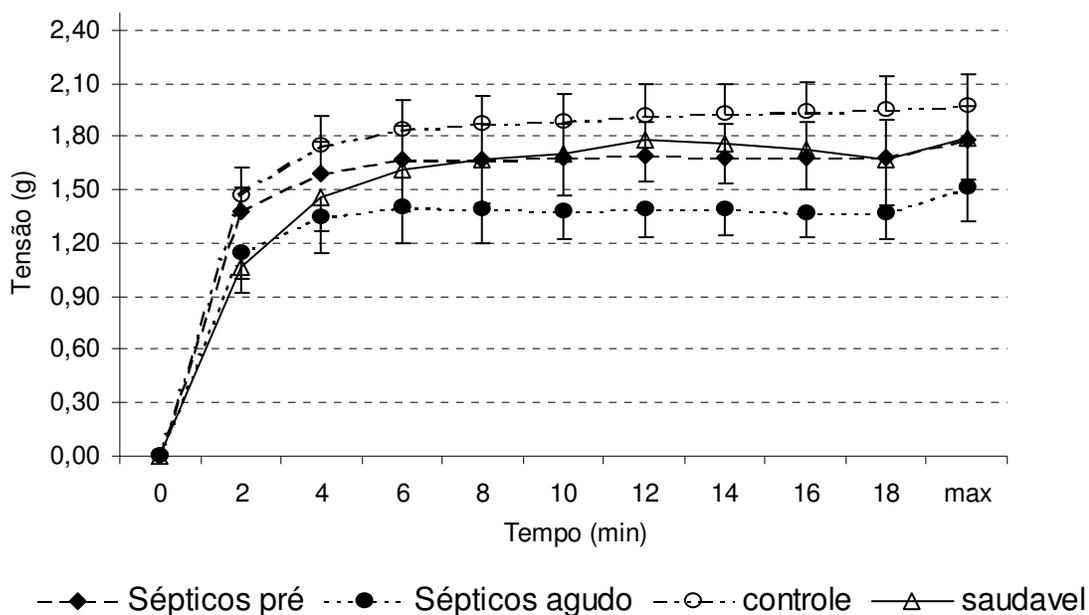


Fig. 19. Efeito da incubação de exossomos sobre a contratilidade vascular induzida por norepinefrina (10^{-7} M) em vasos isolados de ratos. Os valores representam a tensão desenvolvida em média \pm EPM de n=6 para exossomos de pacientes sépticos pré-incubados 1 hora antes (sépticos pré), n=5 para exossomos de pacientes sépticos incubados de forma aguda (sépticos agudo), n=4 para exossomos de indivíduos saudáveis (saudável) e n=6 para vasos controle (sem exossomos).

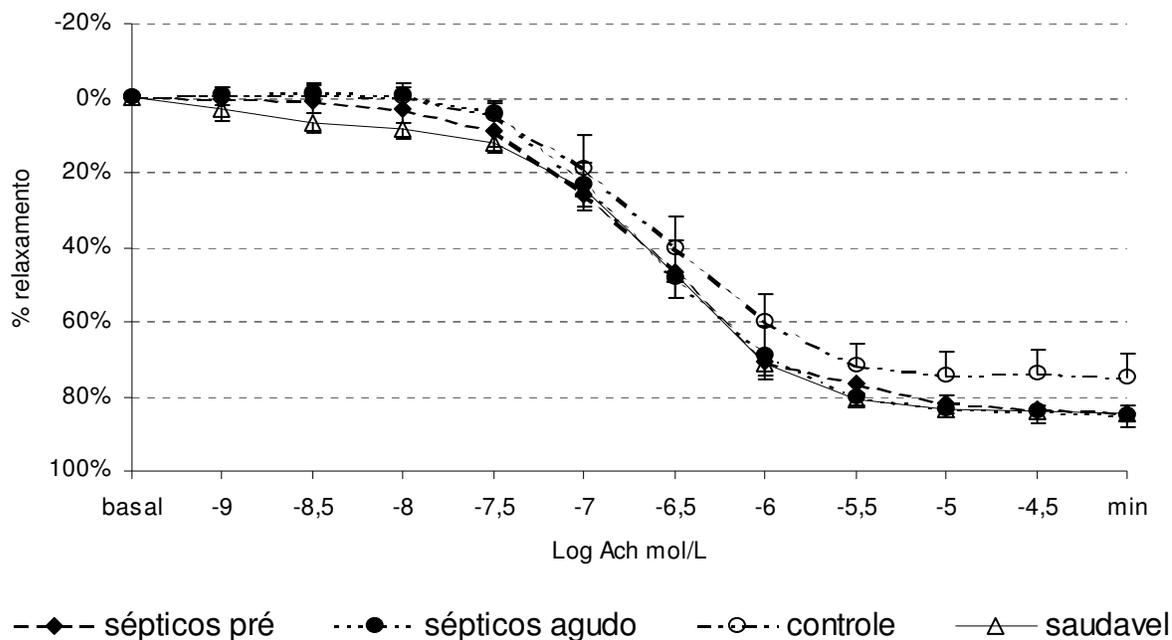


Fig. 20. Efeito da incubação de exossomos sobre o relaxamento vascular induzido por concentrações crescentes de acetilcolina em vasos isolados de ratos. Os valores representam o percentual de relaxamento em média \pm EPM de $n=6$ para exossomos de pacientes sépticos pré-incubados 1 hora antes (sépticos pré), $n=5$ para exossomos de pacientes sépticos incubados de forma aguda (sépticos agudo), $n=4$ para exossomos de indivíduos saudáveis (saudável) e $n=6$ para vasos controle (sem exossomos).

5.3.6. Quantificação de óxidos de nitrogênio em tecido miocárdico

A produção de nitrato pelo miocárdio após exposição a exossomos de pacientes sépticos por 45 minutos é significativamente maior do que a geração de nitrato associada à incubação com exossomos provenientes de voluntários saudáveis, indicando assim que os exossomos de pacientes sépticos induzem um aumento da geração de NO pelo miocárdio (Fig. 21).

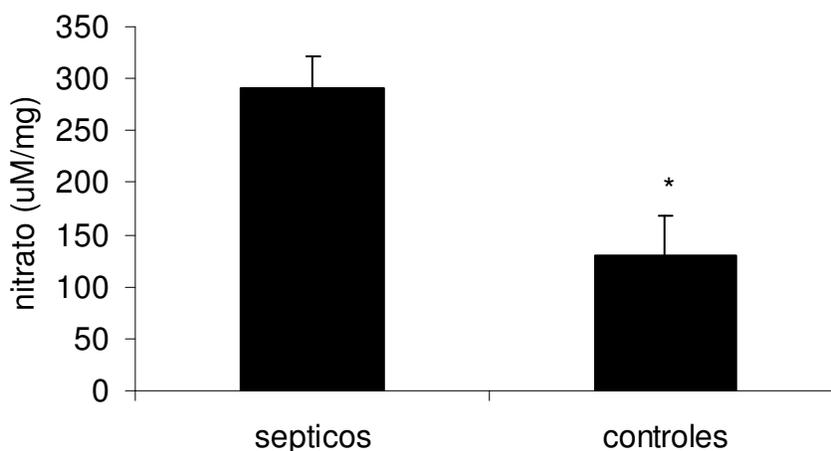


Fig. 21. Quantificação de nitrato miocárdico após incubação com exossomos de pacientes sépticos e controles saudáveis. Os valores representam a média \pm EPM de $n=4$ experimentos para exossomos de pacientes sépticos e indivíduos controle. * $p=0,019$ vs sépticos (teste t).

Em relação à quantificação de nitrito, em três das quatro amostras de miocárdio incubado com exossomos de controles saudáveis, a concentração ficou

abaixo do limite de detecção do método ($0,05\mu\text{M}$), o que impossibilitou a realização de análise estatística. Na única amostra acima do limite de detecção, a concentração de nitrito foi de $17\ \mu\text{M}/\text{mg}$, ao passo que todas as amostras de miocárdio incubadas com exossomos de pacientes sépticos geraram quantidades de nitrito acima do limite de detecção, com média de $25,0\pm 10,2\ \mu\text{M}/\text{mg}$.

6. Discussão

6.1. Caracterização dos exossomos oriundos de pacientes sépticos

Em conjunto com o estudo previamente realizado em nosso laboratório (JANISZEWSKI et al, 2004), a presente investigação permitiu caracterizar adicionalmente os exossomos de pacientes sépticos quanto ao potencial indutor de estresse oxidativo. Inicialmente, a análise por microscopia eletrônica indicou a presença de numerosas partículas de tamanhos compatíveis com os dados prévios da literatura, que se referiam aos exossomos como possuindo diâmetro em torno de 100 nm. Adicionalmente, pudemos observar em nossa preparação uma pequena quantidade de partículas de tamanho acima da descrição habitual de exossomos (em torno de 150 nm). Tais micropartículas poderiam ser derivadas de membrana e ter composição e características diferentes dos exossomos. De todo modo, experimentos com espalhamento de luz laser com exossomos obtidos de forma exatamente igual a este estudo demonstraram que a grande maioria das partículas tem diâmetro entre 82 e 112 nm, o que permite afirmar que o “pellet” obtido nestes experimentos é rico em exossomos e que a presença de micropartículas é provavelmente insignificante, considerando que a caracterização previamente realizada não identificou nenhuma das características de micropartículas em nossas amostras (JANISZEWSKI et al, 2004).

Nossos dados indicaram que exossomos de pacientes sépticos apresentam várias proteínas de pesos moleculares diferentes, variando entre 20 e 220 KDa. Da mesma forma, a análise de exossomos provenientes de células dendríticas identificou bandas protéicas entre 17 KDa e 200 KDa (THERY et al, 1999), demonstrando assim que os exossomos apresentam proteínas de pesos moleculares diversos e com uma distribuição similar nos diferentes tipos celulares a partir dos quais são produzidos.

Os experimentos de Western blotting evidenciaram, em amostras de exossomos de pacientes sépticos, a presença de uma banda de cerca de 55KDa que pode corresponder à PDI. A PDI é uma chaperona presente no RE liso de diversos tipos celulares e na membrana plasmática de células musculares lisas vasculares e células endoteliais (JANISZWESKI et al, 2003). Enquanto no RE esta enzima está associada ao dobramento de proteínas produzidas localmente, em células endoteliais a PDI já foi descrita como sendo um fator protetor na vigência de hipoxia celular (SULLIVAN et al, 2003). Um estudo prévio de nosso laboratório demonstrou a correlação funcional e a co-localização celular entre a PDI e a NAD(P)H oxidase vascular, caracterizando então a isomerase como uma enzima reguladora da atividade NAD(P)H oxidase vascular (JANISZEWSKI et al, 2003).

Nos exossomos derivados de indivíduos sépticos, a presença de PDI e dos componentes da NAD(P)H oxidase p22^{phox} e gp91^{phox} demonstrados no estudo anterior, sugere que as duas enzimas podem estar em associação funcional na membrana. Desta forma, a PDI pode interagir de algum modo com o efeito pró-apoptótico em células endoteliais e musculares lisas mediado pela NAD(P)H oxidase, o qual é bloqueado por inibidores da oxidase como DPI, bem como por

seqüestradores de radical superóxido como SOD (JANISZEWSKI et al, 2004). De todo modo, a disfunção cardiovascular demonstrada neste estudo não parece ser mediada pela NAD(P)H oxidase nem pela PDI, visto que os inibidores dessas enzimas foram incapazes de reduzir o efeito depressor da contratilidade nas preparações de coração isolado de coelhos.

Em plaquetas, a PDI está presente em quantidades significantes. Este dado torna-se de interesse muito maior quando se sabe que estes fragmentos celulares não dispõem de RE, de tal maneira que a PDI plaquetária está provavelmente associada a funções diferentes da enzima presente no RE (CHEN et al, 1995). De fato, os estudos em plaquetas identificam a PDI como enzima necessária para adesão plaquetária pela via das integrinas, mais especificamente via integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ (glicoproteína IIb/IIIa), pois a PDI catalisa a formação de pontes dissulfeto necessária para ativação desta glicoproteína (LAHAV et al, 2002). Nos exossomos, a isomerase poderia também estar envolvida na adesão ao endotélio visto que, em exossomos de linfócitos B, o mecanismo de adesão a fibroblastos estimulados com TNF- α é mediado pelas integrinas β_1 e β_2 (CLAYTON et al, 2004), das quais, pelo menos a β_1 tem seu efeito adesivo em plaquetas mediado pela PDI (LAHAV et al, 2000).

Em amostras de exossomos de pacientes sépticos, não identificamos a presença de nenhuma das enzimas responsáveis pela produção de NO, bem como só conseguimos identificar a presença de nitrato e não de nitrito. Este achado pode refletir eventual contaminação com plasma apesar do cuidadoso procedimento de separação ou uma possível difusão do nitrato para o interior do

exossomo durante sua circulação no plasma. De todo modo, se o mecanismo do déficit inotrópico causado pelos exossomos tiver relação com NO, como o aumento no conteúdo de nitrato no miocárdio sugere, provavelmente sua produção deve ocorrer na célula alvo, uma vez que os exossomos aparentemente não possuem os complexos enzimáticos capazes de produzir esta espécie reativa.

A ausência de glutathiona e SOD nas amostras de exossomos, bem como a presença de urato corroboram e ampliam o conceito de que essas partículas exercem certas funções especializadas ligadas à sinalização celular à distância por mecanismos redox. Um dado interessante é que os elementos redox-ativos nos exossomos parecem ser específicos, já que o seu recrutamento para o exossomo não parece ocorrer como uma amostra ao acaso do conteúdo celular e sim como uma seleção dirigida.

A presença de urato em amostras de exossomos pode indicar que essas partículas exibem atividade xantina-oxidase, a qual por sua vez poderia estar associada, além da NAD(P)H oxidase, à produção de EROs. Contudo, pelo menos em termos de indução de apoptose em células vasculares, o mecanismo parece não ser mediado por xantina-oxidase, visto que o bloqueio com oxipurinol não reduziu a produção de superóxido e os índices de apoptose (JANISZEWSKI et al, 2004). Entretanto, uma vez que plaquetas ativadas por trombina exibem atividade aumentada de xantina-oxidase (WACHOWICZ et al, 2002), uma condição altamente ativadora plaquetária como a sepse poderia associar-se à liberação de exossomos contendo xantina-oxidase e à indução de estresse oxidativo à distância.

6.2. Disfunção cardiovascular induzida pelos exossomos

Este estudo demonstrou, pela primeira vez, que exossomos oriundos de plaquetas de pacientes sépticos induzem depressão contrátil em preparações de coração isolado de coelhos e músculos papilares de ratos. O efeito dos exossomos é potencializado pela administração prévia de endotoxina e a presença de bloqueadores de EROs não inibe o efeito da partícula. O aumento dos metabólitos de NO no miocárdio após incubação com exossomos de pacientes sépticos pode indicar um papel desse radical no mecanismo da disfunção.

De acordo com os dados obtidos, a incubação com exossomos de pacientes sépticos induziu em poucos minutos um efeito depressor agudo na contratilidade cardíaca. Essa redução, particularmente no que diz respeito à derivada positiva da pressão ventricular, foi menor do que a observada na literatura em trabalhos onde são administrados LPS ou citocinas, nos quais a redução da contratilidade é de 50% ou mais (FERDINANDY et al, 2000, KHADOUR et al, 2002). Contudo, é importante salientar ainda que muitos desses estudos utilizam injeções *in vivo*, ou seja, submetem o coração a todo o estresse gerado pela liberação de mediadores no animal, ao passo que nosso estudo procurou apenas utilizar modelos *ex vivo*, onde não há influência neuro-humoral sobre os órgãos testados.

Em nossos experimentos de coração isolado, o efeito depressor dos exossomos sobre a derivada negativa da pressão ventricular foi maior do que

sobre a derivada positiva. A derivada negativa indica o período de relaxamento ventricular (OPIE, 1997), o que evidencia que os exossomos têm, em coração isolado, um efeito mais importante sobre o relaxamento do que sobre a contratilidade ventricular. Considerando-se que o período de relaxamento ventricular caracteriza-se pela entrada de cálcio no retículo sarcoplasmático após a contração (OPIE, 1997), é possível que esse efeito seja mediado pela inibição do retorno do cálcio ao retículo. Um fenômeno semelhante já foi descrito na endotoxemia em coelhos, onde ocorre retardo do retorno de cálcio na diástole (TAKEUCHI et al, 1999).

Por outro lado, é sabido que, em coração isolado, o efeito de qualquer agente sobre a contratilidade cardíaca depende de fatores como a frequência cardíaca, a pré e pós-carga e o fluxo sanguíneo coronariano (SUTHERLAND & HEARSE, 2000). Desta forma, o efeito dos exossomos poderia ser mediado por mecanismos diferentes de inibição pura da contratilidade. Por essa razão, optamos por realizar também experimentos onde o inotropismo cardíaco pudesse ser avaliado de forma mais direta, sem participação do fluxo coronariano e da frequência cardíaca. Assim, foram realizados experimentos com músculos papilares, onde identificamos um efeito depressor direto do exossomo sobre a contratilidade cardíaca (tensão desenvolvida e sua derivada temporal positiva). Nessa preparação, a tensão desenvolvida depende da intensidade ($+dT/dt$) e da duração (TPT) do estado ativo (HENDERSON et al, 1969). A incubação com exossomos de pacientes sépticos inibiu diretamente a intensidade da contração da fibra cardíaca, por seu efeito direto na derivada positiva, e não interferiu no intervalo de contração (TPT). Esses dados confirmam os resultados obtidos com a

dp/dt positiva no coração isolado. Entretanto, nos músculos papilares não foi observado o efeito de redução do relaxamento ventricular demonstrado no coração isolado. Os exossomos não alteraram a derivada negativa de tensão desenvolvida e, ao contrário do esperado, reduziram significativamente o TR50 em ambos os grupos testados, o que indica que houve redução do tempo de relaxamento ventricular. Tal disparidade pode dever-se a diferenças na preparação experimental, variabilidade inter-espécies ou mesmo a outros fatores que possam interferir no relaxamento ventricular no coração isolado.

Em animais previamente tornados endotoxêmicos, o efeito da infusão de exossomos é bem mais significativo. A redução da contratilidade nesses experimentos chegou próximo aos 40% em relação ao período pré-exossomo, valores esses que se aproximam dos observados em estudos com LPS e citocinas. É importante salientar ainda que esses animais apresentavam, por si só, um valor de dp/dt basal em torno de 60-70% de um animal normal, o que sugere que os efeitos dos exossomos somam-se aos induzidos pela endotoxemia *per se* na redução da contratilidade. Um estudo publicado recentemente pode ajudar a explicar essa amplificação do efeito (CLAYTON et al, 2004). Exossomos derivados de linfócitos-B foram avaliados em termos de adesão a fibroblastos em repouso ou ativados por TNF- α . Fibroblastos em repouso tinham muito menor capacidade de induzirem adesão dos exossomos, ao passo que as células ativadas expressavam maiores quantidades de moléculas de adesão (integrinas) e proporcionavam uma adesão em maior quantidade e mais forte dos exossomos (CLAYTON et al, 2004). O que observamos nos animais endotoxêmicos pode ser um efeito semelhante,

pois o LPS pode ter induzido um aumento da expressão de moléculas de adesão tipo integrinas nas células endoteliais, com conseqüente potencialização da adesão e dos efeitos dos exossomos. No estudo de CLAYTON et al (2004), a adesão dos exossomos à membrana plasmática dos fibroblastos foi tão firme que a tentativa de retirada das partículas com micropipetas freqüentemente resultava em ruptura da membrana celular.

Os experimentos com inibidores visavam identificar possíveis mecanismos associados à disfunção miocárdica. Embora o uso dos diversos bloqueadores testados não tenha permitido estabelecer-se a via da disfunção, esses experimentos foram importantes para excluírem vários mecanismos potencialmente envolvidos. Os experimentos com apocinina, nos quais houve uma maior redução da contratilidade comparada aos experimentos sem bloqueador, ou seja, houve uma potencialização do efeito pela droga, nos chamaram a atenção para a possibilidade de ser o NO o composto associado à disfunção miocárdica. Tal dado poderia ser explicado pelo efeito da apocinina sobre a NAD(P)H oxidase no qual, ao reduzir a produção de superóxido, permitiria o aumento da biodisponibilidade do NO e conseqüentemente seus efeitos negativos no inotropismo. Embora a ineficácia do LNMMA não corrobore essa afirmação, esses experimentos podem ter sido prejudicados por um efeito direto do LNMMA sobre o coração isolado, mesmo antes da infusão de exossomos. Este efeito já foi descrito previamente em estudos nos quais inibidores inespecíficos da NOS como LNMMA e mesmo bloqueadores da guanilato-ciclase solúvel como ODQ (1*H*-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-*a*]quinoxalina-1) induziram redução da contratilidade em corações isolados, provavelmente por vasoconstrição coronariana (TATSUMI et al,

2004). Assim, os resultados obtidos com LNMMA não permitem afastar definitivamente o NO como mediador da disfunção contrátil induzida pelos exossomos.

As propriedades do NO indicam que este radical é um bom candidato a mediador da disfunção miocárdica por exossomos. Forçosamente, a redução contrátil precoce, se mediada por NO, deve sê-lo por ativação da NOS III, visto que o intervalo entre a incubação com exossomos até o início da disfunção é muito curto para haver ativação da NOS II. O mecanismo associado à ativação da NOS III é dependente de aumento nas concentrações intracelulares de cálcio. Dados da literatura demonstram que, em fibroblastos, a adesão de exossomos de linfócitos B mediada por integrinas é capaz de induzir aumentos rápidos na concentração celular de cálcio (CLAYTON et al, 2004). Se esse fenômeno ocorrer também em exossomos derivados de plaquetas, tal efeito pode ser responsável pela ativação da NOS III e conseqüente produção de NO.

O aumento na produção dos metabólitos de NO no miocárdio após incubação de corações isolados com exossomos de pacientes sépticos é outro resultado que sugere a participação do óxido nítrico na disfunção. Dados semelhantes já foram obtidos em outros estudos (KHADOUR et al, 2002), contudo na maior parte das vezes esse aumento foi relacionado à atividade da NOS II, visto que o intervalo de tempo estudado era bem mais prolongado. Um efeito dos exossomos sobre a atividade da NOS II poderia justificar a potencialização dos efeitos depressores obtida nos corações isolados previamente expostos a LPS.

6.3. Limitações do Estudo

Algumas limitações devem ser consideradas na interpretação de nossos resultados. Primeiramente, apesar de termos utilizado concentrações fisiológicas de exossomos e termos mensurado a quantidade de proteínas presente em cada amostra, não foi efetivamente quantificado o número de exossomos presentes no plasma dos pacientes sépticos e dos controles. Tal processo envolveria a validação da metodologia com “cell sorter”, não disponível no momento em nosso laboratório. Entretanto, o uso de concentrações próximas às plasmáticas de exossomos nos leva a caracterizar o efeito das partículas como mais próximo do fisiológico. Além disso, tal procedimento efetivamente leva em conta que, em condições como sepse, o efeito das partículas recai não só no efeito inerente a cada exossomo, mas também na quantidade de partículas circulantes, a qual está aumentada na sepse, conforme demonstramos indiretamente nesse estudo pela quantificação de proteínas.

O fluxo coronariano não foi avaliado neste estudo, em razão de dificuldades técnicas na preparação de coração isolado. Tal dado seria importante para avaliar o efeito direto da partícula sobre a circulação coronária. Entretanto, os experimentos com músculo papilar isolado são compatíveis com um efeito direto dos exossomos no cardiomiócito. Da mesma forma, a ausência de efeito dos exossomos sobre a reatividade vascular em vasos isolados é um dado a mais para refutar um possível efeito dos exossomos na circulação coronariana.

Outro problema potencial é a possível contaminação da amostra com proteínas plasmáticas tais como citocinas e, conseqüentemente, o seu efeito no

inotropismo cardíaco. Entretanto, apesar de certa contaminação por plasma na separação, é extremamente improvável que isto tenha algum efeito biológico. A ultracentrifugação é geralmente incapaz de precipitar proteínas solúveis no plasma e o “pellet”, após isolamento, é várias vezes submetido a lavagens com tampão, o que por si só já minimiza a contaminação. Além disso, a metodologia utilizada leva a uma diluição final da amostra acima de 100 vezes, o que torna ainda mais improvável o efeito biológico de qualquer proteína presente em suspensão no plasma.

7. Conclusões

Em resumo, este estudo demonstrou que exossomos são partículas presentes no plasma de pacientes sépticos com características redox específicas e capazes de induzir disfunção miocárdica em corações isolados e preparações de músculo papilar. Esse efeito pode ser mediado, pelo menos em parte, pela liberação de NO.

A disfunção miocárdica da sepse, apesar de ser um fenômeno há muito conhecido, tem seu mecanismo ainda não completamente elucidado. A lista de possíveis mediadores implicados no fenômeno é longa, e a ela somam-se novos mecanismos propostos todos os anos. Este estudo, ao identificar mais um fator que pode relacionar-se à disfunção miocárdica da sepse, espera ajudar a clarificar as vias pelas quais ocorre a disfunção e assim contribuir para o esclarecimento dos mecanismos relacionados à doença.

8. Referências Bibliográficas

AFULUKWE, I.F.; COHEN, R.I.; ZEBALLOS, G.A.; IQBAL, M.; SCHARFF, S.M. Selective NOS inhibition restores myocardial contractility in endotoxemic rats; However, myocardial NO content does not correlate with myocardial dysfunction. **Am J Resp Crit Care Med** 162: 21-26, 2000.

AGUILAR, R.C.; WENDLAND, B. Ubiquitin: not just for proteasomes anymore. **Curr Opin Cell Biol** 15: 184-190, 2003.

ANDRE, F.; ANDERSEN, M.; WOLFERS, J.; LOZIER, A.; RAPOSO, G.; SERRA, V.; RUEGG, C.; FLAMENT, C.; ANGEVIN, E.; AMIGORENA, S.; ZITVOGEL, L. Exosomes in cancer immunotherapy: preclinical data. **Adv Exp Med Biol** 495: 349-354, 2001.

ANDRE, F.; SCHARTZ, N.E.C.; MOVASSAGH, M.; FLAMENT, C.; PAUTIER, P.; MORICE, P.; POMEL, C.; LHOMME, C.; ESCUDIER, B.; CHEVALIER, T.; TURSZ, T.; AMIGORENA, S.; RAPOSO, G.; ANGEVIN, E.; ZITVOGEL, L. Malignant effusions and immunogenic tumour-derived exosomes. **Lancet** 360: 295-305, 2002.

ANDREOLA, G.; RIVOLTINI, L.; CASTELLI, C.; HUBER, V.; PEREGO, P.; DEHO, P.; SQUARCINA, P.; ACCORNERO, P.; LOZUPONE, F.; LUGINI, L.; STRINGARO, A.; MOLINARI, A.; ARANCIA, G.; GENTILE, M.; PARMIANI, G.; FAIS, S. Induction of lymphocyte apoptosis by tumor cell secretion of FasL-bearing microvesicles. **J Exp Med** 195: 1303-1316, 2002.

APODACA, G. Endocytic traffic in polarized epithelial cells: Role of the actin and microtubule cytoskeleton. **Traffic** 2:149-159, 2001.

BEAN, A.J.; DAVANGER, S.; CHOU, M.F.; GERHARDT, B.; TSUJIMOTO, S.; CHANG, Y. Hrs-2 regulates receptor-mediated endocytosis via interactions with Eps15. **J Biol Chem** 275:15271-15278, 2000.

BLANCHARD, N.; LANKAR, D.; FAURE, F.; REGNAULT, A.; DUMONT, C.; RAPOSO, G.; HIVROZ, C. TCR activation of human T cells induces the production of exosomes bearing the TCR/CD3/ ζ complex. **J Immunol** 168: 3235-3241, 2002.

BONE, R.C.; BALK, R.A.; CERRA, F.B.; DELLINGER, R.P.; FEIN, A.M.; KNAUS, W.A.; SCHEIN, R.M.; SIBBALD, W.J. Definiton for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. **Chest** 101: 1644 -1655, 1992.

BRANDES, R.P.; KODDENBERG, G.; GWINNER, W.; KIM, D.; KRUSE, H.J.; BUSSE, R.; MUGGE, A. Role of increased production of superoxide anions by NAD(P)H oxidase and xanthine-oxidase in prolonged endotoxemia. **Hypertension** 33: 1243-1249, 1999.

BRADY, A.J.; WARREN, J.B.; POOLE-WILSON, P.A.; WILLIAMS, T.J.; HARDING, S.E. Nitric oxide attenuates cardiac myocyte contraction. **Am J Physiol** 265: H176-H182, 1993.

CHEN, K.; DETWILLER, T.C.; ESSEX, D.W. Characterization of protein-disulfide isomerase released from activated platelets. **Brit J Hematol** 90: 425-431, 1995.

CLAYTON, A.; TURKES, A.; DEWITT, S.; STEADMAN, R.; MASON, M.D.; HALLETT, M.B. Adhesion and signaling by B cell-derived exosomes: the role of integrins. **FASEB J** online, Abril 1, 2004.

COURT, O.; KUMAR, A.; PARRILLO, J.E.; KUMAR, A. Myocardial depression in sepsis and septic shock. **Crit Care** 6: 500-508, 2002.

CUNNION, R.E.; SCHAER, G.L.; PARKER, M.M.; NATANSON, C.; PARRILLO, J.E. The coronary circulation in human septic shock. **Circulation** 73: 637-644, 1986.

DENZER, K.; KLEIJMEER, M.J.; HEIJNEN, H.F.; STOORVOGEL, W.; GEUZE, H.J. Exosome: From internal vesicle of the multivesicular body to intercellular signaling device. **J Cell Sci** 113:3365-3374, 2000 (a).

DENZER, K.; VAN EIJK, M.; KLEIJMEER, M. J.; JAKOBSON, E.; DE GROOT, C.; GEUZE, H. J. Follicular dendritic cells carry MHC class II expressing microvesicles at their surface. **J Immunol** 165: 1259-1265, 2000 (b).

DHAINAUT, J.F.; HUYGHEBAERT, M.F.; MONSALLIER, J.F.; LEFEVRE, G.; DALL'AVA-SANTUCCI, J.; BRUNET, F.; VILLEMANT, D.; CARLI, A.; RAICHVARG, D. Coronary hemodynamics and myocardial metabolism of lactate, free fatty acids, glucose and ketones in patients with septic shock. **Circulation** 75: 533-541, 1987.

ELKINS, R.C.; MCCURDY, J.R.; BROWN, P.P.; GREENFIELD, L.J. Effects of coronary perfusion pressure on myocardial performance during endotoxic shock. **Surg Gynecol Obstet** 137:991-996, 1973.

ESCOLA, J.M.; KLEIJMEER, M.J.; STOORVOGEL, W.; GRIFFITH, J.M.; YOSHIE, O.; GEUZE, H.J. Selective enrichment of tetraspan proteins on the internal particles of multivesicular endosomes and on exosomes secreted by human B-lymphocytes. **J Biol Chem** 273: 20121-20127,1998.

EVANS, H.G.; LEWIS, M.J.; SHAH, A.M. Interleukin-1 β modulates myocardial contraction via dexamethasone sensitive production of nitric oxide. **Cardiovasc Res** 5: 338-343, 1993.

FELDER, S.; MILLER, K.; MOEHREN, G.; ULLRICH, J.A.; SCHLESSINGER, J.; HOPKINS, C.R. Kinase activity controls the sorting of the epidermal growth receptor within the multivesicular body. **Cell** 61: 623-634, 1990.

FERDINANDY, P.; DANIAL, H.; AMBRUS, I.; ROTHERY, R.A.; SCHULZ, R. Peroxynitrite is a major contributor to cytokine-induced myocardial contractile failure. **Circ Res** 87:241-247, 2000.

FERNANDEZ-BORJA, M.; WUBBOLTS, R.; CALAFAT, J.; JANSSEN, H.; DIVECHA, N.; DUSSELJEE, S.; NEEFJES, J. Multivesicular body morphogenesis requires phosphatidyl-inositol 3- kinase activity. **Curr Biol** 9: 55-58, 1999.

FINK, M.P.; BAGGS, A.G. Animal models of sepsis and septic shock. Em: FEIN, A.M.; ABRAHAM, E.M.; BALK, R.A.; BERNARD, G.R.; BONE, R.C.; DANTZKER, D.R.; FINK, M.P. eds. **Sepsis and Multiorgan Failure**. Williams & Wilkins, 1997, pgs. 596-613.

FINKEL, M.S.; ODDIS, C.V.; JACOBS, T.D.; WATKINS, S.C.; HATTLER, B.G.; SIMMONS, R.L. Negative inotropic effects of cytokines mediated by nitric oxide. **Science** 257:387-389, 1992.

GEUZE, H.J. The role of endosomes and lysosomes in MHC class II functioning. **Immunol Today** 19:282–287,1998.

GILLOOLY, D.J.; MORROW, I.C.; LINDSAY, M.; GOULD, R.; BRYANT, N.J.; GAULLIER, J-M.; PARTON, R.G.; STENMARK, H. Localization of phosphatidylinositol 3-phosphate in yeast and mammalian cells. **EMBO J** 19: 4577-4588, 2000.

GRANTON, J.T.; GODDARD, C.M.; ALLARD, M.F.; EEDEN, S.; WALLEY, K.R. Leukocytes and decreased left-ventricular contractility during endotoxemia in rabbits. **Am J Respir Crit Care Med** 155: 1977-1983, 1997.

GRECO, V.; HANNUS, M.; EATON, S. Argosomes: A potential vehicle for the spread of morphogens through epithelia. **Cell** 106:633-645, 2001.

GRUENBERG, J.; GRIFFITHS, G.; HOWELL, K.E. Characterization of the early endosome and putative endocytic carrier particles in vivo and with an assay of vesicle fusion in vitro. **J Cell Biol** 108:1301-1316, 1989.

GRUENBERG, J. The endocytic pathway: a mosaic of domains. **Nat Rev Mol Cell Biol** 2: 721-730, 2001.

GU, M.; BOSE, R.; BOSE, D.; YANG, J.; LI, X.; LIGHT, R.B.; MINK, S. Tumor necrosis factor-alpha but not septic plasma depresses cardiac myofilament contraction. **Can J Anesth** 45:280-286,1998.

HARRISON, P.; WILBOURN, B.; DEBILI, N.; VAINCHENKER, W.; BRETON GORIUS, J.; MASSE, J.M.; SAVIDGE, G.F.; CRAMER, E.M. Uptake of plasma fibrinogen into the α -granules of human megakaryocytes and platelets. **J Clin Invest** 84:73-79, 1989.

HEIJNEN, H.F.G.; DEBILI, N.; VAINCHECKER, W.; BRETON-GORIUS, J.; GEUZE, H.S.; SIXMA, J.J. Multivesicular bodies are an intermediate stage in the formation of platelet α -granules. **Blood** 91: 2313-2325,1998.

HEIJNEN, H.F.G.; SCHIEL, A.E.; FIJNHEER, R.; GEUZE, H.J.; SIXMA, J.J. Activated platelets release two types of membrane vesicles: microvesicles by surface shedding and exosomes derived from exocytosis of multivesicular bodies and α -granules. **Blood** 94: 3791-3799, 1999.

HEMLER, M.E. Tetraspanin proteins mediate cellular penetration, invasion, and fusion events and define a novel type of membrane microdomain. **Annu Rev Cell Dev Biol** 19:397–422, 2003.

HENDERSON, A.H.; BRUTSAERT, D.L.; PARMLEY, W.W.; SONNENBLICK, E.H. Myocardial mechanics in papillary muscles of the rat and cat. **Am J Physiol** 217: 1273-1279, 1969.

HIRAKU, Y.; MURATA, M.; KAWANISHI, S. Determination of intracellular glutathione and thiols by HPLC with a gold electrode at the femtomole level: comparison with a spectroscopy assay. **Biochim Biophys Acta** 1570:42-52, 2002.

HIRSCH, J.G.; FEDORKO, M.E.; COHN, Z.A. Vesicle fusion and formation at the surface of pinocytotic vacuoles in macrophages. **J Cell Biol** 38: 629-632, 1968.

HOTCHKISS, R.S.; KARL, I.E. Reevaluation of the role of cellular hypoxia and bioenergetic failure in sepsis. **JAMA** 267:1503-1510, 1992.

HUNG, J.; LEW, W.Y. Cellular mechanisms of endotoxin-induced myocardial depression in rabbits. **Circ Res** 73:125-134, 1993.

IKONEN, E. Roles of lipid rafts in membrane transport. **Curr Opin Cell Biol** 13: 470-477, 2001.

JANISZEWSKI, M.; CARMO, A.O.; PEDRO, M.A.; SILVA, E.; KNOBEL, E.; LAURINDO, F.R.M. Platelet-derived exosomes of septic individuals possess proapoptotic NAD(P)H oxidase activity. A new vascular redox pathway. **Crit Care Med** 32:818-825, 2004.

JANISZEWSKI, M.; PEDRO, M.A.; CARMO, A.O.; LOPES, L.R.; LAURINDO, F.R.M. Protein disulfide isomerase: a novel regulatory protein of vascular smooth muscle NAD(P)H oxidase. **Circulation** 108:IV-46, 2003.

JAVESGHANI, D.; HUSSAIN, S.N.; SCHEIDEL, J.; QUINN, M.T.; MAGDER, S.A. Superoxide production in the vasculature of lipopolysaccharide-treated rats and pigs. **Shock** 19:486-493, 2003.

JOHANNES, L.; LAMAZE, C. Clathrin-Dependent or Not: Is It Still the Question? **Traffic** 3: 443–451, 2002.

JOHNSTONE, R.M.; ADAM, M.; HAMMOND, J.R.; ORR, L.; TURBIDE, C. Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released particles (exosomes). **J Biol Chem** 262: 9412-9420, 1987.

KARLSSON, M.; LUNDIN, S.; DAHLGREN, U.; KAHU, H.; PETTERSSON, I.; TELEMO, E. 'Tolerosomes' are produced by intestinal epithelial cells. **Eur J Immunol** 31:2892–2900, 2001.

KHADOUR, F.H.; PANAS, D.; FERDINANDY, P.; SCHULZE, C.; CSONT, T.; LALU, M.M.; WILDHIRT, S.M.; SCHULZ, R. Enhanced NO and superoxide generation in dysfunctional hearts from endotoxemic rats. **Am J Physiol** 283: H1108-H1115, 2002.

KINUGAWA, K.; TAKAHASHI, T.; KOHMOTO, O.; YAO, A.; AOYAGI, T.; MOMOMURA, S.; HIRATA, Y.; SERIZAWA, T. Nitric oxide-mediated effects of interleukin-6 on $[Ca^{2+}]_i$ and cell contraction in cultured chick ventricular myocytes. **Circ Res** 75: 285-295, 1994.

KLEIJMEER, M.; RAMM, G.; SCHUURHUIS, D.; GRIFFITH, J.; RESCIGNO, M.; RICCIARDI-CASTAGNOLI, P.; RUDENSKY, A.Y.; OSSENDORP, F.; MELIEF, C.J.; STORVOGEL, W.; GEUZE, H.J. Reorganization of multivesicular bodies regulates MHC class II antigen presentation by dendritic cells. **J Cell Biol** 155:53–63, 2001.

KOBAYASHI, T.; VISCHER, U.M.; ROSNOBLET, C.; LEBRAND, C.; LINDSAY, M.; PARTON, R.G.; KRUITHOF, E.K.; GRUENBERG, J. The tetraspanin CD63/Lamp3 cycles between endocytic and secretory compartments in human endothelial cells. **Mol Biol Cell** 11:1829–1843, 2000.

KOJDA, G.; KOTTENBERG, K. Regulation of basal myocardial function by NO. **Cardiovasc Res** 41:514-523, 1999.

KOMADA, M.; SORIANO, P. Hrs, a FYVE finger protein localized to early endosomes, is implicated in vesicular traffic and required for ventral folding morphogenesis. **Genes Dev** 13:1475-1485,1999.

KRAVETS, F.G.; LEE, J.; SINGH, B.; TROCCHIA, A.; PENTYALA, S.N.; KHAN, S.A. Prostatomes: Current concepts. **Prostate** 43:169-174, 2000.

KRISHNAGOPALAN, S.; KUMAR, A.; PARRILLO, J.E.; KUMAR, A. Myocardial dysfunction in the patient with sepsis. **Curr Opin Crit Care** 8: 376-388, 2002.

KUMAR, A.; THOTA, V.; DEE, L.; OLSON, J.; URETZ, E.; PARRILLO, J.E. Tumor necrosis factor-alpha and interleukin1-beta are responsible for depression of *in vitro* myocardial cell contractility induced by serum from humans with septic shock. **J Exp Med** 183:949-958, 1996.

KUMAR, A.; HAERY, C.; PARRILLO, J.E. Myocardial dysfunction in septic shock: part I. Clinical manifestations of cardiovascular dysfunction. **J Cardiothorac Vasc Anesth** 15:364-376, 2001.

LAHAV, J.; GOFER-DADOSH, N.; LUBOSHITZ,J.; HESS, O.; SHAKLAI, M. Protein disulfide isomerase mediates integrin-dependent adhesion. **FEBS Lett** 475:89-92, 2000.

LAHAV, J.; JURK, K.; HESS, O.; BARNES, M.J.; FARNDAL, R.W.; LUBOSHITZ, J.; KEHREL, B.E. Sustained integrin ligation involves extracellular free sulfhydryls and enzymatically catalyzed disulfide exchange. **Blood** 100: 2472-2478, 2002.

LUZIO, J.P.; ROUS, B.A.; BRIGHT, N.A.; PRYOR, P.R.; MULLOCK, B.M.; PIPER, R.C. Lysosome-endosome fusion and lysosome biogenesis. **J Cell Sci** 113: 1515-1524, 2000.

MCKENNA, T.M.; REUSCH, D.W.; SIMPKINS, C.O. Macrophage conditioned medium and interleukin-1 suppress vascular contractility. **Circ Shock** 25: 187-196, 1988.

MELDRUM, D.R. Tumor necrosis factor in the heart. **Am J Physiol** 274:R577-R595, 1998.

MUNT, B.; JUE, J.; GIN, K.; FENWICK, J.; TWEEDDALE, M. Diastolic filling in human severe sepsis: an echocardiographic study. **Crit Care Med** 26: 1829-1833, 1998.

MURK, J.L.; STOOORVOGEL, W.; KLEIJMEER, M.J.; GEUZE, H.J. The plasticity of multivesicular bodies and the regulation of antigen presentation. **Semin Cell Develop Biol** 13: 303-311, 2002.

NATANSON, C.; FINK, M.P.; BALLANTYNE, H.K.; MACVITTIE, T.J.; CONKLIN, J.J.; PARRILLO, J.E. Gram-negative bacteremia produces both severe systolic and diastolic cardiac dysfunction in a canine model that simulates human septic shock. **J Clin Invest** 78: 259-270, 1986.

OPIE, L.H. Mechanisms of cardiac contraction and relaxation. Em: BRAUNWALD, E. ed. **Heart disease: a textbook of cardiovascular medicine**. W.B. Saunders, 1997, pgs. 360-393.

ORAL, H.; DORN, G.W.; MANN, D.L. Sphingosine mediates the immediate negative inotropic effects of tumor necrosis factor- α in the adult mammalian cardiac myocyte. **J Biol Chem** 272: 4836-4842, 1997.

PAN, B.T.; JOHNSTONE, R.M. Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes *in vitro*: Selective externalization of the receptor. **Cell** 33: 967-977, 1983.

PARKER, J.L.; ADAMS, H.R. Myocardial effects of endotoxin shock: characterization of an isolated heart muscle model. **Adv Shock Res** 2:163-175, 1979.

PARKER, J.L.; ADAMS, H.R. Contractile dysfunction of atrial myocardium from endotoxin-shocked pigs. **Am J Physiol** 240: H954-H962, 1981.

PARKER, M.M.; SHELHAMER, J.H.; BACHARACH, S.L.; GREEN, M.V.; NATANSON, C.; FREDERICK, T.M.; DAMSKE, B.A.; PARRILLO, J.E. Profound but reversible myocardial depression in patients with septic shock. **Ann Intern Med** 100:483-490, 1984.

PARRATT, J.R. Nitric Oxide in sepsis and endotoxaemia. **J Antim Chemot** 41 (Suppl. A): 31-39, 1998.

PARRILLO, J.E.; BURCH, C.; SHELHAMER, J.H.; PARKER, M.M.; NATANSON, C.; SCHUETTE, W. A circulating myocardial depressant substance in humans with septic shock. Septic shock patients with a reduced ejection fraction have a circulating factor that depresses in vitro myocardial cell performance. **J Clin Invest** 76: 1539-1533, 1985.

PEDRO, M.A. Micropartículas plasmáticas: um novo microambiente de sinalização redox transcelular no sistema vascular. São Paulo, 2003. 120 p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

PELHAM, H.B. SNAREs and the specificity of membrane fusion. **Trends Cell Biol** 11: 99-101, 2001.

PETERS, P.J.; BORST, J.; OORSCHOT, V.; FUKUDA, M.; KRAHENBUHL, O.; TSCHOPP, J.; SLOT, J.W.; GEUZE, H.J. Cytotoxic T lymphocyte granules are

secretory lysosomes, containing both perforin and granzymes. **J Exp Med** 173:1099–1109, 1991.

PETERS, P.J.; GEUZE, H.J.; VAN DER DONK, H.A.; BORST, J. A new model for lethal hit delivery by cytotoxic T lymphocytes. **Immunol Today** 11:28-32, 1990.

PETERS, P.J.; GEUZE, H.J.; VAN DER DONK, H.A.; SLOT, J.W.; GRIFTH, J.M.; STAM, N.J.; CLEVERS, H.C.; BORST, J. Molecules relevant for T cell-target cell interaction are present in cytolytic granules of human T lymphocytes. **Eur J Immunol** 19:1469–1475, 1989.

PEYTON, M.D.; HINSHAW, L.B.; GREENFIELD, L.J.; ELKINS, R.C. The effects of coronary vasodilatation on cardiac performance during endotoxin shock. **Surg Gynecol Obstet** 143: 533-538, 1976.

PIPER, R.; LUZIO, J.P. Late endosomes: Sorting and partitioning in multivesicular bodies. **Traffic** 2: 612-621, 2001.

POELAERT, J.; DECLERCK, C.; VOGELAERS, D.; COLARDYN, F.; VISSER, C.A. Left ventricular systolic and diastolic function in septic shock. **Intensive Care Med** 23: 553-560, 1997.

RABESANDRATANA, H.; TOUTANT, J.P.; REGGIO, H.; VIDAL, M. Decay-accelerating factor (CD55) and membrane inhibitor of reactive lysis (CD59) are

released within exosomes during *in vitro* maturation of reticulocytes. **Blood** 91:2573-2580, 1998.

RAPOSO, G.; NIJMAN, H.W.; STOOORVOGEL, W.; LEIJENDEKKER, R.; HARDING, C.V.; MELIEF, C.J.; GEUZE, H.J. B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. **J Exp Med** 183:1161-1172, 1996.

RAPOSO, G.; TENZA, D.; MECHEIRI, S.; PERONET, R.; BONNEROT, C.; DESAYMARD, C. Accumulation of major histocompatibility complex class II molecules in mast cell secretory granules and their release upon degranulation. **Mol Biol Cell** 8:2631-2645, 1997.

RIEU, S.; GERMINARD, C.; RABESANDRATANA, H.; SAINTE-MARIE, J.; VIDAL, M. Exosomes released during reticulocyte maturation bind to fibronectin via integrin α 4 β 1. **Eur J Biochem** 267: 583-590, 2000.

SANTOS, C.X.; ANJOS, E.I.; AUGUSTO, O. Uric acid oxidation by peroxynitrite: multiple reactions, free radical formation, and amplification of lipid oxidation. **Arch Biochem Biophys** 372: 285-294, 1999.

SKOKOS, D.; GOUBRAN-BOTROS, H.; ROA, M.; MECHEIRI, S. Immunoregulatory properties of mast cell-derived exosomes. **Mol Immunol** 38: 1359-1362, 2001 (a).

SKOKOS, D.; LE PANSE, S.; VILLA, I.; ROUSSELLE, J.-C.; PERONET, R.; DAVID, B.; NAMANE, A.; MÉCHERI, S. Mast cell-dependent B and T lymphocyte activation is mediated by the secretion of immunologically active exosomes. **J Immunol** 166:868–876, 2001 (b).

SKOKOS, D.; GOUBRAN-BOTROS, H.; DEMEURE, C.; MORIN, J.; PERONET, R.; BIRKENMEIER, G.; BOUDALY, S.; MÉCHERI, S. Mast cell-derived exosomes induce phenotypic and functional maturation of dendritic cells and elicit specific immune responses in vivo. **J Immunol** 170:3037-3045, 2003.

SRIVASTAVA, P. Interaction of heat-shock proteins with peptide and antigen-presenting cells: chaperoning of the innate and adaptive immune responses. **Annu Rev Immunol** 20: 395-425, 2002.

STAHL, T.J.; ALDEN, P.B.; RING, W.S.; MADOFF, R.C.; CERRA, F.B. Sepsis-induced diastolic dysfunction in chronic canine peritonitis. **Am J Physiol** 258: H625-H633, 1990.

STOORVOGEL, W.; KLEIJMEER, M.J.; GEUZE, H.J.; RAPOSO, G. The biogenesis and functions of exosomes. **Traffic** 3: 321-330, 2002.

SULLIVAN, D.C.; HUMINIECKI, L.; MOORE, J.W.; BOYLE, J.J.; POULSOM, R.; CREAM BARKER, J.; BICKNELL, R. EndoPDI, a novel protein disulfide

isomerase-like protein that is preferentially expressed in endothelial cells acts as a stress survival factor. **J Biol Chem** 278: 47079-47088, 2003.

SUTHERLAND, F.J.; HEARSE, D.J. The isolated blood and perfusion fluid perfused heart. **Pharmacol Res** 613-627, 2000.

TAKEUCHI, K.; DEL NIDO, P.J.; IBRAHIM, A.E.; POUTIAS, D.N.; GLYNN, P.; CAO-DANH, H.; COWAN, D.B.; MCGOWAN, F.X. Increased myocardial calcium cycling and reduced myofilament calcium sensitivity in early endotoxemia. **Surgery** 126:231-238, 1999.

TATSUMI, T.; KEIRA, N.; AKASHI, K.; KOBARA, M.; MATOBA, M.; SHIRAIISHI, J.; YAMANAKA, S.; MANO, A.; TAKEDA, M.; NISHIKAWA, S.; ASAYAMA, J.; FLISS, H.; NAKAGAWA, M. Nitric Oxide-cGMP pathway is involved in endotoxin-induced contractile dysfunction in rat hearts. **J Appl Physiol** 96: 853-850, 2004.

THERY, C.; REGNAULT, A.; GARIN, J.; WOLFERS, J.; ZITVOGEL, L.; RICCIARDI-CASTAGNOLI, P.; RAPOSO, G.; AMIGORENA, S. Molecular characterization of dendritic cell-derived exosomes. Selective accumulation of the heat shock protein hsc73. **J Cell Biol** 147:599-610, 1999.

THERY, C.; BOUSSAC, M.; VERON, P.; RICCIARDI-CASTAGNOLI, P.; RAPOSO, G.; GARIN, J.; AMIGORENA, S. Proteomic analysis of dendritic cell-derived

exosomes: A secreted subcellular compartment distinct from apoptotic vesicles. **J Immunol** 166: 7309–7318, 2001.

THERY, C.; DUBAN, L.; SEGURA, E.; VERON, P.; LANTZ, O.; AMIGORENA, S. Indirect activation of naive CD4⁺ cells by dendritic cell-derived exosomes. **Nat Immunol** 3: 6566-6578, 2002 (a).

THERY, C.; ZITVOGEL, L.; AMIGORENA, S. Exosomes: composition, biogenesis and function. **Nat Rev Immun** 2: 569-579, 2002 (b).

VAN NIEL, G.; HEYMAN, M. The epithelial cell cytoskeleton and intracellular trafficking II. Intestinal epithelial cell exosomes: perspective on their structure and function. **Am J Physiol** 283: G251-G255, 2002.

VAN NIEL, G.; RAPOSO, G.; CANDALH, C.; BOUSSAC, M.; HERSHBERG, R.; CERF-BENSUSSAN, N.; HEYMAN, M. Intestinal epithelial cells secrete exosome-like vesicles. **Gastroenterology** 121:337–349, 2001.

VINCENT, J.L. Cardiovascular alterations in septic shock. **J Antim Chemot** 41 (Suppl. A): 9-15, 1998.

WACHOWICZ, B.; OLAS, B.; ZBIKOWSKA, H.M.; BUCZYNSKI, A. Generation of reactive oxygen species in blood platelets. **Platelets** 13:172-182, 2002.

WEISEL, R.D.; VITO, L.; DENNIS, R.C.; HECHTMAN, H.B. Myocardial depression during sepsis. **Am J Surg** 133: 512-521,1977.

WIGGERS, C.J. Myocardial depression in shock. A survey of cardiodynamic studies. **Am Heart J** 33: 633-650, 1947.

WOLFERS, J.; LOZIER, A.; RAPOSO, G.; REGNAULT, A.; THERY, C.; MASURIER, C.; FLAMENT, C.; POUZIEUX, S.; FAURE, F.; TURSZ, T.; ANGEVIN, E.; AMIGORENA, S.; ZITVOGEL, L. Tumor-derived exosomes are a source of shared tumor rejection antigens for CTL cross-priming. **Nat Med** 7:297-303, 2001.

ZITVOGEL, L.; REGNAULT, A.; LOZIER, A.; WOLFERS, J.; FLAMENT, C.; TENZA, D.; RICCIARDI-CASTAGNOLI, P.; RAPOSO, G.; AMIGORENA, S. Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: Dendritic cell-derived exosomes. **Nat Med** 5:594-600, 1998.

9. Anexos