

MILENA KARINA COLÓ BRUNIALTI

EXPRESSÃO DE TLR2, TLR4, CD14, CD11b E CD11c
NA SUPERFÍCIE DE MONÓCITOS E RESPOSTA *IN VITRO*
AO LPS, AVALIADA PELA PRODUÇÃO DE CITOCINAS,
EM PACIENTES COM SEPSE, SEPSE GRAVE E
CHOQUE SÉPTICO.

Tese apresentada à Universidade
Federal de São Paulo – Escola Paulista
de Medicina para obtenção do título de
Doutor em Ciências

São Paulo
2005

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

MILENA KARINA COLÓ BRUNIALTI

EXPRESSÃO DE TLR2, TLR4, CD14, CD11b E CD11c
NA SUPERFÍCIE DE MONÓCITOS E RESPOSTA *IN VITRO*
AO LPS, AVALIADA PELA PRODUÇÃO DE CITOCINAS,
EM PACIENTES COM SEPSE, SEPSE GRAVE E
CHOQUE SÉPTICO.

Tese apresentada à Universidade
Federal de São Paulo – Escola Paulista
de Medicina para obtenção do título de
Doutor em Ciências pelo programa de
pós-graduação em Infectologia.

Orientador:
Prof. Dr. Reinaldo Salomão

São Paulo
2005

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO

ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE MEDICINA

DISCIPLINA DE INFECTOLOGIA

Chefe do Departamento: Profa. Dra. Emilia Inoue Sato

Coordenador do Curso de Pós-graduação: Prof. Dr. Arnaldo Lopes Colombo

MILENA KARINA COLÓ BRUNIALTI

EXPRESSÃO DE TLR2, TLR4, CD14, CD11b E CD11c NA
SUPERFÍCIE DE MONÓCITOS E RESPOSTA *IN VITRO* AO LPS,
AVALIADA PELA PRODUÇÃO DE CITOCINAS, EM PACIENTES
COM SEPSE, SEPSE GRAVE E CHOQUE SÉPTICO.

Presidente da Banca:

Prof. Dr. Reinaldo Salomão

BANCA EXAMINADORA

TITULARES

Profa. Dra. Evelin Capellari Cárnio

Prof. Dr. Momtchilo Russo

Prof. Dr. Álvaro Pacheco e Silva Filho

Dr. Otelo Rigato Júnior

SUPLENTES

Prof. Dr. Franscico Soriano

Prof. Dr. Luiz Francisco Poli de Figueiredo

Aprovada em: ____/____/____

Brunialti, Milena Karina Coló

Expressão de TLR2, TLR4, CD14, CD11b e CD11c na superfície de monócitos e resposta *in vitro* ao LPS, avaliada pela produção de citocinas, em pacientes com sepse, sepse grave e choque séptico.

/Milena Karina Coló Brunialti. São Paulo, 2005.

xix, 108f.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-graduação em Infectologia.

Título em inglês: TLR2, TLR4, CD14, CD11b and CD11c expression on monocytes surface and *in vitro* LPS response, evaluated by cytokine production, in patients with sepsis, severe sepsis and septic shock.

1. Sepse 2. Choque séptico 3. Monócitos 4. Imunofenotipagem
5. Citocinas 6. Citometria de fluxo

A PEDRA

O distraído nela tropeçou...

O bruto a usou como projétil.

O empreendedor, usando-a, construiu.

O camponês cansado da lida, dela fez assento.

Para meninos, foi brinquedo.

Drummond a poetizou.

Já David matou Golias e Michel Ângelo extraiu-lhe a mais bela escultura...

E em todos esses casos, a diferença não esteve na pedra, mas no homem!

Não existe "pedra" no seu caminho que não possa ser aproveitada para o seu próprio crescimento.

Autor desconhecido.

Dedicatória

A minha mãe pelo apoio e incentivo

incondicional.

Ao meu filho Pietro com muito amor.

Aos meus irmãos Ricardo, Patrícia, Rita e

Helinho.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Reinaldo Salomão, exemplo de pesquisador e conduta, pela confiança depositada durante todos esses anos.

Aos médicos que colaboraram para a realização deste estudo através da inclusão de pacientes: Murillo Assunção e Flávia Machado (Hospital São Paulo), Leandro Martins e Camila Valentin (Hospital Santa Marcelina). Obrigado pelo carinho e atenção despedida, tão rara nos dias de hoje.

Ao Prof. Dr. Flóvis de Araújo Peres (UNIFESP/FCM) e ao Dr. Heráclito Barbosa de Carvalho (USP-USP) pela orientação da análise estatística.

Ao Pesquisador Dr. Esper Georges Xallás pela colaboração neste estudo e por proporcionar desafios que me permitiram crescer profissionalmente.

*Aos meus amigos Maria da Luz Fernandes, Leandro Silva
Willish Martos, Natália Esteram Gomes e Paulo Sérgio Martins.
Mais importante que este trabalho é a amizade que construímos.*

*Aos colegas de laboratório e pós-graduandos de todas as disciplinas que por
aqui passaram, pelo incentivo e festim durante esses nove anos de trabalho conjunto
no Laboratório de Imunologia.*

*Aos voluntários que aceitaram participar do estudo. Aos familiares dos
pacientes ofereço a minha solidariedade.*

*A Deus por me dar saúde, força de vontade, paciência (limitada) e
perseverança.*

Sumário

Dedicatória.....	v
Agradecimentos.....	vi
Listas.....	x
Resumo.....	xix
1.0 Introdução.....	1
1.1 SIRS, Sepses, Sepses Graves e Choque Séptico.....	2
1.2 Epidemiologia da Sepses.....	3
1.3 Fisiopatologia.....	4
1.3.1 Importância do lipopolissacarídeo (LPS), seu complexo receptor e desencadeamento da resposta inflamatória.....	6
1.4 TLRs e resposta imune inata	11
1.5 Modulação da resposta celular na sepses.....	19
2.0 Objetivos.....	24
3.0 Métodos.....	26
3.1 Pacientes e voluntários saudáveis.....	27
3.1.1 Grupo de pacientes sépticos e indivíduos saudáveis.....	27
3.1.2 Definições.....	27
3.1.3 Critérios de exclusão.....	28
3.2 Coleta de sangue.....	29
3.2.1 Obtenção de soro.....	33
3.2.2 Detecção quantitativa da concentração sérica de sCD14 através do ELISA.....	33
3.3 Separação de células mononucleares do sangue periférico.....	34
3.3.1 Estimulação <i>in vitro</i> para indução de produção citocinas....	35
3.3.2 Detecção quantitativa da concentração de citocinas no sobrenadante de cultura de CMSP através do ELISA.....	36
3.3.2.1 Detecção de interleucina-6 (IL-6).....	36
3.3.2.2 Detecção de fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α).....	37
3.3.2.3 Detecção de interleucina-10 (IL-10).....	39

3.4 Imunofenotipagem de monócitos de pacientes e indivíduos saudáveis através da citometria de fluxo.....	40
3.4.1 Citometria de fluxo.....	42
3.5 Análise Estatística.....	47
3.6 Soluções e Meio de Cultura.....	48
3.6.1 Meio de cultura RPMI 1640.....	48
3.6.2 Solução tampão de fosfato (PBS) 0,15 M.....	48
3.6.3 PBS 1% azida de sódio.....	48
3.6.4 Tampão carbonato de sódio 0,1 M.....	49
3.6.5 Diluente de ensaio.....	49
3.6.6 LPS de <i>Salmonella abortus equi</i>	49
4.0 Resultados.....	50
4.1 Imunofenotipagem de monócitos em sangue periférico.....	51
4.1.1 Expressão de TLR2, TLR4 e mCD14.....	51
4.1.2 Expressão de CD11b e CD11c.....	55
4.2 Dosagem de sCD14 em soro.....	58
4.3 Detecção da produção de TNF- α , IL-6 e IL-10 por células mononucleares do sangue periférico (CMSP) induzida por LPS.....	60
4.3.1 Produção de TNF- α induzida por LPS.....	60
4.3.2 Produção de IL-6 induzida por LPS.....	62
4.3.3 Produção de IL-10 induzida por LPS.....	64
4.4 Produção de citocinas inflamatórias (TNF- α e IL-6) e antiinflamatória (IL-10) por CMSP induzida por LPS e por IL-1 β e TNF- α	66
4.4.1 Produção de TNF- α induzida por LPS e IL-1 β	66
4.4.2 Produção de IL-6 induzida por LPS, IL-1 β e TNF- α	69
4.4.3 Produção de IL-10 induzida por LPS, IL-1 β e TNF- α	72
4.5 Correlações entre receptores de superfície, produção de citocinas <i>in vitro</i> e estímulos.....	75
5.0 Discussão.....	77
6.0 Conclusões.....	87
7.0 Anexos.....	89
8.0 Referências.....	99
Abstract.....	108

Lista de Figuras

Figura 1.	Representação esquemática da parede celular de bactéria Gram-negativa.....	6
Figura 2.	Representação esquemática do LPS de <i>Salmonella</i>	7
Figura 3.	Substâncias derivadas de patógenos reconhecidos pelos TLRs.....	13
Figura 4.	Vias de sinalização dos TLRs.....	16
Figura 5.	Esquema mostrando a sobreposição das vias de sinalização dos receptores de TNF- α , IL-1 β e Toll, representado pelo TLR4.....	18
Figura 6.	Estratégia de aquisição de monócitos em sangue total.....	44
Figura 7.	Estratégia de análise de monócitos em sangue total.....	45
Figura 8.	Estratégia de análise da intensidade de expressão do receptor CD14 em monócitos do sangue periférico.....	46
Figura 9.	Expressão de TLR2 em monócitos do sangue periférico de indivíduos sadios e em diferentes estádios da sepse.....	52
Figura 10.	Expressão de TLR4 em monócitos do sangue periférico de indivíduos sadios e em diferentes estádios da sepse.....	53
Figura 11.	Expressão de CD14 em monócitos do sangue periférico de indivíduos sadios e em diferentes estádios da sepse.....	54
Figura 12.	Expressão de CD11b em monócitos do sangue periférico de indivíduos sadios e em diferentes estádios da sepse.....	56
Figura 13.	Expressão de CD11c em monócitos do sangue periférico de indivíduos sadios e em diferentes estádios da sepse.....	57
Figura 14.	Dosagem de sCD14 em soro de indivíduos sadios e em diferentes estádios da sepse.....	59
Figura 15.	Produção de TNF- α induzida por LPS em sobrenadante de cultura de CMSP de indivíduos sadios e em diferentes estádios da sepse.....	61
Figura 16.	Produção de IL-6 induzida por LPS em sobrenadante de cultura de CMSP de indivíduos sadios e em diferentes estádios da sepse.....	63

Figura 17.	Produção de IL-10 induzida por LPS em sobrenadante de cultura de CMSP de indivíduos saudáveis e em diferentes estádios da sepse.....	65
Figura 18.	Produção de TNF- α induzida por LPS e IL-1 β em sobrenadante de cultura de CMSP de indivíduos saudáveis e em diferentes estádios da sepse.....	67
Figura 19.	Produção de IL-6 induzida por LPS IL-1 β e TNF- α em sobrenadante de cultura de CMSP de indivíduos saudáveis e em diferentes estádios da sepse.....	70
Figura 20.	Produção de IL-10 induzida por LPS IL-1 β e TNF- α em sobrenadante de cultura de CMSP de indivíduos saudáveis e em diferentes estádios da sepse.....	73

Lista de Tabelas

Tabela 1.	Localização, associação e expressão celular dos TLRs.....	13
Tabela 2.	Relação de anticorpos empregados para o ensaio de imunofenotipagem.....	41
Tabela 3.	Painel de anticorpos utilizados em cada tubo.....	41
Tabela 4.	Expressão de TLR2 em monócitos do sangue periférico de indivíduos saudáveis e em diferentes estádios da sepse.....	52
Tabela 5.	Expressão de TLR4 em monócitos do sangue periférico de indivíduos saudáveis e em diferentes estádios da sepse.....	53
Tabela 6.	Expressão de CD14 em monócitos do sangue periférico de indivíduos saudáveis e em diferentes estádios da sepse.....	54
Tabela 7.	Expressão de CD11b em monócitos do sangue periférico de indivíduos saudáveis e em diferentes estádios da sepse.....	56
Tabela 8.	Expressão de CD11c em monócitos do sangue periférico de indivíduos saudáveis e em diferentes estádios da sepse.....	57
Tabela 9.	Dosagem de sCD14 em soro de indivíduos saudáveis e em diferentes estádios da sepse.....	59
Tabela 10.	Produção de TNF- α induzida por LPS em sobrenadante de cultura de CMSP de indivíduos saudáveis e em diferentes estádios da sepse.....	61
Tabela 11.	Produção de IL-6 induzida por LPS em sobrenadante de cultura de CMSP de indivíduos saudáveis e em diferentes estádios da sepse.....	63
Tabela 12.	Produção de IL-10 induzida por LPS em sobrenadante de cultura de CMSP de indivíduos saudáveis e em diferentes estádios da sepse.....	65

Tabela 13.	Produção de TNF- α induzida por LPS e IL-1 β em sobrenadante de cultura de CMSP de indivíduos sadios e em diferentes estádios da sepse.....	68
Tabela 14.	Produção de IL-6 induzida por LPS, IL-1 β e TNF- α em sobrenadante de cultura de CMSP de indivíduos sadios e em diferentes estádios da sepse.....	71
Tabela 15.	Produção de IL-10 induzida por LPS, IL-1 β e TNF- α em sobrenadante de cultura de CMSP de indivíduos sadios e em diferentes estádios da sepse.....	74
Tabela 16.	Tabela 16: Correlação entre os receptores de superfície de monócitos e a produção de citocinas por CMSP frente aos estímulos de LPS, IL-1 β e TNF- α <i>in vitro</i>	76

Lista de Quadros

Quadro 1.	Características clínicas e epidemiologia dos pacientes com sepse.....	30
------------------	---	----

Lista de Abreviaturas e Símbolos

AP-1	proteína ativadora-1
APC	aloficocianina
BD	Becton Dickinson
BSA	albumina bovina
BPI	proteínas bactericidas por aumento de permeabilidade
bpm	batimentos por minuto
CAP	proteínas catiônicas microbidas
CD	“cluster of differentiation”
CMSP	células mononucleares do sangue periférico
CO ₂	dióxido de carbono
°C	graus Celsius
D-GalN	D-galactosamina
EDTA	ácido etilenodiaminotetraacético
ELISA	ensaio imunoenzimático
ERK	quinase regulada por sinal extracelular
FADD	proteína associada ao domínio de morte de FAS
FCS	soro fetal bovino
FC	freqüência cardíaca
FITC	fluoresceína isotiocianato
FR	freqüência respiratória
g	gravidade (velocidade de centrifugação)
g	grama
GPI	glicosilfosfatidilinositol

ICS	infecções da corrente sanguínea
IFN	interferon-alfa
I κ B	inibidor de NF- κ B
IKK	complexo de quinases
IL-1 β	interleucina-1 beta
IL-1R	receptores de IL-1
IL-6	interleucina-6
IL-10	interleucina-10
IRAK	quinase associada ao IL-1R
IRF	fator regulador de interferon
JNK	N-terminal c-Jun quinase
kDA	quilodalton
LBP	proteína ligante de lipopolissacarídeo
LPS	lipopolissacarídeo
μ g	micrograma
μ l	microlitro
M	molaridade
Mal/TIRAP	proteína adaptadora tipo MyD88
MAPKs	proteínas quinase ativadoras de mitose (
MKK3/6	MAPK quinase 3/6
MKK4/7	MAPK quinase 4/7
mCD14	CD14 ligado à membrana
MEK	MAPK quinase
min	minuto

mg	miligrama
ml	mililitro
mmHg	milímetro de mercúrio
MyD88	proteína de diferenciação milóide 88
MyD88s	proteína de diferenciação milóide 88 “short”
mRNA	ácido ribonucléico mensasageiro
N	normalidade
NF- κ B	fator nuclear-kappa B
ng	nanograma
PAMP	padrão molecular associado à patógenos
PBS	solução tampão fosfatada
PE	ficoeritrina
PerCP	clorofila peridinina
pg	picograma
PRR	receptor de reconhecimento padrão
rhIL-1 β	IL-1 β recombinante humano
rhIL-6	IL-6 recombinante humano
rhIL-10	IL-10 recombinante humano
rhTNF- α	TNF- α recombinante humano
rhsCD14	sCD14 recombinante humano
RIP	“Rieske iron-sulfur protein”
ROS	espécies reativas de oxigênio
sCD14	CD14 sóluvel
SIRS	síndrome da resposta inflamatória sistêmica

SOCS	“suppressor of cytokine signaling”
sTNFR,	receptor solúvel do TNF
TAK1-TAB1-TAB2	quinase ativadora do fator transformador de crescimento- β
- proteína ligante-1 de TAK1 - proteína ligante-2	
TGF- β	fator transformador de crescimento-beta
TICAM-1/TRIF	molécula adaptadora contendo o domínio TIR-1
TIR	domínio homólogo ao receptor Toll/IL-1
TIRAP/Mal	proteína adaptadora tipo MyD88
TLR	“Toll-Like Receptor”
<i>tlr4</i>	"toll-like receptor-4 gene"
TMB	tetrametilbenzidina
TNF- α	fator de necrose tumoral-alfa
TNFR	receptor de TNF
TOLLIP	proteína promotora de interação com Toll
TRADD	proteína associada ao domínio de morte do TNFR
TRAF	fator associado ao TNFR
TRAM	molécula adaptadora relacionada à TRIF
TRIF/TICAM-1	proteína adaptadora indutora de interferon- β
UTI	unidade de terapia intensiva

Resumo

A sepse apresenta crescente incidência e elevada morbidade e mortalidade, sendo a principal causa de óbito nas unidades de terapia intensiva. O controle da infecção depende do adequado reconhecimento dos microrganismos pelas células do hospedeiro e de resposta efetora competente. Paradoxalmente, na sepse, os mecanismos de proteção estão também envolvidos no processo de doença, sendo o limite entre resposta protetora e de lesão ainda impreciso.

Objetivos: Avaliar a expressão de receptores de reconhecimento de patógenos na superfície de monócitos e a resposta a estímulos exógenos – LPS, IL-1 β e TNF- α - *in vitro*, medida pela produção de citocinas, em pacientes em diferentes estádios da sepse. **Métodos:** Foram incluídos 41 pacientes, classificados de acordo com as definições do consenso de 1992 sendo, 14 com sepse, 12 com sepse grave e 15 com choque séptico. Dezesete voluntários sadios foram incluídos como controle. Através da citometria de fluxo, a expressão de TLR2, TLR4, CD14, CD11b e CD11c foi analisada na superfície dos monócitos em sangue total. A forma solúvel do receptor CD14 (sCD14) também foi mensurada em soro através de ELISA. A produção de citocinas inflamatórias (TNF- α e IL-6) e antiinflamatória (IL-10) foi mensurada em sobrenadante de células mononucleares do sangue periférico após os estímulos de LPS, IL-1 β e TNF- α *in vitro*. **Resultados:** Foi detectado aumento do sCD14 sérico e uma queda expressão de mCD14 em monócitos periféricos nos pacientes em relação aos voluntários sadios ($p < 0,01$). Entretanto não houve diferença entre os grupos estudados quanto à expressão dos receptores TLR2, TLR4, CD11b e CD11c. O grupo com sepse apresentou, comparado com os outros grupos, aumento da produção de IL-6 e TNF- α após o estímulo de LPS. Esta regulação positiva foi menos intensa com IL-1 β e ausente com TNF- α . Uma regulação negativa da produção de citocinas inflamatórias foi observada na sepse grave e choque séptico. Não foi observada diferença significativa na produção de IL-10 entre os grupos, todavia uma menor produção frente ao estímulo de LPS foi detectada nos pacientes em choque séptico em relação aos pacientes em sepse ($p < 0,05$). A correlação entre receptores de superfície de monócitos e produção das citocinas frente ao LPS pode ser demonstrada quando os resultados obtidos dos pacientes sépticos foram agrupados. Surpreendentemente, detectou-se correlação da expressão dos mesmos receptores com os outros estímulos utilizados, IL-1 β e TNF- α , também foi observada. **Conclusões:** Neste estudo demonstramos que a resposta inflamatória está associada com o *continuum* de manifestações clínicas, com uma forte resposta na fase inicial (sepse) e quadro refratário nas fases tardias (sepse grave e choque séptico). A correlação observada entre os receptores de superfície e a produção de citocinas frente aos estímulos de TNF- α e IL-1 β e o mesmo padrão de resposta observado com os diferentes estímulos sugere um padrão de resposta imunológica que não depende apenas da expressão dos receptores avaliados e provavelmente, tem uma regulação na via de sinalização intracelular.

1.1 SIRS, Sepses, Sepses Grave e Choque Séptico

A sepsis pode ser definida como a repercussão sistêmica da infecção. Manifestando-se como diferentes estágios clínicos de um mesmo processo fisiopatológico, é, para o médico, um de seus maiores desafios, uma emergência médica associada à elevada morbidade e mortalidade. No início da década de 90, em reunião de consenso das Sociedades de Terapia Intensiva e de Pneumologistas (*American College of Chest Physicians/ Society of Critical Care* - Bone *et al.*; 1992a) se procurou estabelecer uma padronização para o diagnóstico de sepsis e suas complicações, levando-se em consideração os avanços da compreensão de sua fisiopatologia. Reconheceu-se que uma grande diversidade de causas poderia levar um quadro clínico comum, caracterizado pelo desencadeamento da resposta inflamatória do hospedeiro. Este quadro foi definido como Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica (SIRS, do inglês *Systemic Inflammatory Response Syndrome*) e seria desencadeado por pancreatite, queimaduras, trauma e outros, ficando o termo sepsis restrito à SIRS causada por infecção, ou seja, resposta inflamatória causada por infecção documentada. SIRS, sepsis, sepsis grave e choque séptico representam um *continuum* clínico e gravidade fisiopatológica. O processo começa com uma infecção, com ou sem resposta inflamatória sistêmica, podendo progredir a resposta sistêmica com sepsis grave ou choque séptico. SIRS/sepsis seria reconhecida pela presença de dois ou mais dos seguintes critérios: alteração de temperatura (hipotermia ou hipertermia), elevação de frequência respiratória ($FR > 20$ irpm), de frequência cardíaca ($FC > 90$ bpm), e presença de leucocitose, leucopenia ou de células imaturas no

sangue periférico. A presença de sepse e pelo menos uma disfunção orgânica caracteriza a sepse grave. A existência de hipotensão refratária à adequada administração de fluído com hipoperfusão evidencia o choque séptico (Bone *et al.*, 1992b).

1.2 Epidemiologia da Sepse

A importância da sepse pode ser inferida pela sua elevada morbidade e mortalidade. Avaliando incidência e mortalidade associadas às infecções de corrente sanguínea (ICS) no Hospital São Paulo, hospital de ensino da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), entre 1985 e 1986, encontramos incidência de 21,7 episódios por 1000 admissões, com mortalidade de 33,4% (Salomao *et al.*, 1992; 1993). Estudo conduzido na Universidade de Iowa, Estados Unidos da América (EUA), entre 1980 e 1992, mostrou aumento de praticamente três vezes na incidência de ICS adquiridas no hospital (Pittet & Wenzel, 1995). Mais recentemente estudos utilizando diagnósticos clínicos e laboratoriais de sepse e com base populacional foram conduzidos. O mais completo, avaliando internações entre o ano de 1979 a 2000, com amostragem representativa do conjunto dos hospitais americanos, mostrou que a incidência aumentou de 82,7 episódios/100.000 habitantes em 1979 para 240,4 episódios/ 100.000 habitantes em 2000 (Martin *et al.*, 2003). Outro estudo estimou a ocorrência de 750.000 casos de sepse anualmente nos EUA, com cerca de 210.000 óbitos (Angus *et al.*, 2001). Um estudo brasileiro multicêntrico observacional (BASES - *Brazilian Sepsis Epidemiological Study*) conduzido em cinco unidades de terapia intensiva, de maio de 2001 a janeiro

de 2002, mostrou incidência de sepse foi 61,4; sepse grave 35,6 e choque séptico 30,0 para cada 1000 pacientes-dia. As taxas de mortalidade para os pacientes em sepse, sepse grave e choque séptico foram de 34,7%; 47,3% e 52,2%; respectivamente (Silva *et al.*, 2004).

1.3 Fisiopatologia

A compreensão da sepse é complexa porque envolve múltiplos fatores simultaneamente como virulência, tamanho do inóculo, doenças de base, estado nutricional, idade e presença de polimorfismos que interferem na resposta imune. Os mecanismos adaptativos da resposta imune e inflamatória do hospedeiro na sepse são imperativos no controle da infecção, e ao mesmo tempo, é mediadora de alterações funcionais, que são a base fisiopatológica das manifestações clínicas. Importantes progressos foram obtidos na compreensão da patogenia da sepse nos últimos anos destacando-se o mecanismo de reconhecimento de antígenos bacterianos e a melhor compreensão dos mecanismos de sinalização celular, que são descritos a seguir.

As citocinas inflamatórias e outros mediadores desencadeados por estas ou por agentes patogênicos induzem uma série de alterações nas células alvo. Embora um amplo espectro de células seja sensível aos seus efeitos, na sepse, as alterações induzidas na célula endotelial constituem um importante substrato fisiopatológico. Há alterações do seu citoesqueleto, alterações funcionais, com síntese de mediadores com efeitos quimiotáticos, além do aumento da expressão de moléculas de adesão. Ainda, a liberação de

vasodilatadores potentes como o óxido nítrico (NO) pelas células inflamatórias e endoteliais leva a uma importante vasodilatação. As citocinas inflamatórias desencadeiam também a cascata de coagulação, principalmente pela exposição do fator tissular, criando um ambiente de exacerbação da inflamação e coagulação. A regulação negativa de proteínas com função anticoagulante contribui ainda mais para a indução da coagulação. Como resultado tem-se a adesão de neutrófilos e monócitos às células endoteliais, migração para o extravascular, extravasamento de fluídos para o interstício, coagulação intravascular, que em conjunto com alteração do tônus resultam em alterações da microcirculação e levam à hipóxia tecidual e conseqüente disfunção de órgãos e sistemas. Importante ainda, a disfunção celular desencadeada pela sepse pode persistir mesmo após estabelecimento do fluxo sanguíneo aos tecidos, por mecanismos de sofrimento celular, referido como choque citopático (Salomao *et al.*, 1999; Rigato *et al.*, 2001; Cohen, 2002; Hotchkiss & Karl, 2003).

Neste contexto o uso da proteína C ativada, que tem propriedade anticoagulante e antiinflamatória, mostrou redução no risco relativo de morte em pacientes sépticos. Dessa forma, é importante entender com mais detalhes a dinâmica da fisiopatologia para identificar possíveis alvos e estratégias de tratamento na sepse.

1.3.1 Importância do lipopolissacarídeo (LPS), seu complexo receptor e desencadeamento da resposta inflamatória

A similaridade entre os efeitos fisiopatológicos agudos induzidos pelo LPS e as manifestações da sepse por Gram-negativos levou a hipótese de que o LPS, liberado da bactéria *in vivo*, é responsável pela indução dos sintomas da septicemia (Rietschel *et al.*, 1982). As bactérias Gram-negativas possuem em sua membrana externa o LPS, que desempenha importante função na viabilidade bacteriana e na interação com o hospedeiro (Rietschel *et al.*, 1982) (figura 1).

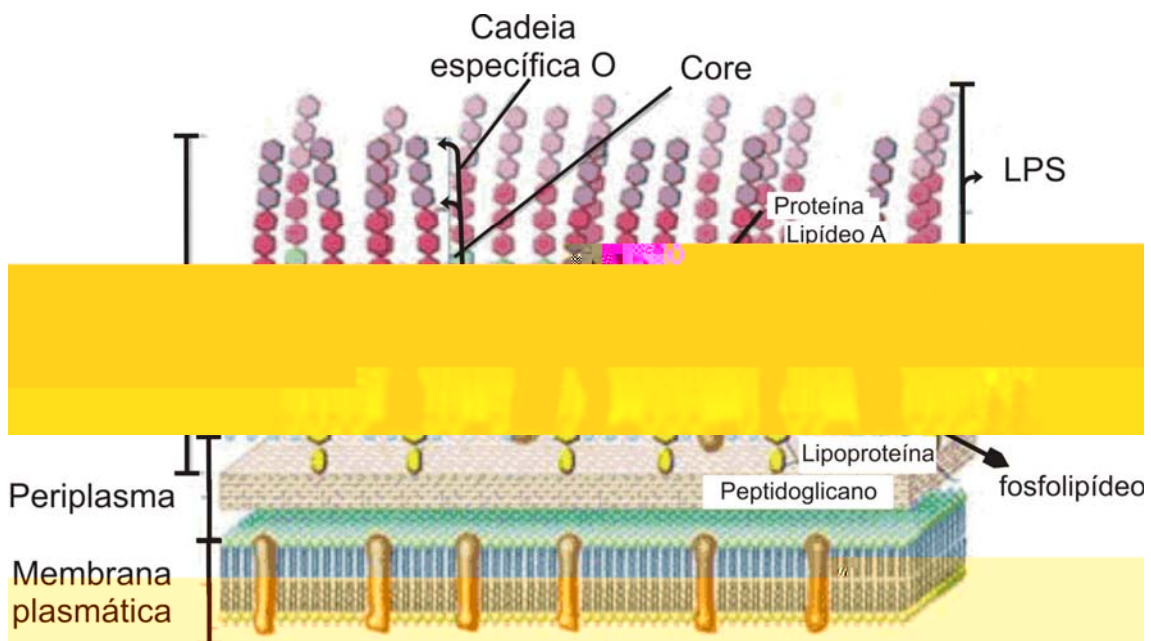


Figura 1: Representação esquemática da parede celular de bactéria Gram-negativa (adaptado de Madigan *et al.*, 1997).

Após a morte e lise bacteriana, e também quando a bactéria se multiplica, o LPS é liberado da superfície bacteriana. A molécula do LPS pode ser dividida, estrutural e funcionalmente, em três sub-regiões: polissacarídeo O, região central ("core") e o lipídeo A (figura 2). O lipídeo A representa a estrutura mais conservada do LPS e retém a toxicidade da molécula (Galanos *et al.*, 1979a). Este dado foi confirmado quando se demonstrou que o lipídeo A sintético tinha atividade biológica idêntica ao lipídeo A e ao LPS bacterianos (Galanos *et al.*, 1985). Por intermédio do lipídeo A, o LPS interage-se com vários tipos celulares, como células mononucleares, células endoteliais, polimorfonucleares e de particular importância os monócitos e macrófagos. A ativação dos macrófagos pelo LPS resulta na liberação de mediadores como o fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α), interleucina-1 (IL-1), IL-6, IL-8 e IL-10. Estes mediadores têm atividade bioativa potente e podem atuar em sinergismo ou ter efeito antagônico a endotoxina (Rietschel *et al.*, 1994). *In vivo*, estas moléculas podem ter ação local ou serem liberadas na circulação, através da qual são transportados para diferentes células e órgãos suscetíveis, resultando na repercussão sistêmica da infecção (Rietschel *et al.*, 1982).

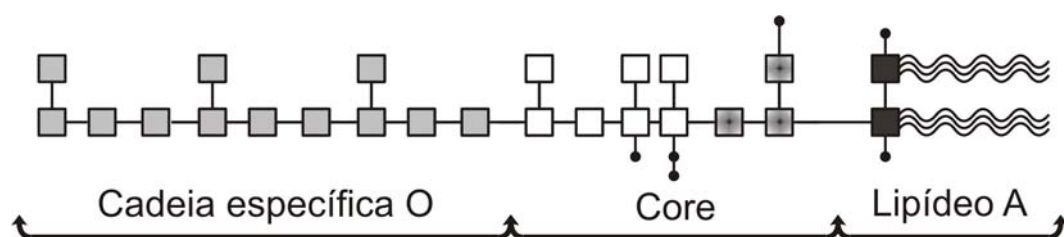


Figura 2: Representação esquemática do LPS de *Salmonella* (adaptado de Galanos *et al.*, 1979a).

A ação biológica do LPS é modulada por proteínas presentes no soro, como a proteína ligante de lipopolissacarídeo (LBP) e a proteína bactericida por aumento de permeabilidade (BPI).

A LBP é sintetizada principalmente por hepatócitos e posteriormente liberada na corrente sanguínea. Tem alta afinidade pela endotoxina bacteriana, formando o complexo LPS-LBP (Schumann *et al.*, 1990). A LBP facilita a ligação do LPS ao CD14, potencializando a ativação do macrófago induzida pelo LPS, e subsequentemente a produção de citocinas pro-inflamatórias, como o TNF- α (Schumann *et al.*, 1990; Wright *et al.*, 1990). Desta forma aumenta a capacidade do hospedeiro na detecção de LPS em fase inicial da infecção, podendo ser importante para o controle da mesma (Ziegler-Heitbrock & Ulevitch; 1993; Jack *et al.*, 1997). Entretanto a presença da LBP pode ser deletéria em estágios avançados de infecção, exacerbando ainda mais a resposta inflamatória (Gallay *et al.*, 1993).

Os neutrófilos produzem proteínas, contidas em seus grânulos, que podem ser liberadas para o meio extracelular, interferindo na resposta ao LPS (Spitznagel, 1990). São chamadas de proteínas catiônicas microbicidas, que têm atividade antibiótica e possuem a capacidade de ligar-se à endotoxina. Entre elas destaca-se a BPI, que possui cerca de 45% de homologia com a LBP, tendo efeito direto sobre células que respondem ao LPS como os monócitos e macrófagos (Tobias *et al.*, 1988). Tobias *et al.* (1998) analisaram as características da BPI e da LBP e classificaram-nas como membros da família de proteínas ligantes de LPS, que apesar da similaridade estrutural, são proteínas funcionalmente antagônicas. A LBP age como um receptor solúvel para o LPS e amplifica os efeitos da endotoxina nas células alvo (Marra *et al.*,

1992), enquanto a BPI limita a resposta celular ao LPS neutralizando seus efeitos como secreção de TNF- α *in vitro* (Heumann *et al.*, 1993).

Outras substâncias presentes no soro interferem no transporte e ligação do LPS ao receptor celular e conseqüentemente na ativação celular. A maioria do LPS circulante liga-se às lipoproteínas de alta densidade (HDL), formando um complexo, diminuindo sua afinidade pelas células do sangue, especialmente macrófagos e neutrófilos (Galanos *et al.*, 1992).

O CD14, caracterizado inicialmente como o mais importante receptor de LPS, apresenta-se em duas formas: o CD14 solúvel (sCD14) e o CD14 ligado à membrana celular (mCD14 - Wright *et al.*, 1990). O receptor CD14 é composto de glicoproteína ancorada a membrana por glicosilfosfatidilinositol (GPI) de 55-KDa. O CD14 é encontrado na membrana de monócitos, macrófagos e em menor proporção em granulócitos (Ziegler-Heitbrock & Ulevitch, 1993). O sCD14 é encontrado no plasma, soro e sobrenadante de cultura celular. Há duas possíveis origens para o sCD14, a primeira seria pela liberação da célula como um precursor, antes da ancoragem na membrana, de tamanho semelhante ao de membrana (54kDa) ou então por clivagem proteolítica através da ação de enzimas que atuariam na âncora de GPI, dando origem a uma forma menor (49kDa) (Ziegler-Heitbrock & Ulevitch, 1993; Landmann *et al.*, 1995). O sCD14 tem afinidade pelo LPS-LBP circulante, formando então o complexo LPS-LBP-sCD14, que facilita a interação com as células que não possuem o mCD14, como no caso das células endoteliais (Frey *et al.*, 1992). Embora a expressão de CD14 de membrana (Hiki *et al.*, 1998, de Werra *et al.*, 2001), os níveis séricos de CD14 solúvel (Landmann *et al.*, 1995; Hiki *et al.*, 1998) e LBP (Gallay *et al.*, 1993, Zweigner *et al.*, 2001) sofram alteração na

sepsse, ainda não há dados contundentes que justifiquem o emprego destes exames na prática clínica.

O mecanismo pelo qual o CD14 transmitia um sinal capaz de causar profunda ativação era incerto, uma vez que sua molécula não possui uma porção intracelular. Então foi postulado que uma molécula transmembrana interagisse com o CD14 e o LPS para fazer a sinalização (Ziegler-Heitbrock & Ulevitch, 1993). Poltorak *et al.* elucidaram o mecanismo de ativação através da identificação do receptor tipo Toll (“Toll-like receptor 4” - TLR4) estudando linhagens de camundongos que são hiporresponsivos ou resistentes aos efeitos do LPS. O gene do *Tlr4* tem mutação pontual no C3H/HeJ e sofreu deleção no C57Bl10/ScCR conferindo a estes camundongos um fenótipo de resistência ao LPS (Poltorak *et al.*, 1998). Desta forma, é possível que mutações no gene *Tlr4* em humanos possam influenciar na suscetibilidade e evolução a infecção por bactérias Gram-negativas (Lorenz *et al.*, 2002).

O TLR4 necessita da proteína de diferenciação mielóide-2 (MD-2) que se encontra acoplada a parte extracelular do TLR4, conferindo uma maior sensibilidade ao LPS, provavelmente através da estabilização dos dímeros do TLR4 (Shimazu *et al.*, 1999). A cascata de ativação celular desencadeada após a ligação do LPS ao seu complexo receptor está descrita no item 1.4.

Os monócitos e macrófagos expressam outros receptores de superfície envolvidos no reconhecimento e sinalização do LPS. São as moléculas da família das integrinas, que formam heterodímeros através da associação das subunidades α_L (CD11a), α_M (CD11b), α_X (CD11c) e α_D (CD11d) com a subunidade β_2 (CD18) (Janeway *et al.*, 2001). Os receptores CD11b/CD18 (Troelstra *et al.*, 1999) e CD11c/CD18 (Ingalls & Golenbock, 1995) estariam

envolvidos no reconhecimento do LPS. Há indícios que CD11/CD18 e CD14 utilizam um caminho comum de ativação celular induzida pelo LPS, o TLR4 (Perera *et al.*, 2001). Entretanto devido à baixa eficiência do complexo CD11/CD18-TLR4 em comparação com CD14-TLR4, r22.ada

conservados evolutivamente, são um exemplo dos primeiros sensores da imunidade inata (Medzhitov & Janeway, 1997).

O receptor Toll foi originalmente descoberto na *Drosophila melanogaster*. O primeiro homólogo humano do Toll de *Drosophila* foi descrito por Medzhitov *et al.* (1997) como sendo capaz de ativar a imunidade adaptativa. Os TLRs são compostos por proteínas transmembranas ricas em leucina com porção citoplasmática muito similar ao receptor de interleucina-1, conseqüentemente funcionam como transdutor de sinalização. Esta porção é conhecida como domínio homólogo ao receptor Toll/IL-1 (TIR - Gay & Keith, 1991).

Entre os mamíferos foram identificados 13 TLRs, sendo 11 expressos em humanos (Hopkins & Sriskandan, 2005). O padrão de expressão do TLRs não só varia conforme o tipo de célula ou tecido estudado, como também conforme a técnica utilizada em cada estudo. Grande parte dos estudos é baseada na expressão do mRNA, que não necessariamente reflete a expressão funcional da proteína. Entretanto, há menor número de informações baseadas na expressão de superfície destes receptores (Tabela 1). A figura 3 mostra os TLRs humanos e seus ligantes.

TLRs	Localização Celular	Expressão
TLR1	Membrana plasmática. Associa-se a TLR2.	Ubíquo.
TLR2	Membrana plasmática e TLR6.	Células dendríticas, macrófagos, monócitos, mielóides, NK.
TLR3	Membrana do endossomo.	Células dendríticas.
TLR4	Membrana plasmática. Requer co-receptores MD-2 e CD14.	Monócitos/macrófagos, células endoteliais, células regulatórias/Th1, Th2, Th17, células foliculares, células T regulatórias, células NK.
TLR5	Membrana plasmática.	Células epiteliais, células dendríticas e macrófagos.
TLR6	Membrana plasmática com TLR2.	Mastócitos, células mielóides.
TLR7	Membrana do endossomo.	Células B, células plasmáticas.
TLR8	Membrana do endossomo.	Células NK, células mielóides.
TLR9	Membrana do endossomo.	Células B, células plasmáticas, células polimorfonucleares, células microgliais.
TLR10	?	Células B e células plasmáticas.
TLR11	?	Uroepitélio.

Tabela 1: Localização, associação e expressão celular dos TLRs (Janssens & Beyaert, 2003; Dunne & O'Neill, 2005; Hopkins & Sriskantharajah, 2005)

Os TLR2 e TLR4 são essenciais no reconhecimento de diferentes componentes da parede bacteriana. Este reconhecimento é feito através da formação de dímeros entre os TLRs. É o caso do TLR2 que forma heterodímeros com o TLR1 e TLR6. Isto explicaria porque estes receptores são capazes de identificar uma variedade maior de ligantes do que o TLR4, o qual se apresenta em forma homodimérica (Ozinsky *et al.*, 2000).

A cascata de sinalização dos TLRs têm caminhos que se sobrepõem e resultam na ativação de fatores de transcrição. Exemplificaremos a seguir a cascata de ativação desencadeada após a ligação do LPS ao complexo de TLR4/MD-2.

Há quatro proteínas adaptadoras envolvidas na sinalização da ativação pelo TLR4: fator de diferenciação miéide 88 (MyD88); adaptadora tipo MyD88 (Mal) também chamada de proteína adaptadora contendo o domínio TIR (TIRAP); molécula adaptadora contendo o domínio TIR-1 (TICAM-1) também chamada de adaptadora indutora de interferon- β (TRIF) e molécula adaptadora relacionada a TRIF (TRAM) (Takeda & Akira, 2005 - figura 4).

A sinalização dependente de MyD88 inicia-se através da interação do domínio TIR (comum aos receptores Toll e de interleucina-1) do TLR e dois tipos de proteínas adaptadoras: MyD88 e Mal/TIRAP. O domínio de morte da MyD88 medeia interação proteína-proteína com outros domínios de morte, mecanismo utilizado por vários complexos sinalizadores para induzir resposta, como por exemplo, a produção de citocinas pro-inflamatórias (Takeda & Akira, 2005).

A proteína adaptadora MyD88 recruta a quinase 1 associada ao IL-1R (IRAK-1). Subseqüentemente a IRAK-4 medeia a fosforilação de IRAK-1 que se

interage com fator 6 associado ao receptor de necrose tumoral (TRAF6). Após o TRAF6 sofrer a ação da ubiquitina, este ativa o complexo formado pela quinase ativadora do fator transformador de crescimento- β - proteína ligante-1 de TAK1 - proteína ligante-2 (TAK1-TAB1-TAB2). Uma vez ativada, TAK1 pode levar a dois caminhos distintos de sinalização (fase precoce - *early phase*): (1) fosforilar o complexo de quinases (IKK) inibidoras de NF- κ B (I κ B), promovendo a translocação do NF- κ B para o núcleo, ou então, (2) utilizar a via das proteínas quinase ativadoras de mitose (MAPKs), pertencentes a três famílias principais: p38, N-terminal c-Jun quinase (JNK) e quinase regulada por sinal extracelular (ERK), através da fosforilação das MAPK quinase 3/6 (MKK3/6), MKK4/7 e MEK, respectivamente. As MAPK levam a ativação de fatores de transcrição, sendo que, JNK e p38 desencadeiam a translocação do ativador de proteína-1 (AP-1) e ERK leva a mobilização do fator de transcrição Elk1 (Liew *et al.*, 2005; Takeda & Akira, 2005).

A via de sinalização do TLR4 independente de MyD88, ou mais recentemente chamada de dependente de TRIF, inicia-se através da interação do domínio TIR do TLR com proteínas adaptadoras TRIF e TRAM, que levam a ativação tardia do NF- κ B (*late phase*), assim como a ativação dos fatores de transcrição IRF-3 e IRF-7. A associação de TRAM e TRIF pode seguir três caminhos a partir da porção terminal de TRIF. Em um deles, a ativação é mediada por IKKs não típicos que resulta na fosforilação e translocação de IRF-3 e IRF-7 para o núcleo, promovendo a síntese de IFN- β e IFN- α , respectivamente (Hopkins & Sriskandan, 2005; Liew *et al.*, 2005).

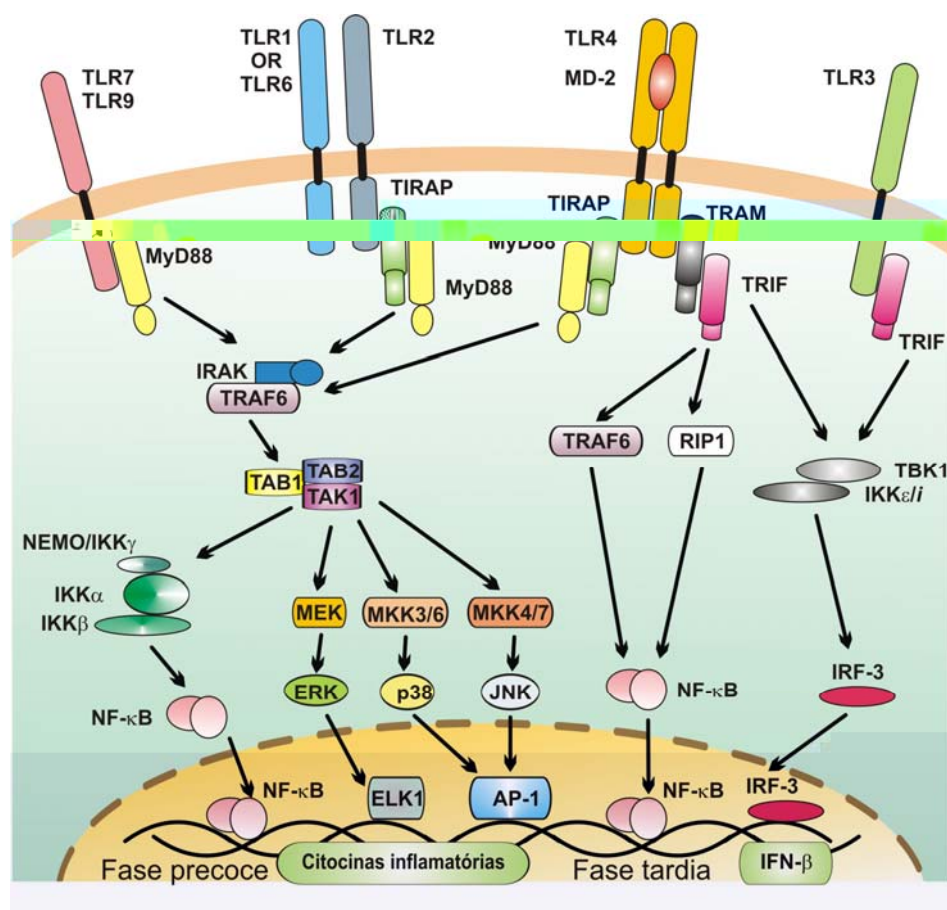


Figura 4: Vias de sinalização dos TLRs (adaptado de Takeda & Akira, 2005; Liew *et al.*, 2005).

Os outros dois caminhos levam a translocação do NF- κ B, seja por associação da TRIF com TRAF6 ou por associação da TRIF com RIP1. A ativação do NF- κ B através de RIP1 ainda é incerta (Barton & Medzhitov, 2003; Takeda & Akira, 2005; Dunne & O'Neill, 2005).

Após a translocação do heterodímero de NF- κ B para núcleo, este se liga a sítios específicos do DNA regulando a transcrição de grande número de genes, incluindo peptídeos antimicrobianos, citocinas pro-inflamatórias, quimiocinas e proteínas antiapoptóticas. Além do estímulo por LPS, o NF- κ B também pode ser ativado por outros estímulos, como por exemplo citocinas

inflamatórias, entre elas a IL-1 β e o TNF- α , como descrito a seguir (Li & Verma, 2002 - figura 5).

Os receptores do tipo Toll e os receptores de IL-1 (IL-1R) fazem parte da família de receptores com domínio intracelular Toll/IL-1 (TIR) e parecem utilizar vias de sinalização muito similares. Após a ligação da IL-1 ao seu receptor, duas proteínas presentes no citosol são recrutadas, a MyD88 e TOLLIP (promotora de interação com Toll). Estas proteínas recrutam a IRAK1, que ativa a TRAF6, resultando em dois caminhos distintos de ativação. Um deles desencadeia a ativação do NF- κ B e o outro leva à ativação das MAPKs, de forma idêntica àquela descrita nos receptores Toll (Martin & Wesche, 2002).

O TLR4 e IL-1R apresentam trechos na sinalização intracelular que são comuns ao receptor de TNF (TNFR1), sendo que a convergência das vias de ativação ocorre mais distante do que entre os receptores com domínio TIR.

Após a ligação do TNF- α ao seu receptor na superfície celular são recrutadas duas proteínas adaptadoras que possuem domínio de morte, a proteína associada ao domínio de morte de FAS (FADD) e a proteína associada ao domínio de morte do TNFR (TRADD). Estas proteínas ativam a cascata de caspases e, subsequente, induzem a apoptose. Entretanto, o TNFR1 somente sinalizará para o domínio de morte quando a síntese protéica estiver bloqueada. A ativação do TNFR1 induz transcrição de genes inflamatórios. O mecanismo protetor das células ao desencadeamento da apoptose é observado em nível molecular, onde TNFR1 primeiramente recruta TRADD, enquanto FAS (CD95) interage com FADD. TRADD agrupa-se ao fator 2 associado ao TNFR (TRAF2), TRAF1 e a proteína associada a receptor

(RIP) ativando o NF- κ B e JNK, protegendo as células da apoptose (Hehlhans & Pfeffer, 2005).

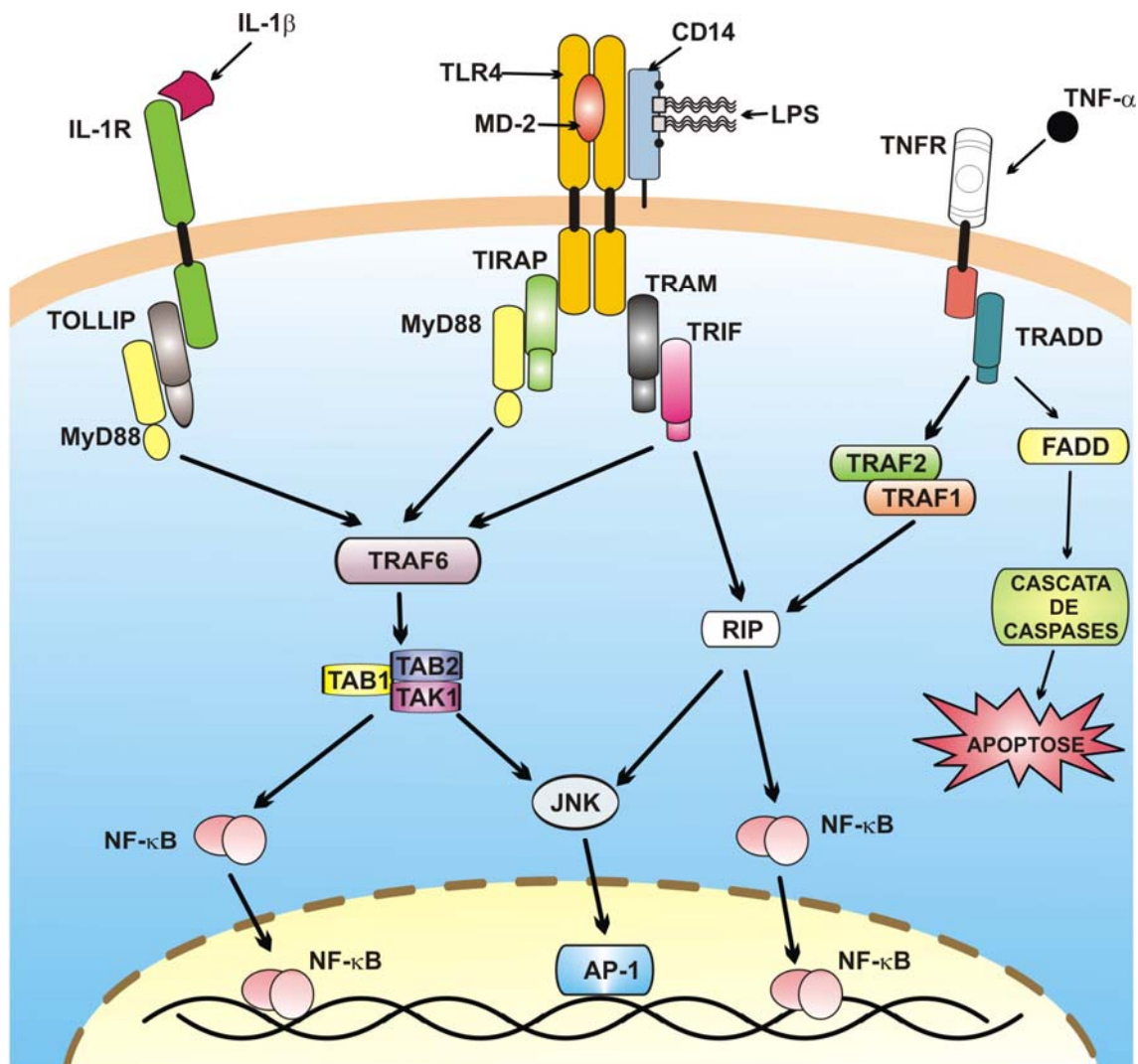


Figura 5: Esquema mostrando a sobreposição das vias de sinalização dos receptores de TNF- α , IL-1 β e Toll, representado pelo TLR4 (Martin & Wesche, 2002; Hehlhans & Pfeffer, 2005; Liew *et al.*, 2005).

A similaridade entre as três vias de ativação celular, notadamente entre TLRs e IL-1, resultando na ativação do NF- κ B, pode ser empregada como uma ferramenta na pesquisa para melhor entendimento da sinalização intracelular durante a sepse.

1.5 Modulação da resposta celular na sepse

A resposta celular a antígenos microbianos pode ser modulada *in vivo* e, particularmente com LPS, induzir no hospedeiro suscetível hiper-resposta e hiporresposta (Salomao *et al.*, 1999; Galanos *et al.*, 1992; Rigato *et al.*, 2001).

O efeito letal da endotoxina em animais pode ser aumentado mediante uma variedade de condições, como infecções (Matsuura & Galanos, 1990) ou presença de tumores (Bartholeyns *et al.*, 1987). Em tais condições os animais hiper-responsivos produzem grande quantidade de citocinas (TNF- α) após estímulo com LPS. A sensibilidade à endotoxina também pode ser induzida por agentes hepatotóxicos, como D-galactosamina (D-GaIN - Galanos *et al.*, 1979b), sendo que uma única injeção intraperitoneal de D-GaIN aumenta a sensibilidade ao LPS em até 100.000 vezes. Neste modelo foi demonstrada a importância do TNF- α como mediador da atividade letal do LPS, onde camundongos tratados com D-GaIN apresentaram redução da mortalidade quando receberam anti-TNF- α . Em animais sensibilizados por bactérias foi demonstrado que, além do TNF- α , há uma variedade de mediadores que têm sua produção aumentada, como o IFN- γ e a IL-6, sendo que a produção de IFN- γ durante a infecção induz hipersensibilidade ao LPS (Galanos *et al.*, 1992; Galanos & Freudenberg, 1993; Katschinski *et al.*, 1992).

Por outro lado, a exposição prévia a pequenas quantidades de LPS torna os animais e humanos hiporresponsivos a uma subsequente dose de LPS, alterando o padrão da expressão de citocinas, notadamente pela redução da produção de TNF- α , um fenômeno conhecido com tolerância (Johnston & Greisman, 1985). Há dois tipos de tolerância, precoce e tardia, que tem características diferentes. A tolerância de fase precoce parece ser mediada por um mecanismo não relacionado a anticorpo, mostrando um quadro transiente refratário envolvendo queda da produção de pirógenos endógenos (West & Heagy, 2002). A tolerância de fase tardia é mediada por anticorpos contra os antígenos da cadeia O e core que podem ser transferidos através do soro de animais tolerantes. O mecanismo pelo qual a tolerância precoce se desenvolve ainda não é totalmente compreendido (Galanos *et al.*, 1992).

A tolerância à endotoxina foi analisada em células do sangue periférico de humanos sadios expostos ao LPS *in vivo*, demonstrada através da reduzida produção de TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10 após novo estímulo *in vitro* (Granowitz *et al.*, 1993; van der Poll *et al.*, 1996). Entretanto, outros estudos *in vivo* e *in vitro* sobre tolerância à endotoxina não mostram meramente uma regulação negativa global da ativação dos macrófagos, mas uma resposta de regulação complexa. Fitting *et al.* (2004) observaram queda da produção de TNF- α em resposta ao LPS *in vitro* em cultura de leucócitos circulantes, esplenócitos, células peritoniais e células da medula óssea de camundongos que receberam injeção de LPS *in vivo*. Em contraste, a produção de TNF- α por macrófagos alveolares não sofreu redução importante.

Poder-se-ia antecipar que a resposta celular ao LPS, e possivelmente a resposta inflamatória a outros produtos bacterianos, na sepse experimental e

clínica seria distinta daquela observada no hospedeiro normal. Alguns pesquisadores acreditam que há um quadro de supressão imune inicial, entretanto outros defendem que este quadro decorre após considerável processo inflamatório (Hotchkiss & Karl, 2003).

Uma menor capacidade dos leucócitos circulantes dos pacientes sépticos em produzir citocinas inflamatórias comparada com as células de controles sadios tem sido regularmente descrita. Estudo empregando cultura de células mononucleares isoladas do sangue periférico de pacientes sépticos estimuladas com LPS mostrou menor produção das citocinas IL-1 α , IL-1 β , TNF- α e IL-6 (Munoz *et al.*, 1991). Ertel *et al.* (1995) utilizando sangue total de pacientes sépticos, documentaram o mesmo padrão de produção de citocinas pro-inflamatórias, ou seja, uma regulação negativa (TNF- α , IL-1 β e IL-6) após estimulação com LPS. Mais recentemente, foi demonstrado que a produção das citocinas de IL-12 e IFN- γ encontra-se diminuída em pacientes sépticos (Ertel *et al.*, 1997). É freqüentemente sugerido que há uma diminuição da produção das citocinas Th1, enquanto que a produção das citocinas Th2 está aumentada. Entretanto, Ertel *et al.* (1997) também encontram uma menor produção das citocinas IL-4, IL-10 e TGF- β em sangue total de pacientes sépticos quando estimulados com LPS. Contudo, estudo realizado por nosso grupo (Rigato & Salomao, 2003) empregando modelo semelhante, encontrou produção de IL-10 preservada, retratando a complexidade de entendimento deste quadro.

Uma das hipóteses para explicar o fenômeno da tolerância seria a alteração das proteínas solúveis ou da superfície celular que fazem o reconhecimento do LPS. Foram descritas alterações das concentrações

plasmáticas das proteínas reguladoras da ação do LPS, como LBP e BPI (von der Mohlen *et al.*, 1996, Opal *et al.*, 1999), diminuição da expressão de CD14 na superfície de monócitos e aumento da concentração plasmática de CD14 solúvel (Hiki *et al.*, 1998), entre outras. Nomura *et al.* (2000) estudaram a expressão do TLR4 em macrófagos de camundongos tolerantes ao LPS e encontraram correlação entre a redução da expressão do TLR4 e a queda da produção de IL-6, indicando uma modulação em nível de membrana celular. Tais alterações poderiam resultar em menor capacidade de ligação do LPS ao monócito e conseqüente menor ativação celular. Em estudo realizado pelo nosso grupo não foi encontrada diferença na ligação do LPS à membrana celular de monócitos de pacientes sépticos em relação aos saudáveis. Contudo, houve um importante comprometimento da produção de TNF- α , avaliado através da detecção intracelular em monócitos por citometria de fluxo (Salomao *et al.*, 2002), sugerindo que a regulação se dá em nível da sinalização celular.

Concordante com esta hipótese, a resposta diminuída ao LPS pode ser explicada pela presença intracelular de várias proteínas supressoras da resposta inflamatória, regulando negativamente a cascata de sinalização, como por exemplo, MyD88s (uma forma menor de MyD88), IRAK-M, IRAK2c, IRAK2d, TOLLIP, SOCS1 e A20 (Hopkins & Sriskandan, 2005; Liew *et al.*, 2005). A composição dos dímeros de NF- κ B é outro fator que tem grande importância na modulação da expressão de genes que regulam a resposta inflamatória, sendo o heterodímero (p50/p65) sua principal forma ativa. O homodímero (p50/p50), embora possua capacidade de ligar-se ao DNA, perdeu seu domínio responsável pela ativação da transcrição, funcionando como repressor (Li & Verma, 2002). Ziegler-Heitbrock *et al.* (1994) demonstraram que

monócitos humanos tolerantes estimulados com LPS têm um aumento dos homodímeros p50 de NF- κ B, enquanto que monócitos primários mostraram predominância de heterodímeros p50/p65.

Contrariamente à idéia de bloqueio da sinalização e transcrição gênica, tem sido proposto que o fenótipo da tolerância é causado pelo aumento da produção de fatores anti-inflamatórios, como o próprio p50 do NF- κ B, receptor solúvel do TNF (sTNFR), IL-10 e fator transformador de crescimento-beta (TGF- β), sendo que a regulação positiva destes mediadores, na tolerância ao LPS, limita a inflamação (Ziegler-Heitbrock, 1995).

Então, a tolerância parece ser um processo complexo, podendo representar um mecanismo protetor que restringe o da

produção diminuída de ROS e da fagocitose nos pacientes com sepse por bactérias gram-negativas.

Desta forma, a adaptação celular na sepse é um evento complexo e ainda parcialmente compreendido. Deve-se considerar que as células do sangue periférico, geralmente utilizadas em estudos humanos, podem não refletir a resposta inflamatória no tecido. É possível que, mesmo no sangue periférico, as células estejam diferentemente adaptadas na sepse. Esta adaptação celular pode depender do *continuum* de manifestações clínicas na sepse, e de maneira mais complexa, a mesma célula pode ter funções reguladas positivamente e outras negativamente durante a sepse.

Existe um evidente interesse em estudar de forma mais abrangente a adaptação celular na sepse, avaliando diferentes populações celulares e diferentes atividades das mesmas. Um importante foco de interesse é a possível modulação das atividades celulares pela expressão de receptores (PRR) na superfície celular.

O estudo da adaptação celular na sepse contribuirá para a melhor compreensão da fisiopatologia da mesma e poderá, no futuro, oferecer alvos de intervenção terapêutica baseados em sua patogênese.

2.0 Objetivos

O objetivo deste estudo foi avaliar a adaptação de monócitos durante o *continuum* das manifestações clínicas da sepse, através da expressão de receptores de superfície celular e da produção *in vitro* de citocinas inflamatórias e anti-inflamatória frente a estímulo com LPS.

Para tanto foram investigados:

1. A expressão dos receptores CD14, TLR4, TLR2, CD11b e CD11c na superfície de monócitos e o nível sérico de sCD14.
2. A produção de citocinas inflamatórias, TNF- α e IL-6, e anti-inflamatória, IL-10, frente ao estímulo com LPS. Utilizando IL-1 β e TNF- α como estímulos, procurou-se avaliar se a regulação celular observada era dependente da expressão de receptores de LPS na superfície celular ou de mecanismos de sinalização intracelular comuns aos estímulos.

3.1 Pacientes e voluntários sadios

3.1.1 Grupo de pacientes sépticos e indivíduos sadios

Voluntários sadios e pacientes sépticos foram incluídos no estudo após assinatura do consentimento livre e esclarecido por eles mesmos ou responsáveis. O estudo teve início após aprovação pelo Comitê de Ética do Hospital São Paulo / UNIFESP e Hospital Santa Marcelina.

Voluntários: Foram incluídos 17 indivíduos sadios, de diferentes faixas etárias, que não estavam em uso de medicação e participassem espontaneamente do estudo.

Pacientes: Foram incluídos 41 pacientes com quadro clínico e laboratorial de sepse (14), sepse grave (12) ou choque séptico (15), classificados de acordo com as definições do consenso da Sociedade de Terapia Intensiva e Colégio Americano de Tórax de 1992 (Bone *et al.*; 1992a), admitidos no Hospital São Paulo e no Hospital Santa Marcelina, na cidade de São Paulo. O quadro 1 mostra as características clínicas e epidemiologia dos pacientes incluídos neste estudo.

3.1.2 Definições

Sepse: entidade clínica presente em um paciente com sítio de infecção identificado, associando-se uma resposta inflamatória sistêmica decorrente dessa infecção, onde estejam presentes sinais como: a) temperatura $>38^{\circ}\text{C}$ ou $<36^{\circ}\text{C}$; contagem de leucócitos >12.000 ou <4.000 células/ mm^3 ou formas

imaturas >10%; c) frequência cardíaca >90 bpm; d) frequência respiratória >20 ipm ou necessidade de ventilação mecânica; e) alteração do estado mental; f) edema significativo ou balanço positivo (>20 mL/Kg/24h); g) hiperglicemia (glicose plasmática >120 mg/dL) na ausência de diabetes.

Sepse grave: sepsse complicada por alguma disfunção orgânica refletida por hipoxemia ($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 < 300$), disfunção renal (oligúria <0,5 mL/Kg/h ou aumento de creatinina >0,5mg/dL), distúrbios de coagulação (RNI >1,5 ou TTPA >60 segundos), trombocitopenia <100.000, hiperbilirrubinemia > 4 mg/dL, hiperlactatemia, alteração da perfusão da pele e íleo paralítico.

Choque séptico: sepsse grave associada à hipotensão a despeito de adequada reposição volêmica. Entende-se por hipotensão uma pressão sistólica <90 mmHg ou redução de mais de 40 mmHg na pressão sistólica basal, ou ainda se houver necessidade de infusão de inotrópicos para manter níveis pressóricos adequados.

3.1.3 Critérios de exclusão

- Pacientes menores de 18 anos ou com doença em estágio terminal, como neoplasias ou Aids.
- Pacientes que estivessem recebendo alguma terapia experimental.
- O evento definidor de sepsse grave ou choque ocorrido há mais de 48 horas.
- Pacientes moribundos ou com morte iminente.

Para participação no estudo, foi solicitada aos pacientes ou seus responsáveis diretos, assinatura de um termo de consentimento previamente aprovado pelo comitê de ética e pesquisa dos hospitais participantes (vide em anexos).

3.2 Coleta de sangue

A coleta do sangue para realização dos ensaios laboratoriais foi realizada em até 72 horas após o diagnóstico clínico de sepse ou até 48 horas após manifestação da primeira disfunção orgânica nos pacientes com sepse grave ou choque séptico. Os pacientes que se encontravam nas unidades de terapia intensiva (UTIs) dos diferentes hospitais foram reanimados de acordo com o protocolo padrão de tratamento de cada unidade. As amostras foram processadas imediatamente no Laboratório de Imunologia I da Disciplina de Infectologia.

Para cada indivíduo sadio ou paciente séptico foram coletados:

- 60 mL de sangue em tubo contendo heparina sódica a vácuo (Becton Dickinson-BD, Plymouth, Inglaterra) para obtenção das células mononucleares do sangue periférico.
- 10 mL de sangue em tubo seco a vácuo (BD) para dosagem do CD14 solúvel (sCD14) no soro.
- 5 mL de sangue em tubo contendo ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA) a vácuo (BD) para análise da expressão de receptores na superfície dos monócitos.

3.2.1 Obtenção de soro

O tubo seco a vácuo foi centrifugado a 700g por 15 minutos a temperatura ambiente para separação do soro. Foram feitas alíquotas de 0,5mL e armazenadas a -80°C para posterior dosagem de sCD14.

3.2.2 Detecção quantitativa da concentração sérica de sCD14 através do ELISA

Para detecção quantitativa da concentração sérica de sCD14 dos pacientes sépticos e indivíduos saudáveis foi utilizado ensaio imunoenzimático (ELISA) Quantikine (R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA), seguindo as instruções do fabricante como descrito a seguir.

Após o descongelamento das amostras de soro, estas foram diluídas 200 vezes em tampão calibrador. O recombinante de sCD14 humano (rhsCD14) do kit foi reconstituído em tampão calibrador na concentração final de 16.000 pg/mL. Em seguida foi feita uma diluição seriada do rhsCD14 de 16.000 pg/mL, 8.000 pg/mL, 4.000 pg/mL, 2.000 pg/mL, 1000 pg/mL, 500 pg/mL, 250 pg/mL e 0 pg/mL. A placa de 96 poços foi lavada previamente acrescentando-se 100 µL/poço de diluente. As amostras diluídas e a curva padrão de sCD14 foram adicionadas à placa na quantidade de 100 µL/poço em duplicata. Após três horas de incubação a temperatura ambiente a placa foi lavada quatro vezes com solução de lavagem, composta por surfactante e conservante, em lavadora automática WellWash 4 (Labsystems, Oy, Helsinki, Finlândia). Acrescentou-se à placa 200 µL/poço do anticorpo policlonal anti-

sCD14 conjugado com peroxidase. A placa foi incubada por uma hora a temperatura ambiente. Nos 15 minutos antes do término da incubação foi preparado o substrato, misturando-se em partes iguais o reagente de cor A (peróxido de hidrogênio) e o reagente de cor B (tetrametilbenzidina). Após um passo de lavagem foram acrescentados 200 µL/poço do substrato pronto e incubado por 30 minutos a temperatura ambiente ao abrigo da luz. Após a incubação acrescentou-se 50 µL/poço de solução de parada (ácido sulfúrico 2N). Em seguida foi feita a leitura das absorbâncias em leitora automática Multiskan EX (Labsystems), utilizando-se o delta das leituras dos filtros de 450 e 550 nm. Com as leituras das densidades ópticas e concentrações conhecidas do padrão de sCD14 foi feito um gráfico e obtido a equação da reta. Nesta equação foram colocados os valores das médias das densidades ópticas das amostras, multiplicado pelo valor da diluição para obtenção das concentrações finais de sCD14 sérico. O limite de detecção do teste foi fixado em 125 pg/mL.

3.3 Separação de células mononucleares do sangue periférico

O sangue coletado em heparina foi diluído em parte igual de soro fisiológico estéril 0,9% (Áster, Sorocaba, SP, BR). O sangue diluído foi adicionado sobre ficoll-paque plus (GE Bio-Science, Uppsala, Suécia) e centrifugado a 500g por 20 minutos a temperatura ambiente. Durante a centrifugação, as células mononucleares do sangue periférico (CMSP) foram separadas devido à densidade do ficoll-paque plus formando uma camada esbranquiçada de células. As células da camada foram coletadas e passaram por duas lavagens com 50 mL com soro fisiológico. O botão de células

mononucleares foi suspenso em meio de cultura RPMI suplementado com L-glutamina, soro fetal bovino (FCS), estreptomicina e penicilina. A viabilidade e correção da concentração da suspensão de células para 4×10^6 células/mL foi feita através da utilização do corante *trypan blue* (Sigma, Saint Louis, MO, EUA) e câmara de Neubauer. Ao final desta etapa as células estavam prontas para receber os estímulos que se seguem.

3.3.1 Estimulação *in vitro* para indução de produção citocinas

A suspensão de células mononucleares foi distribuída em placas de 24 poços (Nalge Nunc Int., Roskilde, Dinamarca) na concentração de 4×10^6 células/mL e incubada em incubadora com saturação 5% de CO₂ e temperatura de 37° C por 20-24 horas. Cada poço recebeu um tratamento como descrito a seguir: Controle negativo (sem estímulo), lipopolissacarídeo (LPS) de *Salmonella abortus equi* (Instituto Max-Planck de Imunobiologia, Freiburg, Alemanha) na concentração final 100ng/ 2×10^6 células, recombinante de interleucina-1 β humano (rhIL-1 β , Pharmingen, San Diego, CA, EUA) na concentração final 10pg/ 2×10^6 células ou recombinante fator de necrose tumoral-alfa humano (rhTNF- α , Pharmingen) na concentração final 10pg/ 2×10^6 células. A dose ideal dos estímulos foi definida em experimentos preliminares (vide em anexos). Após o tempo de incubação a suspensão de células foi transferida para microtubos que sofreram centrifugação para obtenção de sobrenadante. O sobrenadante foi dividido em três alíquotas armazenadas a -80°C para posterior detecção de citocinas pela técnica de ELISA.

3.3.2 Detecção quantitativa da concentração de citocinas no sobrenadante de cultura de CMSP através do ELISA

3.3.2.1 Detecção de interleucina-6 (IL-6)

Para dosagem de IL-6 foi utilizado kit OptEIA (BD Bioscience Pharmingen, San Diego, CA, EUA) contendo o par de anticorpos monoclonais, a IL-6 humana recombinante (rhIL-6) e a avidina conjugada com peroxidase. Placas com 96 poços de fundo plano Maxisorp (Nunc) foram sensibilizadas com 100 µL/poço de anticorpo anti-IL6 humana diluída na proporção 1:250 em tampão carbonato de sódio e incubadas durante a noite em geladeira (2 a 8°C). A seguir, foi desprezada a solução sensibilizante e lavada a placa três vezes com solução tampão fosfatada (PBS) Tween 20 a 0,05% (LabSynth, Diadema, SP, BR), utilizando lavadora automática. Após lavagem as placas foram bloqueadas com 250 µL/poço de PBS a 1% de albumina bovina (PBS 1% BSA – Sigma) por uma hora a temperatura ambiente. A solução bloqueadora foi desprezada e as placas lavadas três vezes.

Os sobrenadantes das culturas de CMSP estimuladas foram diluídos em RPMI 10% FCS como descrito a seguir: controle 1:10 e 1:40; LPS 1:250, 1:1000 e 1:4000; IL-1 β 1:100 e 1:400; TNF- α 1:100 e 1:400. Concomitantemente foi feita curva padrão com rhIL-6 em RPMI 10% FCS nas concentrações 1000 pg/mL, 500 pg/mL, 250 pg/mL, 125 pg/mL, 62,5 pg/mL, 31,2 pg/mL, 15,6 pg/mL, 7,8 pg/mL, 3,9 pg/mL e 0 pg/mL. De cada diluição foram acrescentadas 100 µL/poço, em duplicata. As placas foram incubadas a temperatura ambiente por duas horas. Nos 15 minutos finais de incubação foi

preparada uma diluição a 1:250 em diluente de ensaio, contendo o segundo anticorpo biotinilado e a avidina conjugada a peroxidase mantida no escuro a temperatura ambiente. As placas foram lavadas cinco vezes com solução de lavagem em lavadora automática e acrescentados 100 µL/poço da solução preparada previamente. As placas foram incubadas por uma hora a temperatura ambiente e lavadas sete vezes com solução de lavagem. A seguir foi preparado o substrato, misturando-se em partes iguais solução de peróxido de hidrogênio e solução de tetrametilbenzidina (TMB), ambos da bioMeriex (Boxtel, Holanda). Foram acrescentados 100 µL/poço do substrato e incubado por 15 minutos a temperatura ambiente ao abrigo da luz. A reação foi interrompida com 100 µL/poço de ácido sulfúrico 1M (Merck, Damstadt, Alemanha). Em seguida foi feita a leitura das placas em leitora automática Multiskan EX utilizando-se filtro de 450 nm.

Com as leituras das densidades ópticas e concentrações conhecidas do rhIL-6 foi feito um gráfico e obtido a equação da reta. Nesta equação foram colocados os valores das médias das densidades ópticas das amostras, multiplicado pelo valor da diluição para obtenção das concentrações finais de IL-6 nos sobrenadantes. O limite de detecção do teste foi fixado em 10 pg/mL.

3.3.2.2 Detecção de fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α)

Foram utilizados par de anticorpos monoclonais anti-TNF- α humano e recombinante humano TNF- α (rhTNF- α) da BD Bioscience Pharmingen. Placas de 96 poços de fundo plano (Nunc) foram sensibilizadas com 50 µL/poço de anticorpo anti-TNF- α na concentração de 4 µg/mL e incubadas durante a noite

em geladeira (2 a 8°C). A solução sensibilizante foi desprezada e acrescentou-se 250 µL/poço da solução bloqueadora. Após uma hora de incubação a temperatura ambiente, as placas foram lavadas cinco vezes com solução de lavagem em lavadora automática.

Os sobrenadantes das culturas de CMSP estimuladas foram diluídos em RPMI 10% FCS como descrito a seguir: controle 1:5; LPS 1:5 e 1:20 e IL-1 β 1:3. Concomitantemente foi feita curva padrão com rhTNF- α em RPMI 10% FCS, nas concentrações 2000 pg/mL, 1000 pg/mL, 500 pg/mL, 250 pg/mL, 125 pg/mL, 62,5 pg/mL, 31,2 pg/mL, 15,6 pg/mL, 7,8 pg/mL e 0 pg/mL. De cada diluição foram acrescentadas 100 µL/poço, em duplicata. As placas foram incubadas a temperatura ambiente por uma hora. Após cinco lavagens com solução de lavagem foram acrescentados 100 µL/poço de anticorpo anti-TNF- α biotinilado diluído em PBS acrescido de 1% BSA e 0,05% Tween 20, na concentração de 1µg/mL. As placas foram incubadas por uma hora a temperatura ambiente e lavadas quatro vezes com solução de lavagem. A seguir foram acrescentados 100 µL/poço de estreptavidina conjugada a peroxidase (Genzyme, Cambridge, MA, EUA) na proporção 1:1600 em PBS acrescido de 1% BSA e 0,05% Tween 20. Após 30 minutos de incubação em temperatura ambiente, as placas foram lavadas cinco vezes com solução de lavagem. O substrato foi preparado misturando-se em partes iguais solução de peróxido de hidrogênio e solução de TMB. Foram acrescentados 100 µL/poço do substrato pronto e incubado por 15 minutos a temperatura ambiente ao abrigo da luz. A reação foi interrompida com 100 µL/poço de ácido sulfúrico 1M. Em seguida foi feita a leitura das placas em leitora automática Multiskan EX utilizando-se filtro de 450 nm.

Com as leituras das densidades ópticas e concentrações conhecidas do rhTNF- α foi feito um gráfico e obtido a equação da reta. Nesta equação foram colocados os valores das médias das densidades ópticas das amostras, multiplicado pelo valor da diluição para obtenção das concentrações finais de TNF- α nos sobrenadantes. O limite de detecção do teste foi fixado em 10 pg/mL.

3.3.2.3 Detecção de interleucina-10 (IL-10)

Foram utilizados par de anticorpos monoclonais anti-IL-10 e recombinante humano IL-10 (rhIL-10) da BD Bioscience Pharmingen. Placas de 96 poços de fundo plano (Nunc) foram sensibilizadas com 50 μ L/poço de anticorpo anti-IL-10 na concentração de 4 μ g/mL e incubadas durante a noite em geladeira (2 a 8°C). A solução sensibilizante foi desprezada e as placas lavadas três vezes com solução de lavagem em lavadora automática. Em seguida as placas foram bloqueadas com 250 μ L/poço de solução bloqueadora. Após 30 minutos de incubação a temperatura ambiente, as placas foram lavadas três vezes com solução de lavagem. Todos os sobrenadantes das culturas de CMSP estimuladas foram diluídos 1:4 em RPMI 10% FCS. Concomitantemente foi feita curva padrão com rIL-10 em RPMI 10% FCS, nas concentrações 2000 pg/mL, 1000 pg/mL, 500 pg/mL, 250 pg/mL, 125 pg/mL, 62,5 pg/mL, 31,2 pg/mL, 15,6 pg/mL, 7,8 pg/mL e 0 pg/mL. De cada diluição foram acrescentadas 100 μ L/poço, em duplicata. As placas foram incubadas a temperatura ambiente por duas horas. Após quatro lavagens com solução de lavagem foram acrescentados 100 μ L/poço de anticorpo anti-IL-10

biotinilado diluído em PBS acrescido de 1% BSA e 0,05% Tween 20, na concentração de 1µg/mL. As placas foram incubadas por uma hora a temperatura ambiente e lavadas seis vezes com solução de lavagem. A seguir foram acrescentados 100 µL/poço de estreptavidina conjugada a peroxidase na proporção 1:1600 em PBS acrescido de 1% BSA e 0,05% Tween 20. Após 30 minutos de incubação em temperatura ambiente, as placas foram lavadas seis vezes com solução de lavagem. O substrato foi preparado misturando-se em partes iguais solução de peróxido de hidrogênio e solução de TMB. Foram acrescentados 100 µL/poço do substrato pronto e incubado por 30 minutos a temperatura ambiente ao abrigo da luz. A reação foi interrompida com 100 µL/poço de ácido sulfúrico 1M. Em seguida foi feita a leitura das placas em leitora automática Multiskan EX utilizando-se filtro de 450 nm.

Com as leituras das densidades ópticas e concentrações conhecidas do rhIL-10 foi feito um gráfico e obtido a equação da reta. Nesta equação foram colocados os valores das médias das densidades ópticas das amostras, multiplicado pelo valor da diluição para obtenção das concentrações finais de IL-10 nos sobrenadantes. O limite de detecção do teste foi fixado em 10 pg/mL.

3.4 Imunofenotipagem de monócitos de pacientes e indivíduos sadios através da citometria de fluxo

A imunofenotipagem de monócitos foi realizada em sangue total a fresco, até quatro horas após a coleta das amostras.

A relação de anticorpos monoclonais humanos de superfície que foram utilizados para identificação das populações de leucócitos, verificação da expressão de receptores e volumes utilizados estão contidos na tabela 2.

Tabela 2: Relação de anticorpos empregados para o ensaio de imunofenotipagem.

Anticorpo	Quantidade (μ l)	Clone	Isotipo	Fabricante
CD66-FITC ¹	5	G1OF5	mIgM	BD Bioscience Pharmingen*
CD11c-APC ²	2	S-HCL-3	mIgG _{2b}	BD Bioscience*
CD11b-APC	2	D12	mIgG _{2a}	BD Bioscience
CD14-PerCP ³	4	M ϕ P9	mIgG _{2b}	BD Bioscience
TLR2-PE ⁴	10	TL2.1	mIgG _{2a}	eBioscience*
TLR4-PE	20	HTA125	mIgG _{2a}	eBioscience
mIgG _{2a} -PE	10	MOPC-173	-	eBioscience
mIgG _{2b} -APC	2	27-35	-	BD Bioscience Pharmingen

* San Diego, CA, EUA.

1. FITC: fluoresceína isotiocianato

2. APC: alofocianina

3. PerCP: clorofila peridina

4. PE: ficoeritrina

Cem microlitros das amostras colhidas em EDTA foram transferidos para tubos de poliestireno de 5 mL com fundo arredondado (BD Labware, Franklin Lakes, NJ, EUA). Os tubos receberam os anticorpos como descrito na tabela 3 e foram incubados por 15 minutos no escuro.

Tabela 3: Pannel de anticorpos utilizados em cada tubo.

Tubo	FITC	PE	PerCP	APC
1	CD66b	mIgG _{2a}	CD14	mIgG _{2b}
2	CD66b	TLR2	CD14	CD11c
3	CD66b	TLR4	CD14	CD11b

Em seguida foram acrescentados 2 mL de solução de lise (BD Bioscience) e incubados durante 10 minutos em temperatura ambiente para lise das hemácias. Após a incubação, os tubos foram centrifugados a 2500g por 5 minutos a 4°C e o sobrenadante descartado. Posteriormente foram

acrescentados aos tubos 2 mL de PBS, sendo novamente centrifugados. Após descarte dos sobrenadantes, as amostras foram suspensas em 0,3 mL de PBS a 1% azida de sódio (Sigma).

A imunofenotipagem foi lida em citômetro de fluxo como descrito a seguir.

3.4.1 Citometria de fluxo

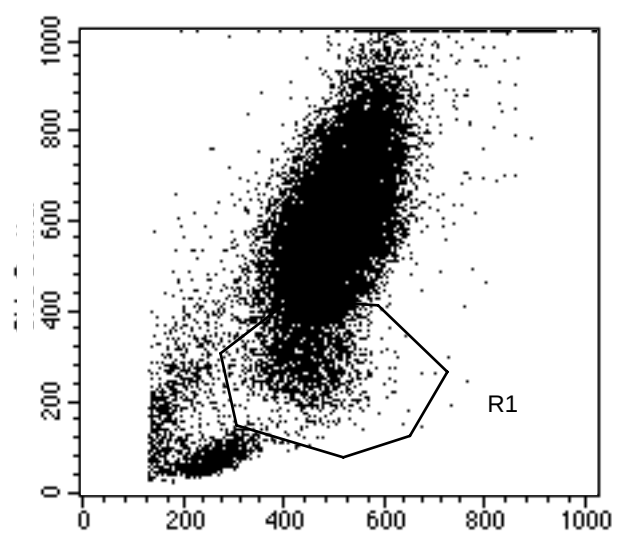
A leitura das amostras foi realizada em citômetro de fluxo FACSCalibur (BD Bioscience) equipado com dois lasers, um de argônio e outro de diodo, com emissão de comprimentos de ondas de 488 nm e 633 nm, respectivamente. O laser de argônio possibilita a excitação de três fluorocromos: FITC, PE e PerCP. O laser de diodo excita o fluorocromo APC. A detecção das fluorescências foi feita em escala logarítmica. As dispersões frontal e lateral de luz detectam, sem auxílio de fluorescência, tamanho e complexidade celular, respectivamente, e foram observadas em escala linear. Desta forma foi possível detectar até seis parâmetros para cada evento adquirido, sendo que cada evento foi considerado como uma célula. A detecção de cada parâmetro e compensação entre os canais de fluorescências foram acertados para aperfeiçoar a aquisição de eventos. O citômetro é acoplado a unidade constituída por microcomputador Macintosh Power PC, modelo G4 (Apple Computer Inc., Cupertino, CA, EUA), que permite controle sobre o citômetro e armazenamento dos dados em arquivos.

Utilizou-se um gráfico de dispersão frontal versus lateral de luz para identificação das populações de leucócitos. Desta forma foi possível estabelecer a região de monócitos (R1). Em outro gráfico combinou-se

dispersão lateral de luz versus expressão de CD14, que possibilitou a identificação das células positivas para este receptor, estabelecendo-se a janela R2 (figura 6). Através da combinação das janelas R1 e R2 foram adquiridos 5.000 eventos, ou seja, células que tivessem morfologia de monócitos e expressassem CD14 na superfície celular. Tanto a aquisição dos eventos quanto a análise dos resultados foram realizadas através do programa CellQuest (BD Bioscience).

Como mostrado na figura 7A, durante a análise dos dados foi utilizado gráfico de dispersão frontal versus lateral de luz definindo-se uma região na morfologia de monócitos/neutrófilos (R1). Em outro gráfico mostrando expressão de CD66b (neutrófilos) versus expressão de CD14 (monócitos), desenhou-se outra região (R2) nas células CD14+. Combinando os eventos contidos nas janelas R1 e R2 foi possível identificar os monócitos de maior tamanho e excluir a contaminação de neutrófilos (figura 7B). Para análise da expressão dos receptores TLR2, TLR4, CD11b e CD11c na superfície celular foram utilizados gráficos de histograma. Isotipos controles foram utilizados em cada situação (figura 7C).

Para análise da expressão de CD14 em monócitos utilizou-se estratégia similar, separando a região da morfologia de monócitos/neutrófilos (R1) e células CD66b negativas (R2), como mostrado na figura 8A. A combinação dos eventos contidos nas duas regiões foi analisada em gráfico de histograma para CD14 sendo a intensidade de expressão deste receptor verificada dentro da marcação M1 (figura 8B).



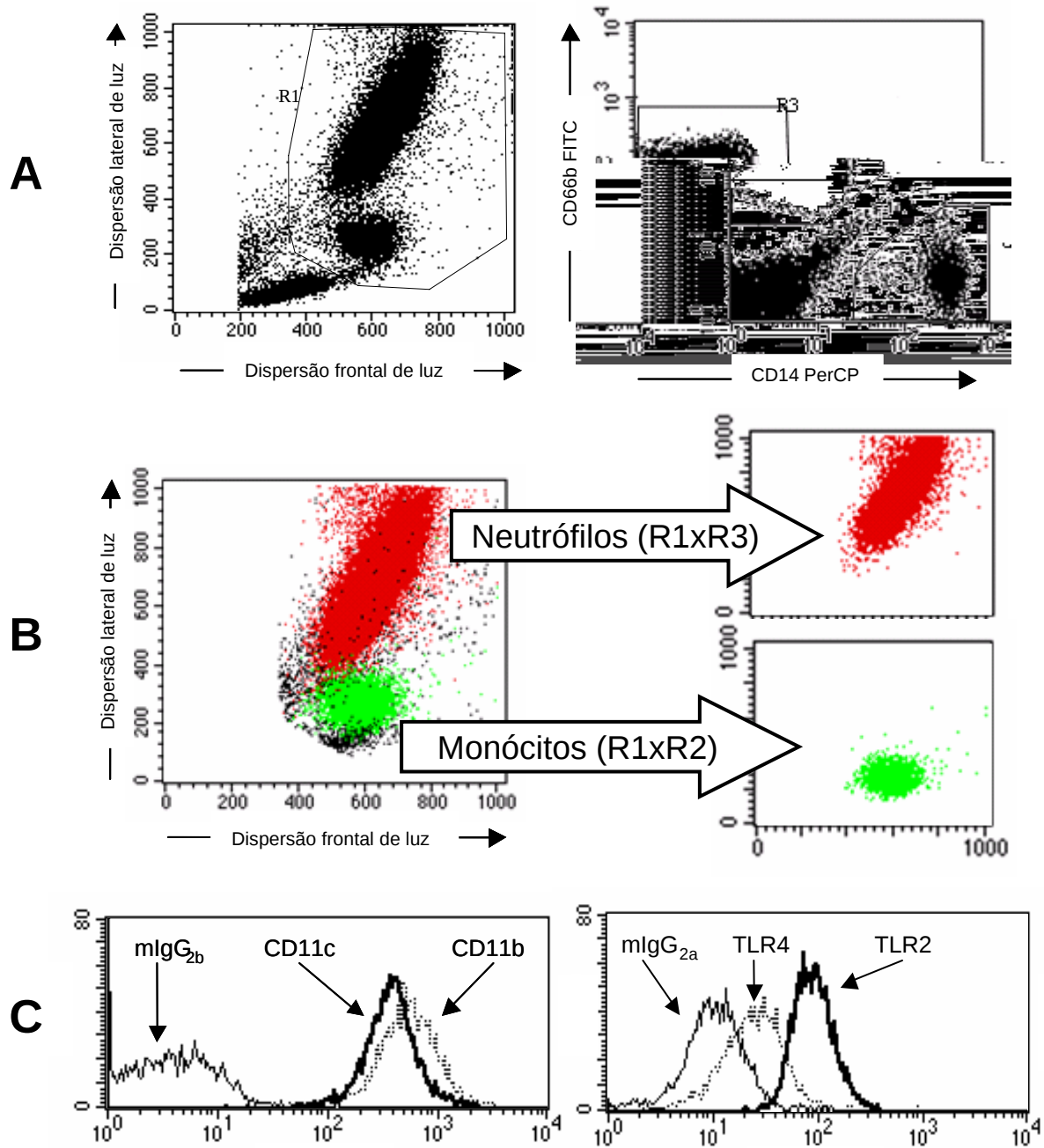


Figura 7: Estratégia de análise de monócitos em sangue total. **(A)** O gráfico a esquerda mostra a dispersão frontal e lateral de luz, correspondendo ao tamanho e complexidade celular, respectivamente. A região 1 (R1) separa a população característica de monócitos e neutrófilos. O gráfico da direita mostra na região 2 (R2) as células CD14⁺ (monócitos) e a região 3 (R3) mostra as células CD66b⁺ (neutrófilos). **(B)** A estratégia de análise proporciona uma boa definição das populações de monócitos (R1xR2) e neutrófilos (R1xR3). **(C)** Na população de monócitos identificados foi analisada a expressão dos receptores TLR2, TLR4, CD11b e CD11c através de histogramas. Isotipos controles foram usados em cada situação.

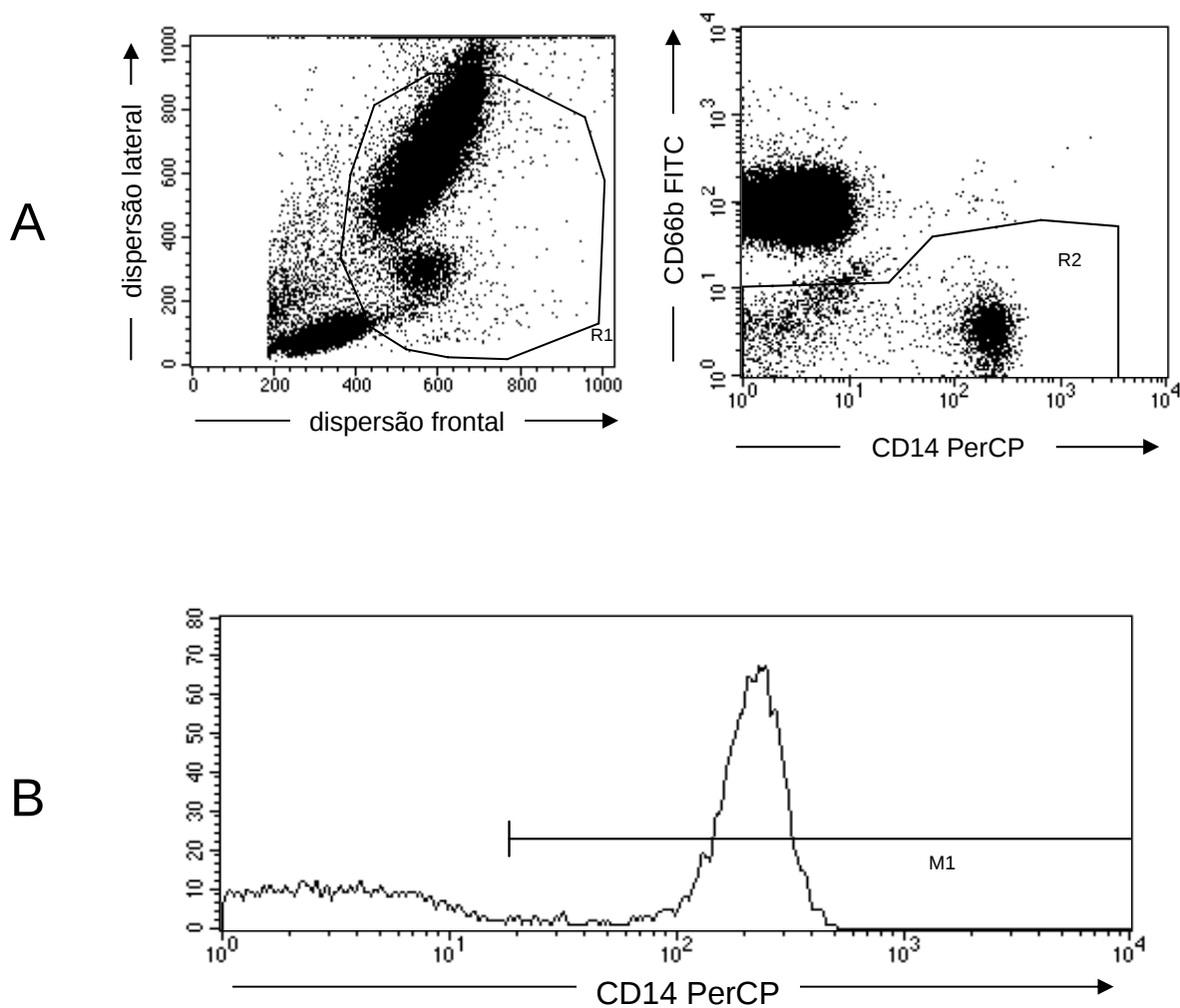


Figura 8: Estratégia de análise da intensidade de expressão do receptor CD14 em monócitos do sangue periférico. **(A)** A população de monócitos foi identificada combinando-se as regiões R1xR2. **(B)** O histograma mostra a análise da intensidade de expressão de CD14 na população de monócitos dentro da marcação M1.

Quadro 1: Características clínicas e epidemiologia dos pacientes sépticos (1 de 3).

Paciente	Idade	Estádio	Foco infeccioso	Culturas	Número de disfunções	SOFA D1	Comorbidades	Morte / sobrevivida 28 dias	Morte / sobrevivida hospitalar
01	67	Sepse	Pele / sangue	Cocos G (+)	-	-	Hepatopatia	Morte	-
02	32	Sepse	Cateter	Cocos G (+)	-	-	HAS / DM / IRC	Sobrevida	Sobrevida
03	20	Sepse	Amidalite	-	-	-	-	Sobrevida	Sobrevida
04	27	Sepse	ITU	-	-	-	-	Sobrevida	Sobrevida
05	59	Sepse	Pulmão	-	-	-	ICC	Sobrevida	Sobrevida
06	53	Sepse	Pulmão	-	-	-	-	Sobrevida	Sobrevida
07	65	Sepse	ITU	-	-	-	IRC	Sobrevida	Sobrevida
08	67	Sepse	Pulmão	-	-	-	DPOC	Sobrevida	Sobrevida
09	31	Sepse	ITU	-	-	-	-	Sobrevida	Sobrevida
10	19	Sepse	ITU	-	-	-	-	Sobrevida	Sobrevida
11	71	Sepse	ITU	-	-	-	HAS / AVC	Sobrevida	Sobrevida
12	43	Sepse	Pulmão	-	-	-	-	Sobrevida	Sobrevida
13	66	Sepse	Pulmão	-	-	-	DPOC	Sobrevida	Sobrevida
14	72	Sepse	Pulmão	-	-	-	DPOC	Sobrevida	Sobrevida

Quadro 1: Características clínicas e epidemiologia dos pacientes sépticos (2 de 3).

15		Sepse grave	-	-	-	-	-	-	-
16	79	Sepse grave	Pulmão	-	1	1	Parkinson	Sobrevida	Sobrevida
17	49	Sepse grave	Abdome agudo perfurativo	-	4	5	HAS / DM / IRC	Sobrevida	Morte
18	57	Sepse grave	Pulmão	-	2	4	HAS / IRC Tx renal	Sobrevida	Sobrevida
19	85	Sepse grave	ITU	-	2	-	Hepatopatia	Morte	-
20	66	Sepse grave	Pulmão	-	3	6	-	Morte	-
21	59	Sepse grave	Pulmão	<i>Acinetobacter</i>	2	5	-	Morte	-
22	78	Sepse grave	Abdome		2	3	HAS / FA crônica	Sobrevida	Sobrevida
23	23	Sepse grave	Pulmão	<i>Acinetobacter</i> <i>Klebsiella</i>	2	3	HAS / IRC / LES	Sobrevida	Sobrevida
24	79	Sepse grave	Pulmão	<i>Cocos G (+)</i>	2	4	AVC / RM	Morte	-
25	18	Sepse grave	Períneo	-	5	12	-	Sobrevida	Sobrevida
26		Sepse grave	Pulmão	-	4	9	HAS / DPOC	Morte	-
27	75	Choque	Abdome agudo obstrutivo	-	3	9	HAS / DM / ICC	Sobrevida	Morte
28	46	Choque	Abdome agudo perfurativo	-	4	8	-	Sobrevida	Sobrevida

Quadro 1: Características clínicas e epidemiologia dos pacientes sépticos (3 de 3).

29	60	Choque	ITU / Empiema vesicular	-	4	6	HAS / DM / IRC	Sobrevida	Morte
30	67	Choque	Sangue	<i>Pseudomonas</i>	3	4	HAS / DM / DAC	Sobrevida	Morte
31	30	Choque	Pulmão / ITU	<i>Enterococo</i> (urina)	2	6		Sobrevida	Sobrevida
32	72	Choque	Abdome		2	7	HAS / IRC	Morte	
33	20	Choque	Pulmão	-	2	4	-	Sobrevida	
34	40	Choque	Sangue / pulmão	<i>Pseudomonas</i> (LBA / sangue)	4	9	AVC	Sobrevida	Sobrevida
35	82	Choque	Sangue / pulmão	<i>E. coli</i> (urina) <i>S. aureus</i> (sangue) <i>Providencia</i> (traqueal)	4	11	HAS / DM / ICo / ICC	Morte	
36	72	Choque	Sangue / pele		5	12	Cirroze hepática	Morte	
37	52	Choque	Pulmão	-	3	7	HAS / DM / IRC	Morte	
38	87	Choque	Pulmão	<i>S. coagulase</i> – (sangue) <i>Pseudomonas</i> e <i>Proteus</i> (secre. traqueal)	5	13	HAS / IRC	Morte	
39	48	Choque	Pulmão	-	6	16			
40		Choque							
41	59	Choque	Pulmão	<i>Enterobacter</i> e <i>Acinetobacter</i> (secre traqueal)	5	13	HAS / DPOC	Morte	

3.5 Análise Estatística

Os dados obtidos com a análise dos ensaios de imunofenotipagem e ELISA foram transferidos a uma planilha de dados dos programas Excel 2003 (Microsoft, Corporation, Seatttle, WA, EUA) e SPSS 13.0 (SPSS Inc. and Predictive Analytics, Chicago, IL, EUA). Os valores obtidos com a ligação dos isotipos na imunofenotipagem e a produção de citocinas detectadas na condição sem estímulo foram subtraídos dos resultados. A comparação das variáveis foi realizada com o teste não paramétrico Kruskal-Wallis. A diferença estatística foi considerada significativa quando o valor de p observado foi menor que 0,05. As variáveis que apresentaram alterações entre os quatro grupos foram comparadas grupo a grupo pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney.

Após cálculo do logaritmo decimal (base 10) dos valores encontrados da produção de citocinas, foi realizado o teste de correlação de Pearson entre os receptores de superfície de monócitos e a produção de citocinas por CMSP frente aos estímulos de LPS, IL-1 β e TNF- α *in vitro*. A correlação foi considerada significativa quando o valor de p observado foi menor que 0,05.

3.6 Soluções e Meio de Cultura

3.6.1 Meio de cultura RPMI 1640 pH=7,0

Meio RPMI 1640 autoclavável (Sigma)

10 IU/mL penicilina G (Gibco, Gaithersburg, MD, EUA)

10 µg/mL estreptomicina sulfatada (Gibco)

200 mM L-glutamina (Sigma)

10% de soro fetal bovino (Gibco)

3.6.2 PBS 0,15 M pH = 7,2

NaCl 8,0 g (LabSynth, Diadema, SP, BR)

KH₂PO₄ 0,2 g (LabSynth)

Na₂HPO₄ 1,15 g (LabSynth)

KCl 0,2 g (LabSynth)

água destilada q.s.p. 1000 mL

3.6.3 PBS 1% azida de sódio

PBS 100mL

Na N₃ (Sigma) 1g

3.6.4 Tampão carbonato de sódio 0,1 M pH 9,5

Na₂CO₃ 3,56g (LabSynth)

NaHCO₃ 8,40g (LabSynth)

água destilada q.s.p. 1000 mL

Validade sete dias em geladeira (2 a 8°C).

3.6.5 Diluente de ensaio

PBS

10% FCS

3.6.6 LPS de *Salmonella abortus equi*

Obtido pelo método do fenol-água e purificado com fenol, clorofórmio e éter de petróleo, gentilmente cedido pelo Prof. Galanos, Instituto Max-Planck de Imunobiologia (Galanos *et al.*, 1979a).

4.1 Imunofenotipagem de monócitos em sangue periférico

4.1.1 Expressão de TLR2, TLR4 e mCD14

Não foi observada diferença estatística quando se compararam os quatro grupos estudados – indivíduos saudáveis, pacientes em sepse, sepse grave e choque séptico - quanto às expressões de TLR2 ($p=0,615$) e TLR4 ($p=0,873$) na superfície de monócitos, como mostrado nas figuras 9 e 10, respectivamente. Os valores obtidos no estudo das expressões de TLR2 e TLR4 estão nas tabelas 4 e 5, respectivamente.

Verificou-se diferença entre os grupos quanto à expressão de mCD14 ($p<0,001$). Quando os grupos foram analisados separadamente, observou-se diferença na expressão do mCD14 entre o grupo de voluntários saudáveis e os grupos de pacientes, saudáveis versus sepse $p=0,001$; saudáveis versus sepse grave $p<0,001$ e saudáveis versus choque séptico $p<0,001$. Demonstrou-se assim redução da expressão do receptor CD14 na superfície dos monócitos nos vários estádios da sepse em relação à ausência da infecção (figura 11 e tabela 6). Não foi observada diferença entre os grupos de pacientes.

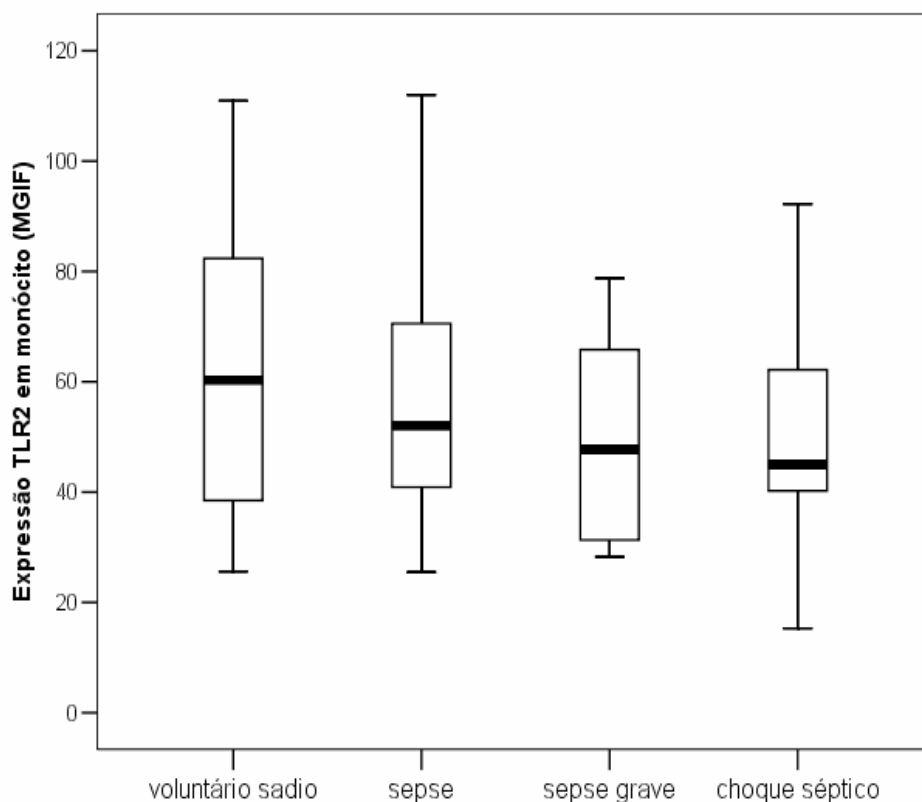


Figura 9: Expressão de TLR2 em monócitos do sangue periférico de indivíduos sadios e em diferentes estádios da sepse. Resultado de 17 voluntários sadios, 14 pacientes em sepse, 11 pacientes em sepse grave e 14 pacientes em choque séptico. Foram adquiridos 5000 eventos na janela de monócitos, combinando tamanho e complexidade das células e positividade para CD14. No gráfico os valores são mostrados em média geométrica da intensidade de fluorescência da expressão de TLR2. Estão representados os valores máximos e mínimos, o percentil 25% e 75% (caixas) e a mediana dos grupos. $p > 0,05$ na comparação entre os grupos (Kruskal-Wallis).

	sadio	sepse	sepse grave	choque séptico
média	61,9	60,1	50,0	51,7
mediana	60,3	52,1	47,8	45,0
mínimo	25,6	25,5	28,3	15,3
máximo	110,9	112,0	78,7	92,2
percentis				
25	38,4	39,8	31,0	39,2
75	83,6	75,1	73,4	68,0

Tabela 4: Expressão de TLR2 em monócitos do sangue periférico de indivíduos sadios e em diferentes estádios da sepse. Valores mostrados em média geométrica de intensidade de fluorescência.

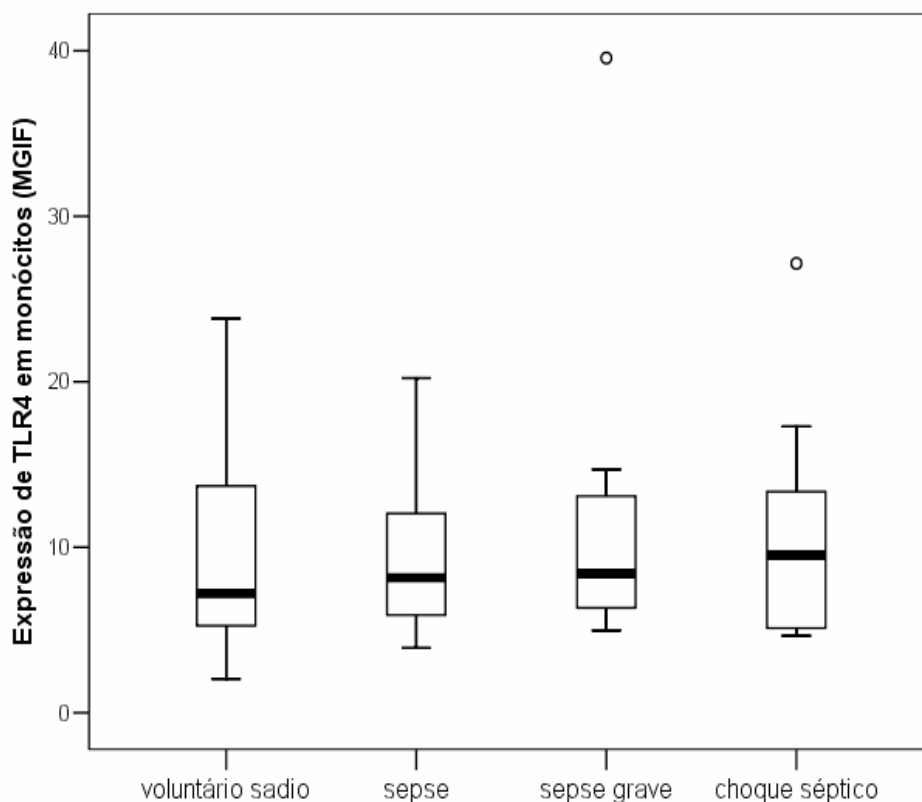


Figura 10: Expressão de TLR4 em monócitos do sangue periférico de indivíduos sadios e em diferentes estádios da sepse. Resultado de 17 voluntários sadios, 14 pacientes em sepse, 11 pacientes em sepse grave e 14 pacientes em choque séptico. Foram adquiridos 5000 eventos na janela de monócitos, combinando tamanho e complexidade das células e positividade para CD14. No gráfico os valores são mostrados em média geométrica da intensidade de fluorescência da expressão de TLR4. Estão representados os valores máximos e mínimos, o percentil 25% e 75% (caixas), mediana dos grupos e valores extremos (círculos). $p > 0,05$ na comparação entre os grupos (Kruskal-Wallis).

	sadio	sepse	sepse grave	choque séptico
média	9,4	9,7	11,9	10,3
mediana	7,2	8,2	8,4	9,5
mínimo	2,1	3,9	5,0	4,7
máximo	23,8	20,2	39,6	27,2
percentis				
25	5,1	5,8	5,9	5,1
75	14,3	13,2	14,7	13,4

Tabela 5: Expressão de TLR4 em monócitos do sangue periférico de indivíduos sadios e em diferentes estádios da sepse. Valores mostrados em média geométrica de intensidade de fluorescência.

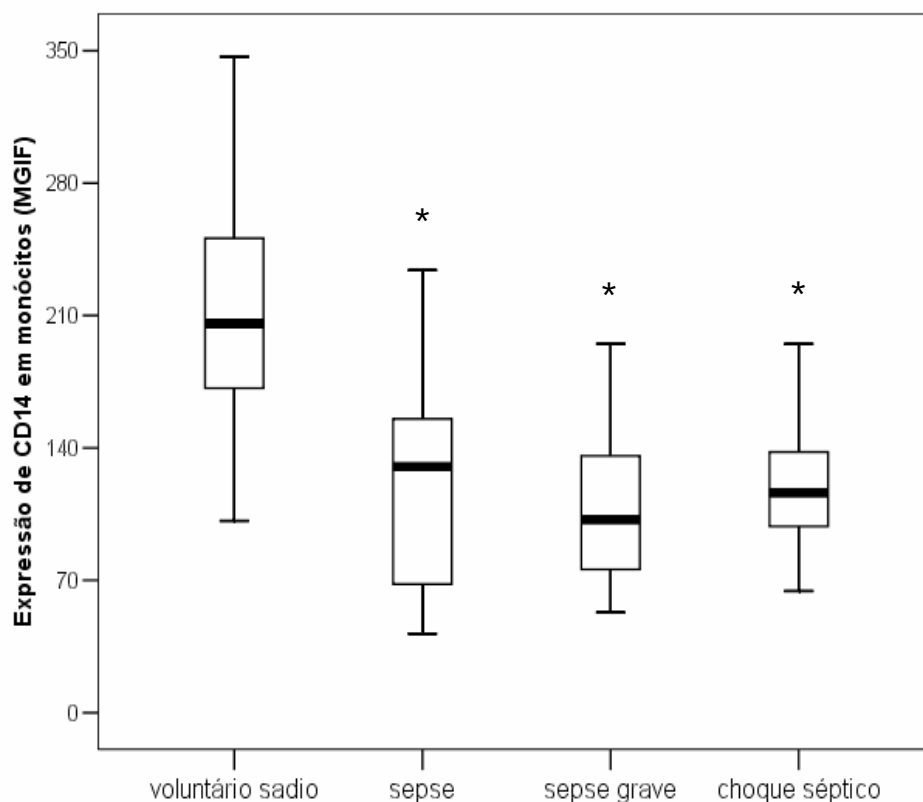


Figura 11: Expressão de CD14 em monócitos do sangue periférico de indivíduos saudáveis e em diferentes estádios da sepse. Resultado de 17 voluntários saudáveis, 14 pacientes em sepse, 11 pacientes em sepse grave e 15 pacientes em choque séptico. Foram adquiridos 5000 eventos na janela de monócitos, combinando tamanho e complexidade das células e positividade para CD14. No gráfico os valores são mostrados em média geométrica da intensidade de fluorescência da expressão de CD14. Estão representados os valores máximos e mínimos, o percentil 25% e 75% (caixas) e a mediana dos grupos. $p < 0,001$ na comparação entre os grupos (Kruskal-Wallis). * $p < 0,05$ em comparação com o grupo de voluntários saudáveis (Mann-Whitney).

	sadio	sepse	sepse grave	choque séptico
média	207,0	123,2	110,4	122,1
mediana	205,8	130,0	102,2	116,5
mínimo	101,5	41,7	53,0	64,3
máximo	346,8	234,0	195,0	195,0
percentis				
25	158,4	66,3	63,5	96,0
75	252,8	155,8	150,4	147,0

Tabela 6: Expressão de CD14 em monócitos do sangue periférico de indivíduos saudáveis e em diferentes estádios da sepse. Valores mostrados em média geométrica de intensidade de fluorescência.

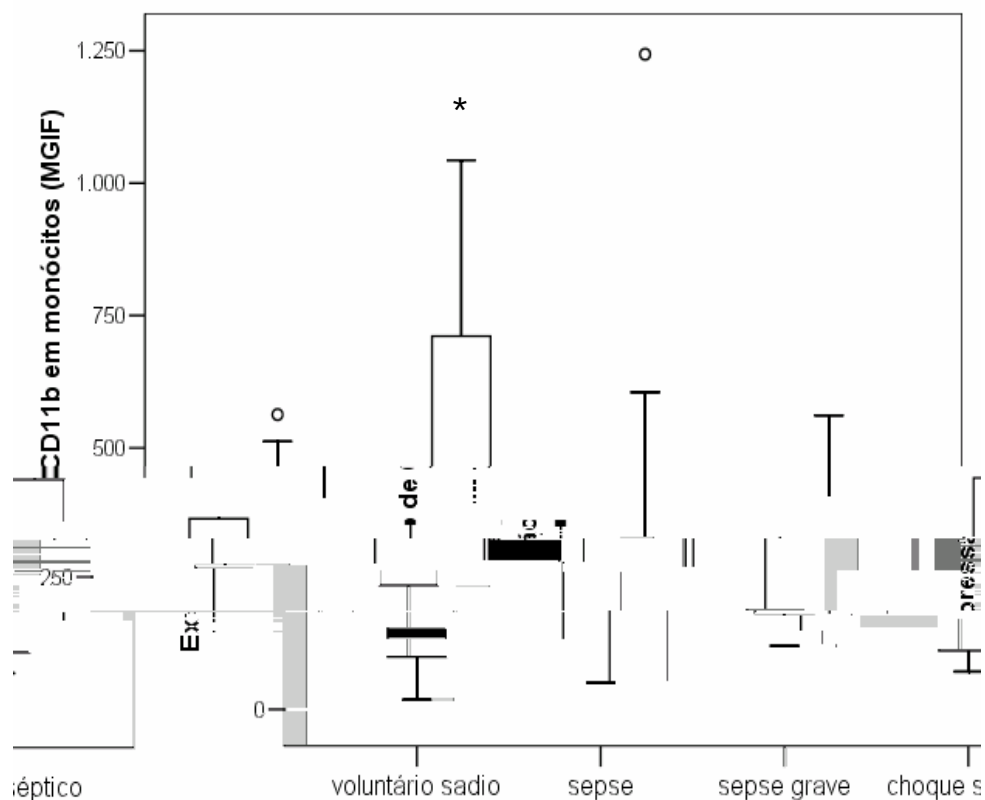


Figura 12: Expressão de CD11b em monócitos do sangue periférico de indivíduos sádios e em diferentes estádios da sepse. Resultado de 17 voluntários sádios, 14 pacientes em sepse, 11 pacientes em sepse grave e 15 pacientes em choque séptico. Foram adquiridos 5000 eventos na janela de monócitos, combinando tamanho e complexidade das células e positividade para CD14. No gráfico os valores são mostrados em média geométrica da intensidade de fluorescência da expressão de CD11b. Estão representados os valores máximos e mínimos, o percentil 25% e 75% (caixas), mediana dos grupos e valores extremos (círculos). $p=0,092$ na comparação entre os grupos (Kruskal-Wallis). $*p<0,05$ em comparação com o grupo de voluntários sádios (Mann-Whitney).

	sadio	sepse	sepse grave	choque séptico
média	203,0	411,9	375,2	251,6
mediana	144,2	272,7	268,5	179,1
mínimo	18,1	50,2	119,9	71,3
máximo	563,0	1.043,4	1.243,4	561,5
percentis				
25	93,7	213,1	140,0	96,5
75	278,0	715,9	582,4	424,1

Tabela 7: Expressão de CD11b em monócitos do sangue periférico de indivíduos sádios e em diferentes estádios da sepse. Valores mostrados em média geométrica de intensidade de fluorescência.

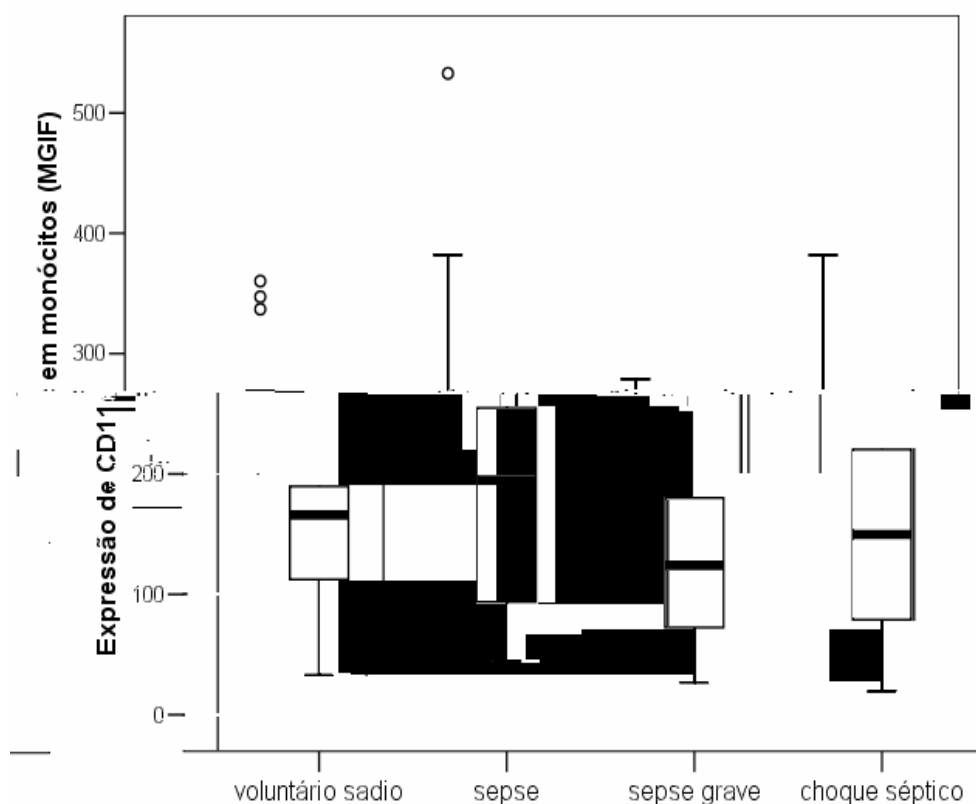


Figura 13: Expressão de CD11c em monócitos do sangue periférico de indivíduos sadios e em diferentes estádios da sepse. Resultado de 17 voluntários sadios, 14 pacientes em sepse, 11 pacientes em sepse grave e 15 pacientes em choque séptico. Foram adquiridos 5000 eventos na janela de monócitos, combinando tamanho e complexidade das células e positividade para CD14. No gráfico os valores são mostrados em média geométrica da intensidade de fluorescência da expressão de CD11c. Estão representados os valores máximos e mínimos, o percentil 25% e 75% (caixas), mediana dos grupos e valores extremos (círculos). $p > 0,05$ na comparação entre os grupos (Kruskal-Wallis).

	sadio	sepse	sepse grave	choque séptico
média	175,6	205,7	136,6	160,0
mediana	166,2	194,7	124,4	149,8
mínimo	32,9	44,5	26,9	19,4
máximo	360,3	532,9	278,8	381,9
percentis				
25	111,6	90,6	65,5	54,7
75	229,6	275,7	201,2	223,5

Tabela 8: Expressão de CD11c em monócitos do sangue periférico de indivíduos sadios e em diferentes estádios da sepse. Valores mostrados em média geométrica de intensidade de fluorescência.

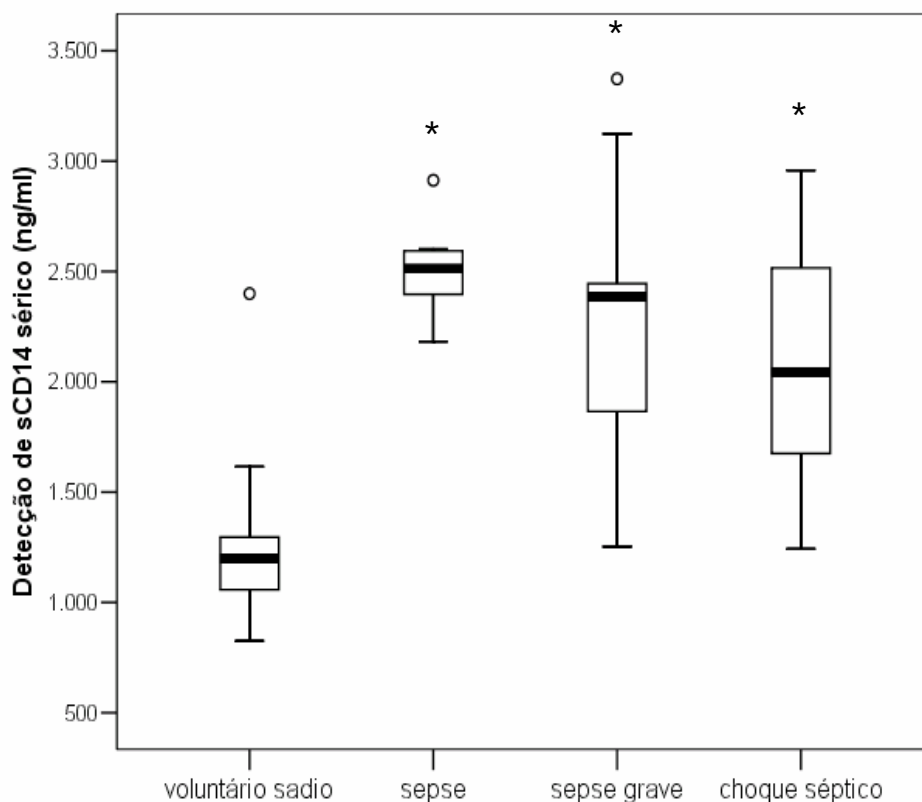


Figura 14: Dosagem de sCD14 em soro de indivíduos sadios e em diferentes estádios da sepse. Resultado de 10 voluntários sadios, 10 pacientes em sepse, 10 pacientes em sepse grave e 10 pacientes em choque séptico. No gráfico os valores são expressos em ng/ml. Estão representados os valores máximos e mínimos, o percentil 25% e 75% (caixas), mediana dos grupos e valores extremos (círculos). $p < 0,001$ na comparação entre os grupos (Kruskal-Wallis). * $p < 0,05$ em comparação com o grupo de voluntários sadios (Mann-Whitney).

	sadio	sepse	sepse grave	choque séptico
média	1.301,8	2.505,7	2.296,9	2.070,1
mediana	1.198,7	2.512,3	2.385,5	2.044,7
mínimo	825,5	2.181,7	1.252,6	1.242,3
máximo	2.399,4	2.912,7	3.372,7	2.957,9
percentis				
25	1.054,4	2.376,5	1.826,0	1.589,3
75	1.375,5	2.594,7	2.614,2	2.556,5

Tabela 9: Dosagem de sCD14 em soro de indivíduos sadios e em diferentes estádios da sepse. Valores expressos em ng/ml.

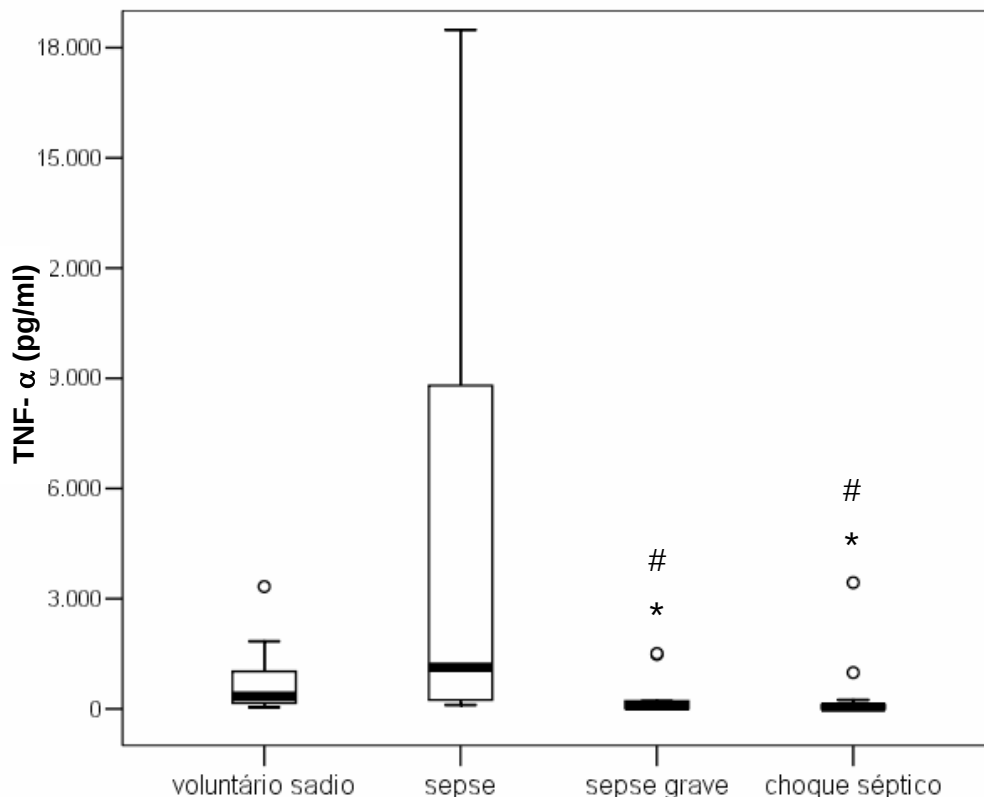


Figura 15: Produção de TNF- α induzida por LPS em sobrenadante de cultura de CMSP de indivíduos sadios e em diferentes estádios da sepse. Resultado de 16 voluntários sadios, 10 pacientes em sepse, 9 pacientes em sepse grave e 15 pacientes em choque séptico. No gráfico os valores são expressos em pg/ml. Estão representados os valores máximos e mínimos, o percentil 25% e 75% (caixas), mediana dos grupos e valores extremos (círculos). $p=0,001$ na comparação entre os grupos (Kruskal-Wallis). $*p<0,05$ em comparação com o grupo de voluntários sadios e $\#p<0,05$ em comparação com o grupo em sepse (Mann-Whitney).

	sadio	sepse	sepse grave	choque séptico
média	708,5	6.379,3	381,8	340,5
mediana	341,1	1.123,1	80,9	54,6
mínimo	43,9	107,8	0,0	0,0
máximo	3.328,6	31.569,7	1.506,7	3.436,6
percentis 25	139,8	217,3	5,2	0,0
75	1.060,2	11.223,1	847,8	132,8

Tabela 10: Produção de TNF- α induzida por LPS em sobrenadante de cultura de CMSP de indivíduos sadios e em diferentes estádios da sepse. Valores expressos em pg/ml.

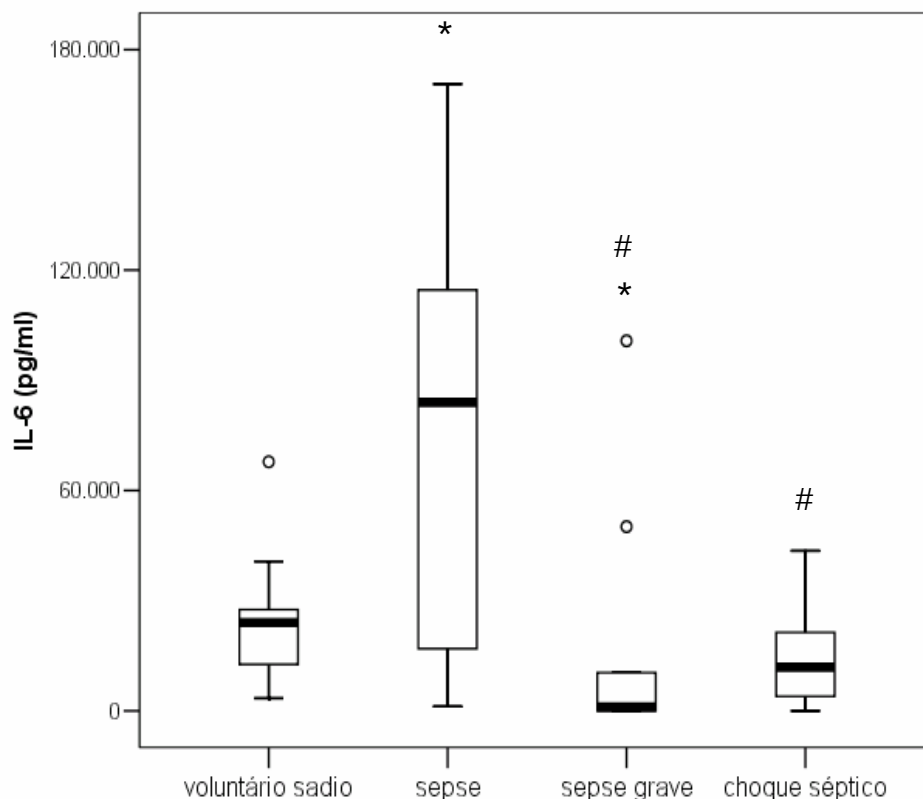


Figura 16: Produção de IL-6 induzida por LPS em sobrenadante de cultura de CMSP de indivíduos sadios e em diferentes estádios da sepse. Resultado de 16 voluntários sadios, 10 pacientes em sepse, 9 pacientes em sepse grave e 15 pacientes em choque séptico. No gráfico os valores são expressos em pg/ml. Estão representados os valores máximos e mínimos, o percentil 25% e 75% (caixas), mediana dos grupos e valores extremos (círculos). $p=0,006$ na comparação entre os grupos (Kruskal-Wallis). * $p<0,05$ em comparação com o grupo de voluntários sadios e # $p<0,05$ em comparação com o grupo em sepse (Mann-Whitney).

	sadio	sepse	sepse grave	choque séptico
média	23.156,2	77.524,6	18.299,3	14.296,0
mediana	23.967,9	84.056,5	1.085,8	11.974,7
mínimo	3.412,5	1.173,4	0,0	0,0
máximo	67.820,7	170.644,8	100.736,9	43.570,3
percentis				
25	11.322,4	14.412,3	0,0	2.153,1
75	28.376,4	123.579,4	30.273,1	22.003,1

Tabela 11: Produção de IL-6 induzida por LPS em sobrenadante de cultura de CMSP de indivíduos sadios e em diferentes estádios da sepse. Valores expressos em pg/ml.

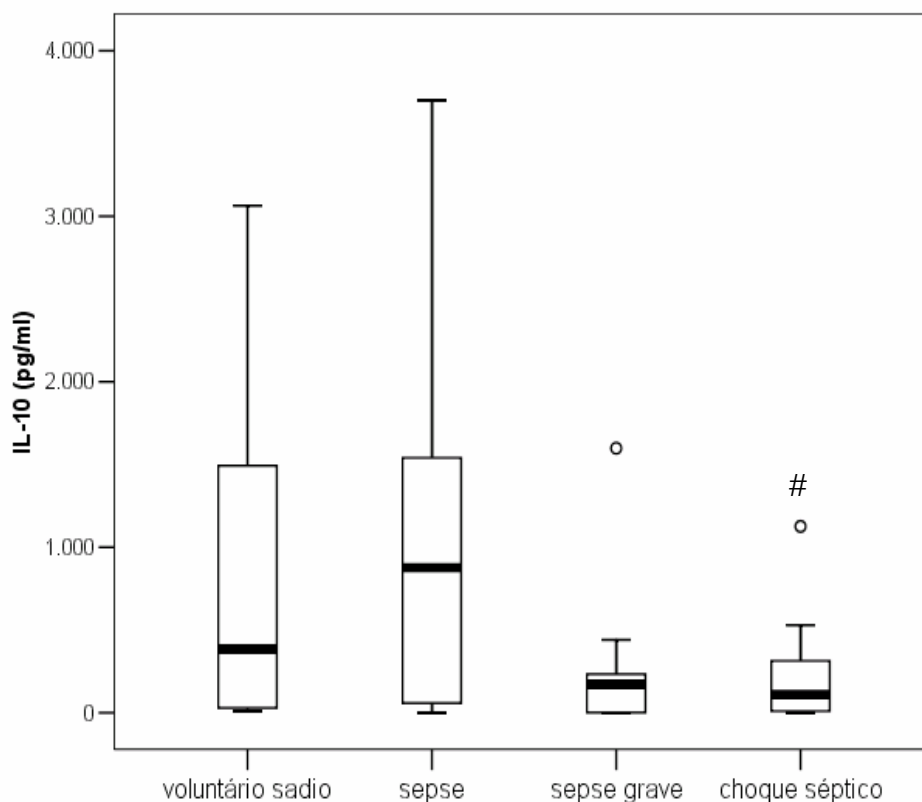


Figura 17: Produção de IL-10 induzida por LPS em sobrenadante de cultura de CMSP de indivíduos sadios e em diferentes estádios da sepse. Resultado de 16 voluntários sadios, 10 pacientes em sepse, 9 pacientes em sepse grave e 15 pacientes em choque séptico. No gráfico os valores são expressos em pg/ml. Estão representados os valores máximos e mínimos, o percentil 25% e 75% (caixas), mediana dos grupos e valores extremos (círculos). $p=0,076$ na comparação entre os grupos (Kruskal-Wallis). # $p<0,05$ em comparação com o grupo em sepse (Mann-Whitney).

	sadio	sepse	sepse grave	choque séptico
média	1.225,1	1.168,1	293,9	238,3
mediana	384,8	876,1	170,0	107,9
mínimo	9,1	0,0	0,0	0,0
máximo	7.786,0	3.700,2	1.598,3	1.126,0
percentis				
25	28,1	55,2	0,7	7,7
75	1.619,0	1.803,0	336,5	333,3

Tabela 12: Produção de IL-10 induzida por LPS em sobrenadante de cultura de CMSP de indivíduos sadios e em diferentes estádios da sepse. Valores expressos em pg/ml.

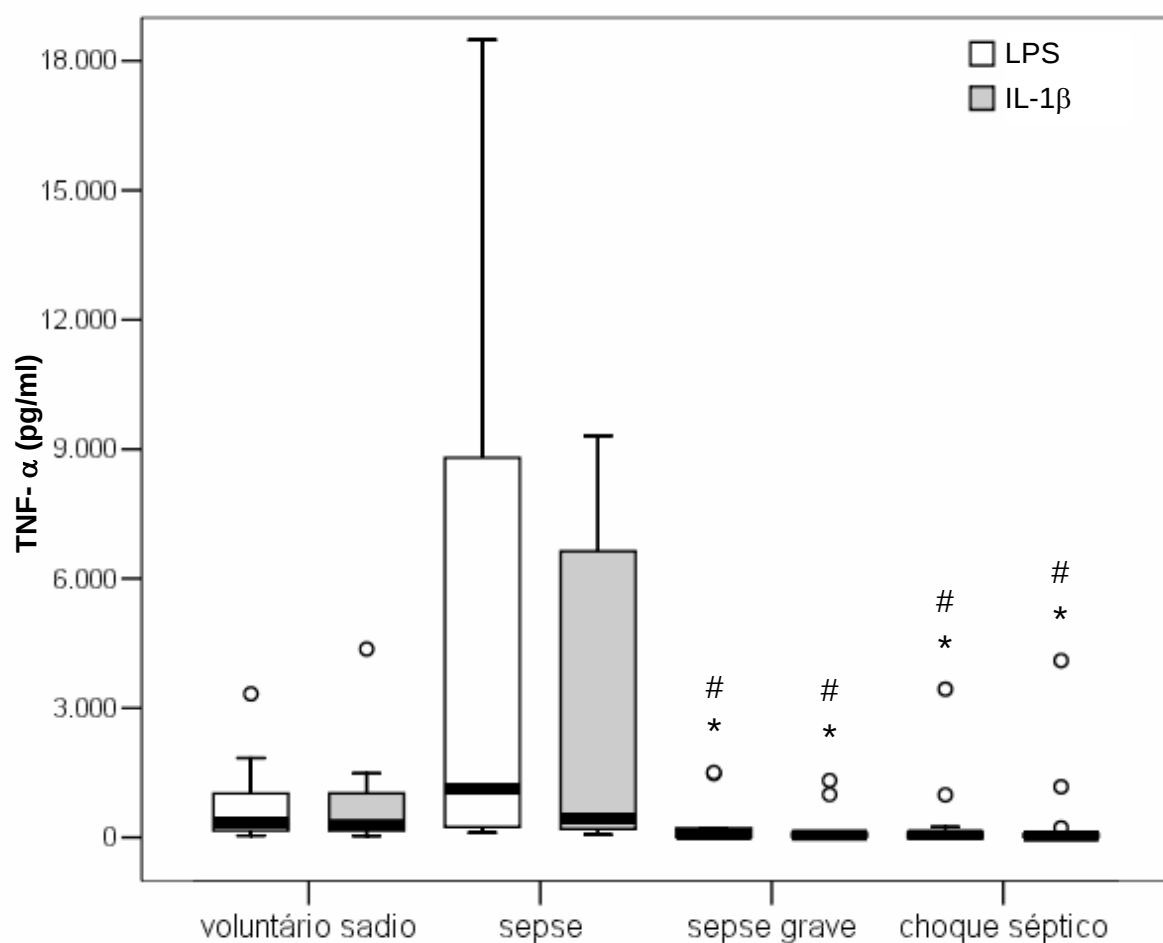


Figura 18: Produção de TNF- α induzida por LPS (caixas em branco) e IL-1 β (caixas em cinza) em sobrenadante de cultura de CMSP de indivíduos saudáveis e em diferentes estágios da sepse. Resultado de 16 voluntários saudáveis, 10 pacientes em sepse, 9 pacientes em sepse grave e 15 pacientes em choque séptico. No gráfico os valores são expressos em pg/ml. Estão representados os valores máximos e mínimos, o percentil 25% e 75% (caixas), mediana dos grupos e valores extremos (círculos). $p=0,001$ para ambos os estímulos na comparação entre os grupos (Kruskal-Wallis). * $p<0,05$ em comparação com o mesmo estímulo do grupo de voluntários saudáveis e # $p<0,05$ em comparação com o mesmo estímulo do grupo em sepse (Mann-Whitney).

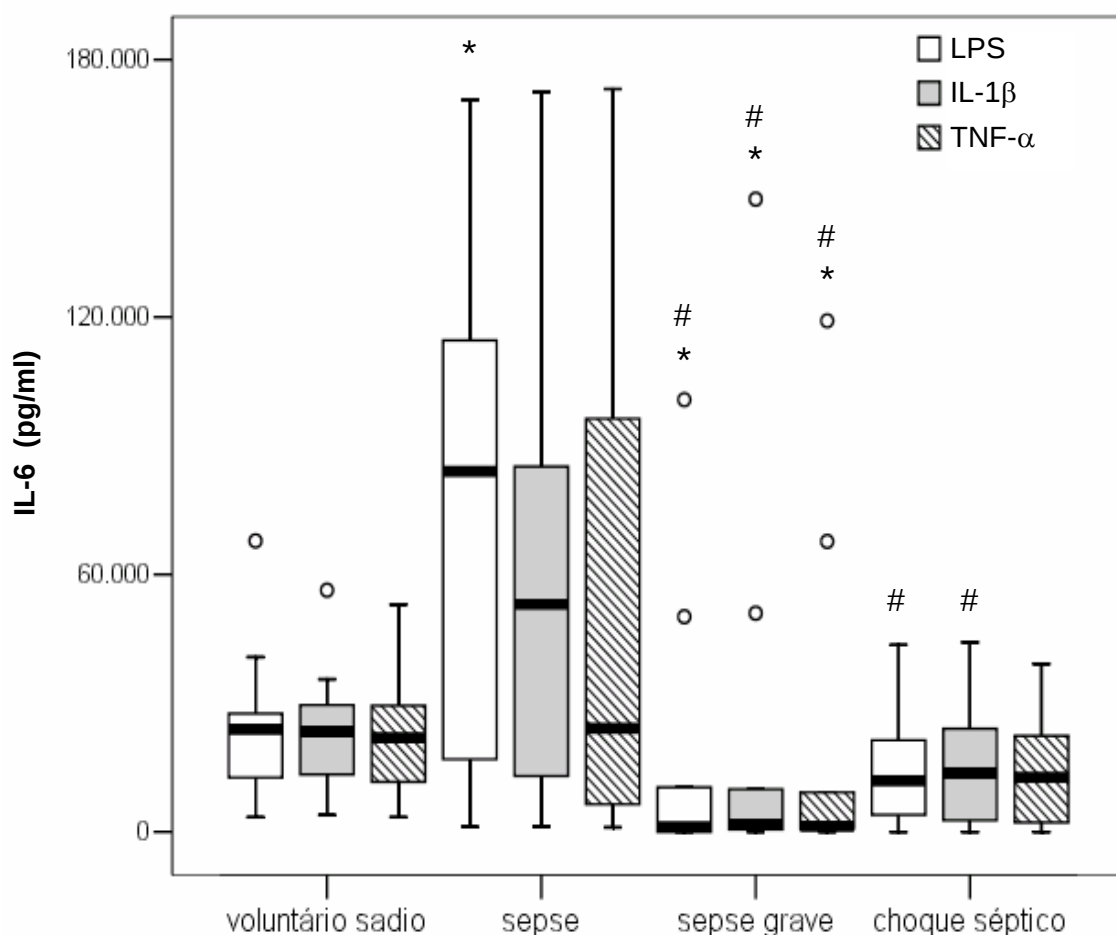


Figura 19: Produção de IL-6 induzida por LPS (caixas em branco) IL-1 β (caixas em cinza) e TNF- α (caixas em hachurado) em sobrenadante de cultura de CMSP de indivíduos sadios e em diferentes estádios da sepse. Resultado de 16 voluntários sadios, 10 pacientes em sepse, 9 pacientes em sepse grave e 15 pacientes em choque séptico. No gráfico os valores são expressos em pg/ml. Estão representados os valores máximos e mínimos, o percentil 25% e 75% (caixas), mediana dos grupos e valores extremos (círculos). $p < 0,05$ para os estímulos de LPS e IL-1 β na comparação entre os grupos (Kruskal-Wallis). * $p < 0,05$ em comparação com o mesmo estímulo do grupo de voluntários sadios e # $p < 0,05$ em comparação com o mesmo estímulo do grupo em sepse (Mann-Whitney).

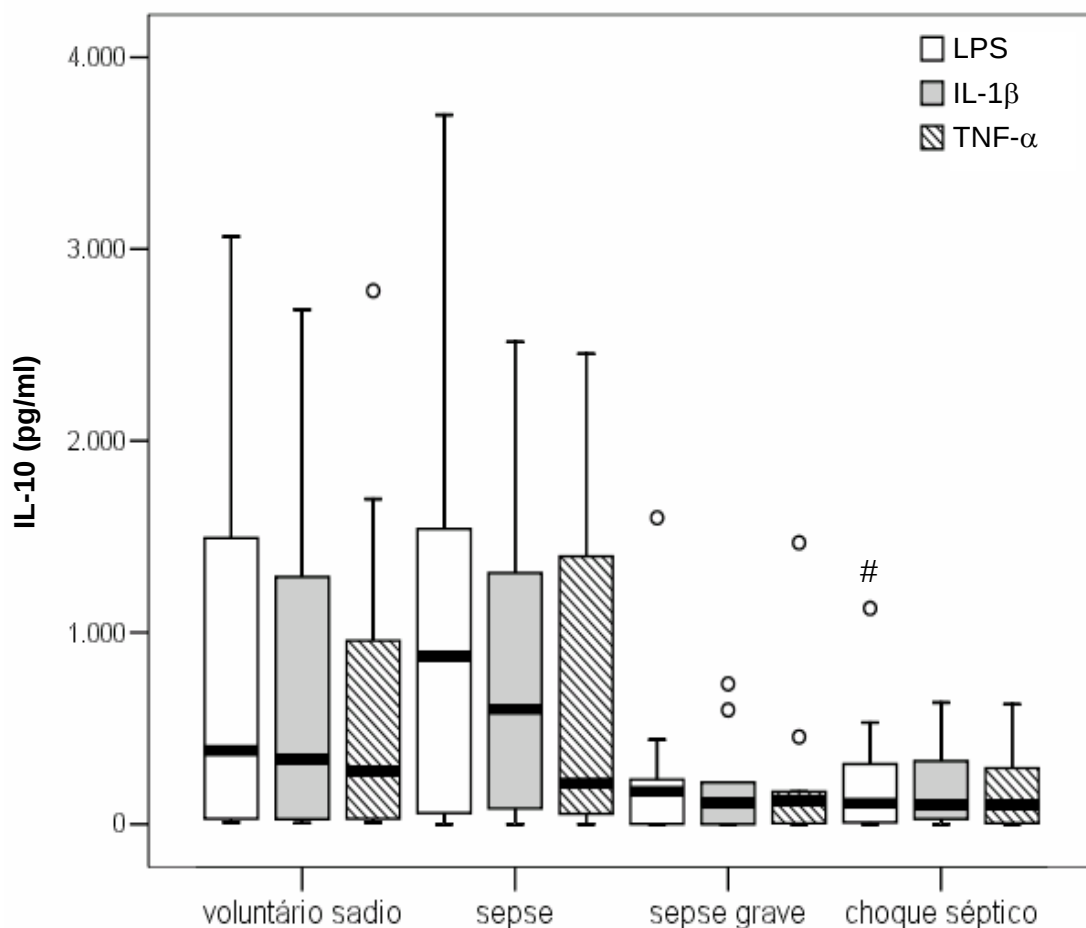


Figura 20: Produção de IL-10 induzida por LPS (caixas em branco) IL-1 β (caixas em cinza) e TNF- α (caixas em hachurado) em sobrenadante de cultura de CMSP de indivíduos sadios e em diferentes estádios da sepse. Resultado de 16 voluntários sadios, 10 pacientes em sepse, 9 pacientes em sepse grave e 15 pacientes em choque séptico. No gráfico os valores são expressos em pg/ml. Estão representados os valores máximos e mínimos, o percentil 25% e 75% (caixas), mediana dos grupos e valores extremos (círculos). $p > 0,05$ para todos os estímulos na comparação entre os grupos (Kruskal-Wallis). # $p < 0,05$ em comparação com o mesmo estímulo do grupo em sepse (Mann-Whitney).

4.1.2 Expressão de CD11b e CD11c

A figura 12 e a tabela 7 mostram a expressão de CD11b nos diferentes grupos estudados. Observou-se uma tendência de diferença entre os quatro grupos ($p=0,092$). Devido a este resultado, foi realizada a análise grupo a grupo. Quando se compararam o grupo de voluntários sadios com o de pacientes em sepse verificou-se uma maior expressão de CD11b no grupo em sepse ($p=0,032$). A mesma tendência foi observada no grupo de sepse grave em comparação com os sadios ($p=0,059$). Por outro lado, não se detectou diferença entre os pacientes em choque séptico e os sadios ($p=0,455$), assim como não se observou diferença entre os grupos de pacientes, conforme o estágio da sepse.

Quando se analisou a expressão de CD11c não foi observada diferença entre os quatro grupos ($p=0,598$) como mostrados na figura 13 e tabela 8.

	sadio		sepsse		sepsse grave		choque séptico	
	LPS	IL-1 β	LPS	IL-1 β	LPS	IL-1 β	LPS	IL-1 β
média	708,5	777,4	6.379,3	2.575,6	381,8	289,4	340,5	392,8
mediana	341,1	287,3	1.123,1	436,0	80,9	52,8	54,6	40,5
mínimo	43,9	41,1	107,8	66,4	0,0	0,0	0,0	0,0
máximo	3.328,6	4.368,1	31.569,7	9.307,6	1.506,7	1.320,7	3.436,6	4.100,4
percentis 25	139,8	141,3	217,3	164,4	5,2	7,4	0,0	0,0
75	1.060,2	1.032,3	11.223,1	6.810,6	847,8	550,5	132,8	92,8

Tabela 13: Produção de TNF- α induzida por LPS e IL-1 β em sobrenadante de cultura de CMSP de indivíduos sadios e em diferentes estádios da sepsse. Valores expressos em pg/ml.

	sadio			sepse			sepse grave			choque séptico		
	LPS	IL-1 β	TNF- α	LPS	IL-1 β	TNF- α	LPS	IL-1 β	TNF- α	LPS	IL-1 β	TNF- α
média	23.156,2	23.069,4	22.059,7	77.524,6	63.371,7	57.237,1	18.299,3	23.882,7	22.357,2	14.296,0	15.038,4	14.506,7
mediana	23.967,9	23.400,2	21.895,3	84.056,5	53.093,6	24.088,9	1.085,8	1.853,7	1.348,1	11.974,7	13.732,0	12.650,0
mínimo	3.412,5	3.908,0	3.415,4	1.173,4	1.260,4	1.011,9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
máximo	67.820,7	56.331,0	53.005,1	170.644,8	172.507,1	173.150,0	100.736,9	147.480,9	119.126,1	43.570,3	44.193,5	39.167,1
percentis	25	11.322,4	13.067,9	11.570,0	14.412,3	10.174,3	5.165,8	0,0	272,3	398,1	2.153,1	906,2
	75	28.376,4	30.231,3	30.468,3	123.579,4	101.211,8	110.607,7	30.273,1	30.447,9	38.440,5	22.003,1	27.951,6

Tabela 14: Produção de IL-6 induzida por LPS, IL-1 β e TNF- α em sobrenadante de cultura de CMSP de indivíduos sadios e em diferentes estádios da sepse. Valores expressos em pg/ml.

	sadio			sepse			sepse grave			choque séptico		
	LPS	IL-1 β	TNF- α	LPS	IL-1 β	TNF- α	LPS	IL-1 β	TNF- α	LPS	IL-1 β	TNF- α
média	1.225,1	887,0	880,1	1.168,1	781,9	662,3	293,9	208,2	264,3	238,3	207,4	184,0
mediana	384,8	337,0	277,5	876,1	601,2	211,7	170,0	112,9	121,5	107,9	101,1	100,7
mínimo	9,1	5,7	9,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
máximo	7.786,0	4.742,4	5.823,4	3.700,2	2.515,7	2.453,6	1.598,3	731,9	1.468,2	1.126,0	633,7	625,5
percentis 25	28,1	26,0	28,0	55,2	70,0	48,7	0,7	0,2	2,2	7,7	9,1	0,0
75	1.619,0	1.317,5	1.033,9	1.803,0	1.371,3	1.434,3	336,5	407,0	312,1	333,3	333,9	323,3

Tabela 15: Produção de IL-10 induzida por LPS, IL-1 β e TNF- α em sobrenadante de cultura de CMSP de indivíduos sadios e em diferentes estádios da sepse. Valores expressos em pg/ml.

4.2 Dosagem de sCD14 em soro

Quando se comparou a quantidade sérica de CD14 solúvel obtida nos quatro grupos observou-se diferença estatística ($p < 0,001$). Quando se compararam os grupos entre si, observou-se diferença do grupo de voluntários sadios em relação aos grupos de pacientes (sadios versus sepse $p < 0,001$; sadios versus sepse grave $p = 0,001$ e sadios versus choque séptico $p = 0,002$). Demonstrou-se, assim, aumento no nível sérico de sCD14 nos vários estádios da sepse em relação à ausência da infecção (figura 14 e tabela 9). Quando se comparou o grupo em sepse e o grupo em choque séptico verificou-se uma tendência à redução do nível sérico de sCD14 no grupo de pacientes com choque séptico ($p = 0,063$). Não foi observada diferença entre os demais grupos de pacientes.

4.3 Detecção da produção de TNF- α , IL-6 e IL-10 por células mononucleares do sangue periférico (CMSP) induzida por LPS

4.3.1 Produção de TNF- α induzida por LPS

A figura 15 e tabela 10 mostram a produção de TNF- α induzida por LPS nos grupos estudados. Quando se comparou a produção de TNF- α induzida por LPS entre os quatro grupos observou-se diferença estatística ($p=0,001$). Quando se compararam os grupos dois a dois, verificou-se que entre o grupo de voluntários sadios e pacientes em sepse não houve diferença ($p=0,121$), embora a variação da produção de TNF- α tenha sido maior no grupo em sepse. Foram detectados menores níveis desta citocina nos grupos de pacientes em sepse grave ($p=0,043$) e choque séptico ($p=0,002$) do que em voluntários sadios. O mesmo padrão de resposta foi encontrado quando se confrontaram os grupos de pacientes com sepse grave ($p=0,01$) e choque séptico ($p=0,001$) com os pacientes sépticos. Não foi observada diferença entre os pacientes em sepse grave e choque. Analisando os resultados obtidos, podem-se separar os quatro grupos dois a dois, sendo os voluntários sadios e pacientes em sepse aqueles que respondem ao LPS produzindo TNF- α e os pacientes em sepse grave e choque séptico que não produzem TNF- α em resposta ao LPS.

4.3.2 Produção de IL-6 induzida por LPS

Analisando-se a produção de IL-6 induzida por LPS encontrou-se diferença entre os quatro grupos estudados ($p=0,006$). No grupo em sepse obteve-se mediana 3,5 vezes maior do que a mediana do grupo de sadios, caracterizando diferença entre estes grupos, $p=0,04$ (figura 16 e tabela 11). Por outro lado, o grupo em sepse grave mostrou uma redução na produção de IL-6 em relação ao grupo de sadios ($p=0,037$). Entretanto, quando se compararam o grupo de sadios e pacientes em choque séptico, não foi detectada diferença significativa na produção de IL-6 ($p=0,078$). Ao se confrontar o grupo em sepse com os demais grupos de pacientes, sepse grave e choque séptico, percebeu-se redução da produção de IL-6 ($p=0,01$) em ambas as comparações. Não foi observada diferença entre o grupo em sepse grave e choque séptico ($p=0,32$).

4.3.3 Produção de IL-10 induzida por LPS

A produção de IL-10 induzida por LPS indica estar preservada entre os grupos ($p=0,076$), embora haja uma variação maior no grupo de sadios e em sepse quando comparado com os demais grupos de pacientes (figura 17 e tabela 12). Devido ao valor de p próximo a significância foi empregado o teste de Mann-Whitney. Não foi observada diferença entre os sadios e os grupos de pacientes. Quando se compararam os grupos de pacientes entre si detectou-se diferença na produção de IL-10 apenas entre o grupo em sepse e em choque séptico, existindo maior produção de IL-10 no grupo em sepse ($p=0,037$).

4.4 Produção de citocinas inflamatórias (TNF- α e IL-6) e antiinflamatória (IL-10) por CMSP induzida por LPS e por IL-1 β e TNF- α

Para investigar a possibilidade da hiper-resposta ou hiporresposta ao LPS ser dependente do reconhecimento e interação deste com a célula e da integridade de suas vias de sua sinalização, utilizamos como estímulos IL-1 β e TNF- α , que não utilizam os receptores TLRs e CD14, mas compartilham com o LPS parte da via de sinalização intracelular.

4.4.1 Produção de TNF- α induzida por LPS e IL-1 β

A produção de TNF- α foi similar frente aos estímulos de LPS e IL-1 β (figura 18 e tabela 13). Ao analisarem-se os grupos de indivíduos dois a dois, verificou-se diferença na produção de TNF- α induzida por LPS nos mesmos grupos onde se detectou diferença na produção de TNF- α induzida por IL-1 β . Os valores de p para o estímulo de LPS foram: sadio versus sepse grave (p=0,043), sadio versus choque séptico (p=0,002), sepse versus sepse grave (p=0,01) e sepse versus choque séptico (p=0,001). Os valores de p para o estímulo de IL-1 β foram: sadio versus sepse grave (p=0,015), sadio versus choque séptico (p=0,001), sepse versus sepse grave (p=0,22) e sepse versus choque séptico (p=0,002). Os grupos de voluntários sadios e em sepse mostraram produção de TNF- α preservada em relação aos grupos em sepse grave e choque séptico, não só frente ao estímulo de LPS, mas também frente ao estímulo de IL-1 β .

4.4.2 Produção de IL-6 induzida por LPS, IL-1 β e TNF- α

Em cada grupo estudado a produção de IL-6 induzida por LPS, IL-1 β e TNF- α apresentou uma magnitude de resposta bastante similar para os três estímulos utilizados, diferindo apenas no grupo em sepse (figura 19 e tabela 14). Entretanto, os quatro grupos diferiram entre si notadamente quando os estímulos empregados foram LPS ($p=0,006$) e IL-1 β ($p=0,015$), não sendo estatisticamente significante quando o estímulo foi o TNF- α ($p=0,093$). Ao comparar os indivíduos sadios com os em sepse tem-se diferença apenas para o estímulo com LPS ($p=0,04$), sendo a produção de IL-6 maior neste último grupo. A capacidade de resposta aos estímulos empregados mostrou-se reduzida no grupo em sepse grave quando confrontada com a produção de IL-6 encontrada nos grupos de sadios para os estímulos empregados: LPS ($p=0,037$); IL-1 β ($p=0,024$) e TNF- α ($p=0,032$). O mesmo tipo de resposta foi detectado quando confrontados os pacientes em sepse grave e em sepse para os estímulos utilizados: LPS ($p=0,01$); IL-1 β ($p=0,035$) e TNF- α ($p=0,05$). A produção de IL-6 não diferiu significativamente no grupo de sadios em relação ao grupo em choque séptico para nenhum dos estímulos aplicados. O grupo em sepse diferenciou-se do grupo em choque séptico na produção de IL-6 somente para os estímulos de LPS ($p=0,01$) e IL-1 β ($p=0,017$). Os grupos em sepse grave e em choque séptico apresentaram padrão de resposta bastante similar, não diferindo entre os estímulos empregados.

4.4.3 Produção de IL-10 induzida por LPS, IL-1 β e TNF- α

Apesar da variação da produção de IL-10 ser maior nos grupos de voluntários sadios e em sepse (figura 20 e tabela 15), não foi observada diferença entre os grupos estudados para os estímulos de LPS ($p=0,076$), IL-1 β ($p=0,135$) e TNF- α ($p=0,202$).

4.5 Correlações entre receptores de superfície, produção de citocinas *in vitro* e estímulos

Foi avaliada a correlação da expressão dos receptores na superfície celular e a indução de citocinas por LPS. A produção de TNF- α seguida ao estímulo com LPS correlacionou-se com a expressão de CD11c na superfície de monócitos (Correlação de Pearson: $R=0,461$). A produção de IL-6 correlacionou-se com diferentes receptores de superfície o mCD14, TLR4 e CD11c ($R=0,476$; $0,446$ e $0,412$, respectivamente). De forma similar, a produção de IL-10 seguida ao estímulo com LPS correlacionou-se com a expressão de mCD14 e TLR4 ($R=0,388$ e $0,456$, respectivamente). As mesmas correlações entre a produção de citocinas e receptores de membrana celular foram observadas quando as células foram estimuladas com IL-1 β e TNF- α (tabela 16).

Por outro lado, observamos que há uma correlação mais importante entre os estímulos utilizados e a produção *in vitro* de citocina. Assim, a correlação entre a produção de TNF- α induzida por LPS e IL-1 β foi de $0,874$. Resultados semelhantes são observados quanto à indução de IL-6, havendo correlação entre os estímulos de LPS e IL-1 β ($R=0,913$), LPS e TNF- α ($R=0,889$) e IL-1 β e TNF- α ($R=0,989$). O mesmo se observa quanto à produção de IL-10, onde se nota uma forte correlação entre os diferentes estímulos: LPS e IL-1 β ($R=0,984$), LPS e TNF- α ($R=0,961$) e IL-1 β e TNF- α ($R=0,936$).

Estes resultados apontam para um padrão de resposta ao LPS e aos demais estímulos utilizados, IL-1 β e TNF- α , sendo questionável o papel dos receptores de superfície avaliados.

estímulo	citocina	mCD14	TLR4	TLR2	CD11b	CD11c
LPS	TNF- α	0,238	0,126	0,225	0,315	0,461*
	IL-6	0,476*	0,446*	0,239	0,227	0,412*
	IL-10	0,388*	0,456*	0,122	0,003	0,282
IL-1 β	TNF- α	0,234	0,228	0,205	0,282	0,447*
	IL-6	0,384*	0,465*	0,186	0,248	0,391*
	IL-10	0,416*	0,394*	0,079	-0,074	0,256
TNF- α	IL-6	0,352*	0,413*	0,086	0,222	0,348*
	IL-10	0,361*	0,404*	0,009	0,079	0,250

Tabela 16: Correlação entre os receptores de superfície de monócitos e a produção de citocinas por CMSP frente aos estímulos de LPS, IL-1 β e TNF- α *in vitro*. Foi obtido o logaritmo decimal (base 10) dos valores das concentrações de citocinas, em seguida utilizou-se o teste de correlação de Pearson. A tabela mostra os valores de R obtidos. *p<0,05.

5.0 Discussão

Nossos resultados mostram que os receptores da superfície celular de monócitos estão diferentemente regulados na sepse. Assim, não se observou diferença na expressão de TLR2 e TLR4 entre os voluntários sadios e pacientes com sepse, sepse grave e choque séptico, houve aumento da expressão de CD11b, queda de expressão de mCD14 com concomitante

semelhante ao grupo controle (Harter *et al.*, 2004). Calvano *et al.* (2003) observaram aumento da expressão de TLR4 e expressão inalterada de TLR2 em sangue total de pacientes sépticos em relação a sadios. Entretanto a estratégia utilizada para a aquisição e análise de monócitos naquele estudo foi baseada em tamanho e complexidade celular, sendo uma técnica menos específica do que utilizada no presente trabalho (Wittebole *et al.*, 2005). Nosso estudo é o primeiro a analisar a expressão dos receptores TLR2 e TLR4 na sepse humana em sangue total utilizando duas marcações de superfície para discriminar populações celulares combinada ao tamanho e complexidade celular. Esta análise foi possível devido à utilização simultânea dos anticorpos CD66b e CD14, que resultaram em nítida separação das populações de neutrófilos e monócitos, respectivamente. A definição da população de monócitos tem sido objeto de intensa investigação (Ziegler-Heitbrock, 2000). O emprego do sangue total na imunofenotipagem retrata com fidelidade a expressão dos receptores de superfície porque exclui a possibilidade de alterações causadas pela separação de células por gradiente de densidade, como ficoll, ou procedimentos de adesão (Ertel *et al.*, 1993).

Nossos dados mostram expressão de TLR2 e TLR4 inalterada no *continuum* da sepse em relação aos indivíduos sadios, o que nos leva a concluir que estes receptores não são responsáveis isoladamente pelo quadro de regulação negativa observado durante a sepse. Além disso, trabalhos anteriores não mostraram correlação da expressão do TLR2 ou TLR4 com sobrevida (Armstrong *et al.*, 2004) ou gravidade (Tsujimoto *et al.*, 2005).

Em nossos pacientes a expressão de mCD14 mostrou ser menor do que nos voluntários sadios, mas não houve diferença entre os três grupos de

pacientes sépticos. Esta queda de expressão se deve a liberação ou clivagem proteolítica do receptor presente em monócitos, macrófagos e neutrófilos para a circulação, que pode ocorrer naturalmente ou induzida por LPS (Landmann *et al.*, 1995). Conseqüentemente, os níveis de CD14 solúvel foram mais altos nos pacientes, como um espelho da expressão de CD14 na superfície celular. Este aumento pode ter sido subestimado nos pacientes mais graves, já que estes recebem grande reposição de volume, causando diminuição da concentração sérica do sCD14. A presença de sCD14 e HDL no plasma durante a sepse teria a propriedade de minimizar a inflamação sistêmica ligando-se a endotoxina. O controle da inflamação sistêmica dos leucócitos pode ser benéfico prevenindo a coagulação disseminada, disfunção de órgão e choque, mantendo a inflamação nos sítios de invasão microbiana (Kitchens *et al.*, 2001). Diminuição da expressão de mCD14 em monócitos (Ertel *et al.*, 1993; Hiki *et al.*, 1998) e aumento do sCD14 têm sido descrito em pacientes sépticos, (Landmann *et al.*, 1995; Hiki *et al.*, 1998) contudo também há relatos de expressão preservada (Calvano *et al.*, 2003; Tsujimoto *et al.*, 2005). O aumento do sCD14 não é um fenômeno exclusivo da sepse, já que foi detectado em poli-traumatizados (Kruger *et al.*, 1991). Embora a diminuição da produção de TNF- α frente ao LPS possa ser correlacionada com queda da expressão de mCD14 em monócitos de pacientes com choque séptico, redução dos níveis de TNF- α foi encontrada em pacientes com choque cardiogênico que mostraram expressão conservada de mCD14 (de Werra *et al.*, 2001). Na sepse, Ertel *et al.* observaram níveis normais de mRNA de TNF- α , IL-1 β e IL-6, apesar da menor expressão de mCD14 em monócitos de pacientes sépticos (Ertel *et al.*, 1993). Concomitante, observaram expressão de CD11b preservada. Então, sugerem

que na sepse o LPS poderia estar utilizando o complexo CD11/CD18 ou outros receptores para ligar-se a superfície celular e induzir ativação.

A análise da expressão dos receptores CD11/CD18 é interessante na sepse, pois são moléculas de adesão expressas em monócitos e neutrófilos, indicando estado de ativação celular, também envolvidas na opsonização de microorganismos e há indícios de uma sinalização intracelular em comum com CD14 (Van Amersfoort *et al.*, 2003). Alguns estudos observaram aumento da expressão de CD11b em monócitos de pacientes sépticos, em relação aos indivíduos sadios (Ertel *et al.*, 1993; Muller Kobold *et al.*, 2000). De fato, encontramos tendência à diferença quanto à expressão de CD11b em monócitos, detectando-se uma maior expressão apenas no grupo de pacientes em estágio inicial da sepse em relação aos voluntários sadios. Os resultados de expressão normal de CD11b, queda expressão de mCD14 e regulação negativa da produção de citocinas inflamatórias nos grupos de pacientes mais graves são concordantes com o modelo de interação entre os receptores CD14, TLR4 e CD11b/CD18 em macrófago murino na resposta ao LPS, segundo o qual a resposta completa ao LPS só aconteceria através da presença dos três receptores (Perera *et al.*, 2001). Entretanto, este modelo não se encaixa para o grupo em sepse, que demonstrou forte capacidade de resposta frente ao LPS, mensurada através da produção de citocinas, a despeito da queda de expressão de mCD14. Segundo o modelo, não há um efeito compensatório causado pelo aumento da expressão de CD11b/CD18, pois a afinidade do CD14 pelo LPS é muito maior.

A atividade funcional das células mononucleares foi avaliada através da produção de citocinas inflamatórias (TNF- α e IL-6) e antiinflamatória (IL-10).

Encontrou-se uma regulação positiva da produção de citocinas inflamatórias no estágio inicial da sepse, seguida de uma importante regulação negativa nos estágios tardios, ou seja, pacientes em sepse grave e choque séptico. É essencial ressaltar que, apesar da aceitação deste conceito, comprovado em estudo experimentais, há uma escassez de dados em pacientes clínicos na fase inicial da sepse (Riedemann *et al.*, 2003). Estudo realizado em pacientes que procuraram o serviço de emergência observou padrão semelhante de citocinas inflamatórias na fase inicial da sepse, ou seja, aumento sérico de TNF- α e IL-6 em comparação com os grupos com infecção sem SIRS e sem infecção com SIRS (Sekine *et al.*, 2004). Desta forma, enquanto nossos dados confirmam a regulação negativa das citocinas inflamatórias observadas na sepse grave e choque séptico, (Munoz *et al.*, 1991; Salomao *et al.*, 2002; Rigato & Salomao, 2003) eles evidenciam uma regulação positiva no estágio inicial da sepse, que pode estar relacionado ao reconhecimento dos patógenos, já que esta foi mais pronunciada para o LPS do que para a IL-1 β e menos ainda para o TNF- α . Este resultado é concordante com a hipótese de patogênese da sepse, onde no estágio inicial após a infecção há o surgimento de citocinas inflamatórias e antiinflamatórias. O estágio tardio é caracterizado por persistente desativação do monócito e aumento do risco morte (Bone *et al.*, 1997; Riedemann *et al.*, 2003).

De forma diversa das citocinas inflamatórias, observamos produção normal de IL-10 nos pacientes com sepse em relação aos sadios. Nesta direção, Sekine *et al.* (2004) não observaram diferença no nível sérico de IL-10 de pacientes em fase inicial da sepse em relação aos grupos com infecção sem SIRS e sem infecção com SIRS. No presente estudo, a produção de IL-10 está

relativamente preservada nos grupos mais graves (sepse grave e choque séptico), concordante com resultados anteriores de nosso grupo (Rigato & Salomao, 2003). Preservação da produção de IL-10 e redução de produção de TNF- α e IL-6 também foram demonstradas em paciente com trauma, nos quais a via de ativação de IL-10 está regulada positivamente em relação aos indivíduos sadios (Adib-Conquy *et al.*, 2003). Nossos resultados mostraram um aumento da produção de IL-10 no grupo em sepsis em relação ao choque séptico frente ao LPS. Desta forma, demonstramos uma forte capacidade de resposta ao LPS no grupo de sepsis, medida através da produção de citocinas, tanto inflamatórias quanto antiinflamatória, retratando um quadro de intensa ativação celular neste grupo de pacientes.

Houve importante correlação observada entre a produção das citocinas IL-6 e IL-10 frente ao estímulo de LPS e a expressão dos receptores na superfície celular do monócito, mCD14, TLR4 e CD11c. Embora tais receptores sejam de suma importância para a ativação induzida pelo LPS, este não parece ser um fenômeno específico, já que a produção de citocina por outros estímulos como a IL-1 β e o TNF- α , que utilizam outros receptores de superfície, também se correlacionaram com a expressão dos receptores mCD14, TLR4 e CD11c. Ainda, foram observados os mesmos padrões de produção de citocinas frente aos estímulos de LPS, TNF- α e IL-1 β , com forte correlação entre o nível de citocina induzida pelos diferentes estímulos. Estes dados nos levam a acreditar que a regulação da resposta celular na sepsis não está restrita a estes receptores e apontam para mecanismo que envolva via intracelular comum aos três estímulos.

Este dado é reforçado pelo padrão de expressão de receptores e produção de citocinas durante o *continuum* das manifestações da sepse. Como mencionado, não houve diferença entre os voluntários sadios e o grupo de pacientes quanto às expressões de TLR2 e TLR4. A importante queda de mCD14 e aumento do sCD14 poderiam explicar a menor produção de citocina nos estágios tardios da sepse, entretanto não foi observada diferença na expressão e nível sérico entre os grupos mais grave e os pacientes em sepse, que tiveram um pronunciado aumento da resposta ao LPS. Por outro lado, o aumento da expressão de CD11b nos monócitos de pacientes com sepse comparado aos voluntários sadios poderia ser associado com aumento da resposta ao LPS, mas a expressão de CD11b não pode explicar a pronunciada regulação negativa observada nos estágios tardios da sepse.

A aplicação de método desenvolvido em nosso laboratório (Brunialti *et al.*, 2002) mostrou que a hiporresposta em pacientes com sepse grave e choque séptico ocorre, apesar da ligação do LPS aos monócitos estar preservada, indicando que este fenômeno poderia estar relacionado com a sinalização intracelular (Salomao *et al.*, 2002). Neste estudo demonstrou-se que esta resposta está diminuída apesar da expressão normal de TLR2 e TLR4. Este resultado é concordante com os trabalhos publicados, que não observaram queda da expressão destes receptores em pacientes sépticos (Calvano *et al.* 2003; Armstrong *et al.*, 2004; Harter *et al.*, 2004; Tsujimoto *et al.*, 2005). Em modelos experimentais, hiporresposta ao LPS foi observada na presença de expressão normal de TLR4 em macrófagos de camundongos quando a tolerância foi induzida por um estímulo dependente de TLR2 (MALP-2) (Sato *et al.*, 2000). É importante destacar que experimentos *in vitro*

relacionaram a tolerância com diminuição da formação do complexo TLR4-MyD88, com comprometimento da ativação de IRAK-1, mas não da expressão de TLR4 na superfície celular (Medvedev *et al.*, 2002). A associação de TLR4 a MyD88 pode estar prejudicada pela presença de proteínas supressoras, como a MyD88s (Hopkins & Sriskandan, 2005; Liew *et al.*, 2005). Entretanto, os dados também mostram que monócitos de pacientes em sepse grave e choque séptico são hiporresponsivos a IL1- β e ao TNF- α , apontando para uma modulação em ponto comum da cascata de ativação celular desencadeada por LPS, TNF- α e IL1- β . Uma regulação negativa da produção de IL-6 também foi encontrada em pacientes com trauma frente aos mesmos estímulos (Adib-Conquy *et al.*, 2003). Zhang *et al.* (1999) demonstraram que o ponto de convergência da sinalização intracelular para os três estímulos se dá no complexo de quinases indutoras de NF- κ B. Um possível mecanismo é a modulação do NF- κ B, proposto em células tolerantes onde o LPS desencadeia a mobilização do NF- κ B com predominância dos homodímeros (p50/p50) em comparação às células normais, que mostram predominância dos heterodímeros (p50/p65) (Ziegler-Heitbrock *et al.*, 1994; 1995), regulando negativamente a resposta inflamatória. Células mononucleares do sangue periférico de pacientes com sepse grave sobreviventes mostraram reduzida expressão das duas formas de NF- κ B, e com sepse grave não sobreviventes mostraram grande quantidade da forma inativa (p50/p50), assemelhando-se ao fenômeno da tolerância (Adib-Conquy *et al.*, 2003).

O presente estudo confirma a regulação negativa das citocinas inflamatórias observadas na sepse grave e choque séptico e acrescenta evidência de uma resposta aumentada nos estágios iniciais da sepse, que

pode estar relacionada ao reconhecimento de patógenos, já que esta foi mais pronunciada para o LPS do que para a IL-1 β e TNF- α . Em contraste, a regulação negativa observada em pacientes com sepse grave e choque séptico parece estar relacionada a eventos comuns a cascata intracelular de LPS, IL-1 β e TNF- α . Novos estudos estão sendo conduzidos em nosso laboratório visando detectar passos da sinalização da ativação intracelular que possam estar comprometidos.

Conclusões

1. As expressões dos receptores de superfície nos monócitos estão diversamente moduladas na sepse. TLR2, TLR4 e CD11c não sofrem alteração nos diferentes estádios. Há aumento da expressão de CD11b no grupo de sepse em relação ao grupo de choque séptico. O CD14 mostra grande modulação nos pacientes em relação aos sadios, havendo menor detecção de sua forma de superfície (mCD14) e aumento da forma solúvel (sCD14), sugerindo que tenha havido clivagem proteolítica do receptor.

2. A produção de citocinas inflamatórias, notadamente para IL-6, sofre grande modulação durante o continuum da sepse, apresentando regulação positiva no estágio inicial (sepse) e negativa nos estágios mais graves (sepse grave e choque séptico). A modulação da citocina antiinflamatória, IL-10, é menos pronunciada. Não se observa o aumento de sua produção na fase inicial e o decréscimo nos estádios finais não é significativo em relação aos sadios.

3. A correlação encontrada entre os receptores de superfície e a produção de citocinas frente aos estímulos utilizados e a correlação obtida entre a produção de citocinas frente aos estímulos de LPS, TNF- α e IL-1 β , nos dá indícios que a ativação celular sofre regulação na cascata de sinalização intracelular, resultando em hiper-resposta na sepse e em hiporresposta na sepse grave e choque séptico.

Referências

Adib-Conquy M, Moine P, Asehnoune K, Edouard A, Espevik T, Miyake K *et al.* Toll-like receptor-mediated tumor necrosis factor and interleukin-10 production differ during systemic inflammation. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003;168(2):158-64.

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

Armstrong L, Medford AR, Hunter KJ, Uppington KM, Millar AB. Differential expression of Toll-like receptor (TLR)-2 and TLR-4 on monocytes in human sepsis. *Clin Exp Immunol.* 2004;136(2):312-9.

Bartholeyns J, Freudenberg M, Galanos C. Growing tumors induce hypersensitivity to endotoxin and tumor necrosis factor. *Infect Immun.* 1987;55(9):2230-3.

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

Bone RC, Sibbald WJ, Sprung CL. The ACCP-SCCM consensus conference on sepsis and organ failure. *Chest.* 1992a;101:(6)1481-3

Bone RC, Sprung CL, Sibbald WJ. Definitions for sepsis and organ failure. *Crit Care Med.* 1992b;20(6):724-6.

Bone RC, Grodzin CJ, Balk RA. Sepsis: a new hypothesis for pathogenesis of the disease process. *Chest.* 1997;112(1):235-43.

Brunialti MK, Kallas EG, Freudenberg M, Galanos C, Salomao R. Influence of EDTA and heparin on lipopolysaccharide binding and cell activation, evaluated at single-cell level in whole blood. *Cytometry.* 2002;50(1):14-8.

Calvano JE, Agnese DM, Um JY, Goshima M, Singhal R, Coyle SM *et al.* Modulation of the lipopolysaccharide receptor complex (CD14, TLR4, MD-2) and Toll-like receptor 2 in systemic inflammatory response syndrome-positive patients with and without infection: relationship to tolerance. *Shock.* 2003;20(5):415-9.

Cohen J. The immunopathogenesis of sepsis. *Nature.* 2002;420(6917):885-91.

de Werra I, Zanetti G, Jaccard C, Chiolerio R, Schaller MD, Yersin B *et al.* CD14 expression on monocytes and TNF alpha production in patients with septic shock, cardiogenic shock or bacterial pneumonia. *Swiss Med Wkly.* 2001;131(3-4):35-40.

Dobrovolskaia MA, Vogel SN. Toll receptors, CD14, and macrophage activation and deactivation by LPS. *Microbes Infect.* 2002;4(9):903-14.

Dunne A, O'Neill LA. Adaptor usage and Toll-like receptor signaling specificity. *FEBS Lett.* 2005;579(15):3330-5.

Ertel W, Krombach F, Kremer JP, Jarrar D, Thiele V, Eymann J *et al.* Mechanisms of cytokine cascade activation in patients with sepsis: normal cytokine transcription despite reduced CD14 receptor expression. *Surgery.* 1993;114(2):243-50; discussion 50-1.

Ertel W, Kremer JP, Kenney J, Steckholzer U, Jarrar D, Trentz O *et al.* Downregulation of proinflammatory cytokine release in whole blood from septic patients. *Blood.* 1995;85(5):1341-7.

Ertel W, Keel M, Neidhardt R, Steckholzer U, Kremer JP, Ungethuem U *et al.* Inhibition of the defense system stimulating interleukin-12 interferon-gamma pathway during critical illness. *Blood.* 1997;89(5):1612-20.

Fitting C, Dhawan S, Cavaillon JM. Compartmentalization of tolerance to endotoxin. *J Infect Dis.* 2004;189(7):1295-303.

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

Galanos C, Freudenberg MA, Luderitz O, Rietschel ET, Westphal O. Chemical, physicochemical and biological properties of bacterial lipopolysaccharides. *Prog Clin Biol Res.* 1979a;29:321-32.

Galanos C, Freudenberg MA, Reutter W. Galactosamine-induced sensitization to the lethal effects of endotoxin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1979b;76(11):5939-43.

Galanos C, Luderitz O, Rietschel ET, Westphal O, Brade H, Brade L *et al.* Synthetic and natural *Escherichia coli* free lipid A express identical endotoxic activities. *Eur J Biochem.* 1985;148(1):1-5.

Galanos C, Freudenberg M, Katschinski T, Salomao R, Mossmann H, Kumazawa Y. In: Ryan J, Morrison DC, editor. Bacterial endotoxin lipopolysaccharides. CRC Press.; 1992. p.75-104.

Galanos C, Freudenberg MA. Mechanisms of endotoxin shock and endotoxin hypersensitivity. *Immunobiology.* 1993;187(3-5):346-56.

Gallay P, Heumann D, Le Roy D, Barras C, Glauser MP. Lipopolysaccharide-binding protein as a major plasma protein responsible for endotoxemic shock. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90(21):9935-8.

Gay NJ, Keith FJ. *Drosophila* Toll and IL-1 receptor. *Nature.* 1991;351(6325):355-6.

- Granowitz EV, Porat R, Mier JW, Orencole SF, Kaplanski G, Lynch EA *et al.* Intravenous endotoxin suppresses the cytokine response of peripheral blood mononuclear cells of healthy humans. *J Immunol.* 1993;151(3):1637-45.
- Harter L, Mica L, Stocker R, Trentz O, Keel M. Increased expression of Toll-like receptor-2 and -4 on leukocytes from patients with sepsis. *Shock.* 2004;22(5):403-9.
- Hehlhans T, Pfeffer K. The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. *Immunology.* 2005;115(1):1-20.
- Heumann D, Gallay P, Betz-Corradin S, Barras C, Baumgartner JD, Glauser MP. Competition between bactericidal/permeability-increasing protein and lipopolysaccharide-binding protein for lipopolysaccharide binding to monocytes. *J Infect Dis.* 1993;167(6):1351-7.
- Hiki N, Berger D, Prigl C, Boelke E, Wiedeck H, Seidelmann M *et al.* Endotoxin binding and elimination by monocytes: secretion of soluble CD14 represents an inducible mechanism counteracting reduced expression of membrane CD14 in patients with sepsis and in a patient with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Infect Immun.* 1998;66(3):1135-41.
- Hopkins PA, Sriskandan S. Mammalian Toll-like receptors: to immunity and beyond. *Clin Exp Immunol.* 2005;140(3):395-407.
- Hotchkiss RS, Karl IE. The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med.* 2003;348(2):138-50.
- Ingalls RR, Golenbock DT. CD11c/CD18, a transmembrane signaling receptor for lipopolysaccharide. *J Exp Med.* 1995;181(4):1473-9.
- Jack RS, Fan X, Bernheiden M, Rune G, Ehlers M, Weber A *et al.* Lipopolysaccharide-binding protein is required to combat a murine gram-negative bacterial infection. *Nature.* 1997;389(6652):742-5.
- Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik M. Introdução à imunobiologia e à imunidade inata. In: Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik M, editores. *Imunobiologia.* Porto Alegre: Artmed Editora S.A.; 2001. p.55-111.
- Janssens S, Beyaert R. Role of Toll-like receptors in pathogen recognition. *Clin Microbiol Rev.* 2003;16(4):637-46.
- Johnston CA, Greisman SE. In: Hinshaw LB, editores. *Handbook of endotoxin. Pathophysiology of endotoxin.* New York: Elsevier; 1985. p.359.
- Kalis C, Kanzler B, Lembo A, Poltorak A, Galanos C, Freudenberg MA. Toll-like receptor 4 expression levels determine the degree of LPS-susceptibility in mice. *Eur J Immunol.* 2003;33(3):798-805.

- Katschinski T, Galanos C, Coumbos A, Freudenberg MA. Gamma interferon mediates *Propionibacterium acnes*-induced hypersensitivity to lipopolysaccharide in mice. *Infect Immun*. 1992;60(5):1994-2001.
- Kitchens RL, Thompson PA, Viriyakosol S, O'Keefe GE, Munford RS. Plasma CD14 decreases monocyte responses to LPS by transferring cell-bound LPS to plasma lipoproteins. *J Clin Invest*. 2001;108(3):485-93.
- Kruger C, Schutt C, Obertacke U, Joka T, Muller FE, Knoller J *et al*. Serum CD14 levels in polytraumatized and severely burned patients. *Clin Exp Immunol*. 1991;85(2):297-301.
- Landmann R, Zimmerli W, Sansano S, Link S, Hahn A, Glauser MP *et al*. Increased circulating soluble CD14 is associated with high mortality in gram-negative septic shock. *J Infect Dis*. 1995;171(3):639-44.
- Li Q, Verma IM. NF-kappaB regulation in the immune system. *Nat Rev Immunol*. 2002;2(10):725-34.
- Liew FY, Xu D, Brint EK, O'Neill LA. Negative regulation of Toll-like receptor-mediated immune responses. *Nat Rev Immunol*. 2005;5(6):446-58.
- Lorenz E, Mira JP, Frees KL, Schwartz DA. Relevance of mutations in the TLR4 receptor in patients with gram-negative septic shock. *Arch Intern Med*. 2002;162(9):1028-32.
- Madigan M, Martinko J, Parker J. Cell Biology. In: Madigan M, Martinko J, Parker J, editores. *Brock Biology of Microorganisms*. Upper Saddle River: Prentice-Hall, Inc.; 1997. p.77.
- Marra MN, Wilde CG, Collins MS, Snable JL, Thornton MB, Scott RW. The role of bactericidal/permeability-increasing protein as a natural inhibitor of bacterial endotoxin. *J Immunol*. 1992;148(2):532-7.
- Martin GS, Mannino DM, Eaton S, Moss M. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med*. 2003;348(16):1546-54.
- Martin MU, Wesche H. Summary and comparison of the signaling mechanisms of the Toll/interleukin-1 receptor family. *Biochim Biophys Acta*. 2002;1592(3):265-80.
- Martins PS, Kallas EG, Neto MC, Dalboni MA, Blecher S, Salomao R. Upregulation of reactive oxygen species generation and phagocytosis, and increased apoptosis in human neutrophils during severe sepsis and septic shock. *Shock*. 2003;20(3):208-12.
- Matsuura M, Galanos C. Induction of hypersensitivity to endotoxin and tumor necrosis factor by sublethal infection with *Salmonella typhimurium*. *Infect Immun*. 1990;58(4):935-7.

Medvedev AE, Lentschat A, Wahl LM, Golenbock DT, Vogel SN. Dysregulation of LPS-induced Toll-like receptor 4-MyD88 complex formation and IL-1 receptor-associated kinase 1 activation in endotoxin-tolerant cells. *J Immunol.* 2002;169(9):5209-16.

Medzhitov R, Janeway CA, Jr. Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell.* 1997;91(3):295-8.

Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA, Jr. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature.* 1997;388(6640):394-7.

Muller Kobold AC, Tulleken JE, Zijlstra JG, Sluiter W, Hermans J, Kallenberg CG *et al.* Leukocyte activation in sepsis; correlations with disease state and mortality. *Intensive Care Med.* 2000;26(7):883-92.

Munoz C, Carlet J, Fitting C, Misset B, Bleriot JP, Cavaillon JM. Dysregulation of in vitro cytokine production by monocytes during sepsis. *J Clin Invest.* 1991;88(5):1747-54.

Nomura F, Akashi S, Sakao Y, Sato S, Kawai T, Matsumoto M *et al.* Cutting edge: endotoxin tolerance in mouse peritoneal macrophages correlates with down-regulation of surface Toll-like receptor 4 expression. *J Immunol.* 2000;164(7):3476-9.

Opal SM, Scannon PJ, Vincent JL, White M, Carroll SF, Palardy JE *et al.* Relationship between plasma levels of lipopolysaccharide (LPS) and LPS-binding protein in patients with severe sepsis and septic shock. *J Infect Dis.* 1999;180(5):1584-9.

Ozinsky A, Underhill DM, Fontenot JD, Hajjar AM, Smith KD, Wilson CB *et al.* The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between Toll-like receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(25):13766-71.

Perera PY, Mayadas TN, Takeuchi O, Akira S, Zaks-Zilberman M, Goyert SM *et al.* CD11b/CD18 acts in concert with CD14 and Toll-like receptor (TLR) 4 to elicit full lipopolysaccharide and taxol-inducible gene expression. *J Immunol.* 2001;166(1):574-81.

Pittet D, Wenzel RP. Nosocomial bloodstream infections. Secular trends in rates, mortality, and contribution to total hospital deaths. *Arch Intern Med.* 1995;155(11):1177-84.

Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, Van Huffel C, Du X *et al.* Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in *Tlr4* gene. *Science.* 1998;282(5396):2085-8.

Riedemann NC, Guo RF, Ward PA. Novel strategies for the treatment of sepsis. *Nat Med.* 2003;9(5):517-24.

- Rietschel ET, Schade U, Jensen M, Wollenweber HW, Luderitz O, Greisman SG. Bacterial endotoxins: chemical structure, biological activity and role in septicaemia. *Scand J Infect Dis Suppl.* 1982;31(8-21).
- Rietschel ET, Kirikae T, Schade FU, Mamat U, Schmidt G, Loppnow H *et al.* Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. *Faseb J.* 1994;8(2):217-25.
- Rigato O, Silva E, Kallas EG, Brunialti MK, Martins PS, Salomao R. Pathogenetic aspects of sepsis and possible targets for adjunctive therapy. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord.* 2001;1(1):13-30.
- Rigato O, Salomao R. Impaired production of interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha but not of interleukin 10 in whole blood of patients with sepsis. *Shock.* 2003;19(2):113-6.
- Salomao R, Wey SB, Pignatari AC, Castelo Filho A. [Epidemiology of bacteremias at a university hospital]. *Rev Assoc Med Bras.* 1992;38(2):62-6.
- Salomao R, Castelo Filho A, Pignatari AC, Wey SB. Nosocomial and community acquired bacteremia: variables associated with outcomes. *Rev Paul Med.* 1993;111(6):456-61.
- Salomao R, Rigato O, Pignatari AC, Freudenberg MA, Galanos C. Bloodstream infections: epidemiology, pathophysiology and therapeutic perspectives. *Infection.* 1999;27(1):1-11.
- Salomao R, Brunialti MK, Kallas EG, Martins PS, Rigato O, Freudenberg M. Lipopolysaccharide-cell interaction and induced cellular activation in whole blood of septic patients. *J Endotoxin Res.* 2002;8(5):371-79.
- Sato S, Nomura F, Kawai T, Takeuchi O, Muhlradt PF, Takeda K *et al.* Synergy and cross-tolerance between Toll-like receptor (TLR) 2- and TLR4-mediated signaling pathways. *J Immunol.* 2000;165(12):7096-101.
- Schumann RR, Leong SR, Flaggs GW, Gray PW, Wright SD, Mathison JC *et al.* Structure and function of lipopolysaccharide binding protein. *Science.* 1990;249(4975):1429-31.
- Sekine K, Fujishima S, Aikawa N. Plasma hepatocyte growth factor is increased in early-phase sepsis. *J Infect Chemother.* 2004;10(2):110-4.
- Shimazu R, Akashi S, Ogata H, Nagai Y, Fukudome K, Miyake K *et al.* MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *J Exp Med.* 1999;189(11):1777-82.
- Silva E, Pedro Mde A, Sogayar AC, Mohovic T, Silva CL, Janiszewski M *et al.* Brazilian Sepsis Epidemiological Study (BASES study). *Crit Care.* 2004;8(4):R251-60.

- Spitznagel JK. Antibiotic proteins of human neutrophils. *J Clin Invest.* 1990;86(5):1381-6.
- Takeda K, Akira S. Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol.* 2005;17(1):1-14.
- Tobias PS, Mathison JC, Ulevitch RJ. A family of lipopolysaccharide binding proteins involved in responses to gram-negative sepsis. *J Biol Chem.* 1988;263(27):13479-81.
- Troelstra A, de Graaf-Miltenburg LA, van Bommel T, Verhoef J, Van Kessel KP, Van Strijp JA. Lipopolysaccharide-coated erythrocytes activate human neutrophils via CD14 while subsequent binding is through CD11b/CD18. *J Immunol.* 1999;162(7):4220-5.
- Tsujimoto H, Ono S, Majima T, Kawarabayashi N, Takayama E, Kinoshita M *et al.* Neutrophil elastase, MIP-2, and TLR-4 expression during human and experimental sepsis. *Shock.* 2005;23(1):39-44.
- Van Amersfoort ES, Van Berkel TJ, Kuiper J. Receptors, mediators, and mechanisms involved in bacterial sepsis and septic shock. *Clin Microbiol Rev.* 2003;16(3):379-414.
- van der Poll T, Coyle SM, Moldawer LL, Lowry SF. Changes in endotoxin-induced cytokine production by whole blood after in vivo exposure of normal humans to endotoxin. *J Infect Dis.* 1996;174(6):1356-60.
- Vlessis AA, Goldman RK, Trunkey DD. New concepts in the pathophysiology of oxygen metabolism during sepsis. *Br J Surg.* 1995;82(7):870-6.
- von der Mohlen MA, van der Poll T, Jansen J, Levi M, van Deventer SJ. Release of bactericidal/permeability-increasing protein in experimental endotoxemia and clinical sepsis. Role of tumor necrosis factor. *J Immunol.* 1996;156(12):4969-73.
- Wenisch C, Parschalk B, Patruta S, Brustbauer R, Graninger W. Effect of polyclonal immunoglobulins on neutrophil phagocytic capacity and reactive oxygen production in patients with gram-negative septicemia. *Infection.* 1999;27(3):183-6.
- West MA, Heagy W. Endotoxin tolerance: A review. *Crit Care Med.* 2002;30(1 Supp):S64-S73.
- Wittebole X, Coyle SM, Kumar A, Goshima M, Lowry SF, Calvano SE. Expression of tumour necrosis factor receptor and Toll-like receptor 2 and 4 on peripheral blood leucocytes of human volunteers after endotoxin challenge: a comparison of flow cytometric light scatter and immunofluorescence gating. *Clin Exp Immunol.* 2005;141(1):99-106.

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

Zhang FX, Kirschning CJ, Mancinelli R, Xu XP, Jin Y, Faure E *et al*. Bacterial lipopolysaccharide activates nuclear factor-kappaB through interleukin-1 signaling mediators in cultured human dermal endothelial cells and mononuclear phagocytes. *J Biol Chem*. 1999;274(12):7611-4.

Ziegler-Heitbrock HW, Ulevitch RJ. CD14: cell surface receptor and differentiation marker. *Immunol Today*. 1993;14(3):121-5.

Ziegler-Heitbrock HW, Wedel A, Schraut W, Strobel M, Wendelgass P, Sternsdorf T *et al*. Tolerance to lipopolysaccharide involves mobilization of nuclear factor kappa B with predominance of p50 homodimers. *J Biol Chem*. 1994;269(25):17001-4.

Ziegler-Heitbrock HW. Molecular mechanism in tolerance to lipopolysaccharide. *J Inflamm*. 1995;45(1):13-26.

Ziegler-Heitbrock HW. Definition of human blood monocytes. *J Leukoc Biol*. 2000;67(5):603-6.

Zweigner J, Gramm HJ, Singer OC, Wegscheider K, Schumann RR. High concentrations of lipopolysaccharide-binding protein in serum of patients with severe sepsis or septic shock inhibit the lipopolysaccharide response in human monocytes. *Blood*. 2001;98(13):3800-8.

Abstract

Sepsis presents increasing incidence and high morbidity and mortality and is the main cause of death in the intensive care units. The infection control depends on the adequate microorganism recognition by the host cells and competent effector's response. Paradoxically, in sepsis, the protective mechanisms are also involved in the illness process, with the limit between protective and harmful response still inexact. **Purpose:** To evaluate the expression of pathogen recognition receptors on monocytes surface and the response to exogenous stimulus - LPS, IL-1 β e TNF- α - *in vitro*, measured by the cytokine production, in patients in different sepsis stages. **Methods:** Forty one patients, classified in accordance with the definitions of the Consensus of the 1992, had been enrolled: 14 with sepsis, 12 with severe sepsis and 15 with septic shock. Seventeen healthy volunteers were included as control. Through flow cytometry, the expression of TLR2, TLR4, CD14, CD11b and CD11c were analyzed on monocytes surface in whole blood. The soluble form of CD14 receptor (sCD14) also was measured in serum by ELISA. Inflammatory (TNF- α and IL-6) and anti-inflammatory (IL-10) cytokine levels was measured in peripheral blood mononuclear cells supernatants following LPS, IL-1 β e TNF- α - stimulus *in vitro*. **Results:** An increase in sCD14 in sera and a decreased mCD14 expression on peripheral monocytes were found in patients comparing to healthy volunteers ($p < 0,01$). However, no differences in the expression of TLR2, TLR4, CD11b and CD11c were found among the groups. The sepsis group showed, compared with the others groups, higher IL-6 and TNF- α production after LPS stimulus. This positive regulation was less intense with IL-1 β and absent with TNF- α . A negative regulation of the inflammatory cytokine production was observed in severe sepsis and shock septic patients comparing to the sepsis and healthy group, independent of the stimulus. No significant difference in the IL-10 production was found among the groups, yet a lower production after LPS challenge was detected in septic shock compared with the sepsis patients ($p < 0,05$). A correlation between monocytes surface receptors and cytokine production after LPS challenge could be demonstrated when the results of the septic groups had been grouped. Surprising, correlation of the expression of the same receptors with the other stimulus used, IL-1 β e TNF- α , were also observed. **Conclusions:** In this study we show that the inflammatory response is associated with the *continuum* of clinical manifestations of sepsis, with a strong inflammatory response in the early-phase (sepsis) and refractory picture in the late-phases (severe sepsis and septic shock). The correlation between the cell surface receptors and the cytokine production after IL-1 β e TNF- α stimuli and the observation of one same standard response with the different stimulus suggest a pattern of immunology response that does not depend only of the expression of the evaluated receptors and, probably, has a regulation in the intracellular signaling pathways.

Anexo 1



Universidade Federal de São Paulo
Escola Paulista de Medicina

Comitê de Ética em Pesquisa
Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo

quarta-feira, 27 de agosto de 2003

CEP Nº 0834/03

Ilmo(a). Sr(a).

Pesquisador(a): REINALDO SALOMÃO

Disciplina/Departamento: Doenças Infecciosas e Parasitárias/Medicina

Ref.: Projeto de Pesquisa

Estudo da resposta celular na sepse

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo
ANALISOU e APROVOU o projeto acima.

Conforme resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde são deveres do pesquisador:

1. Comunicar toda e qualquer alteração do projeto e do termo de consentimento. Nestas circunstâncias a inclusão de pacientes deve ser temporariamente interrompida até a resposta do Comitê, após análise das mudanças propostas.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do estudo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.
4. Apresentar primeiro relatório parcial em

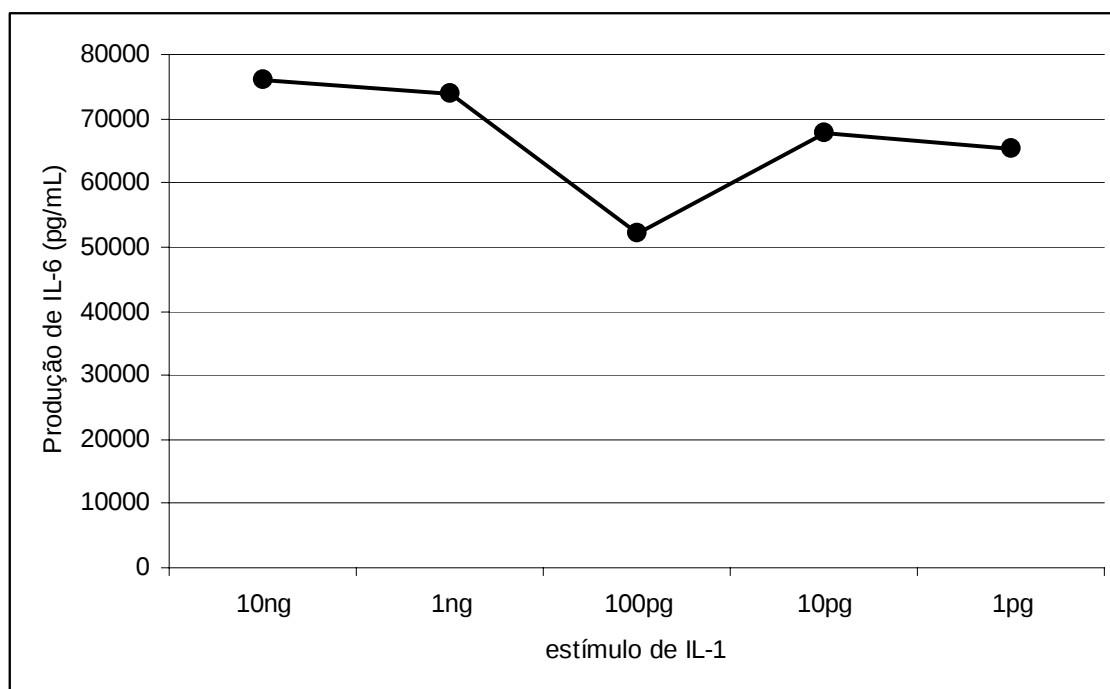
23/02/04

Atenciosamente,

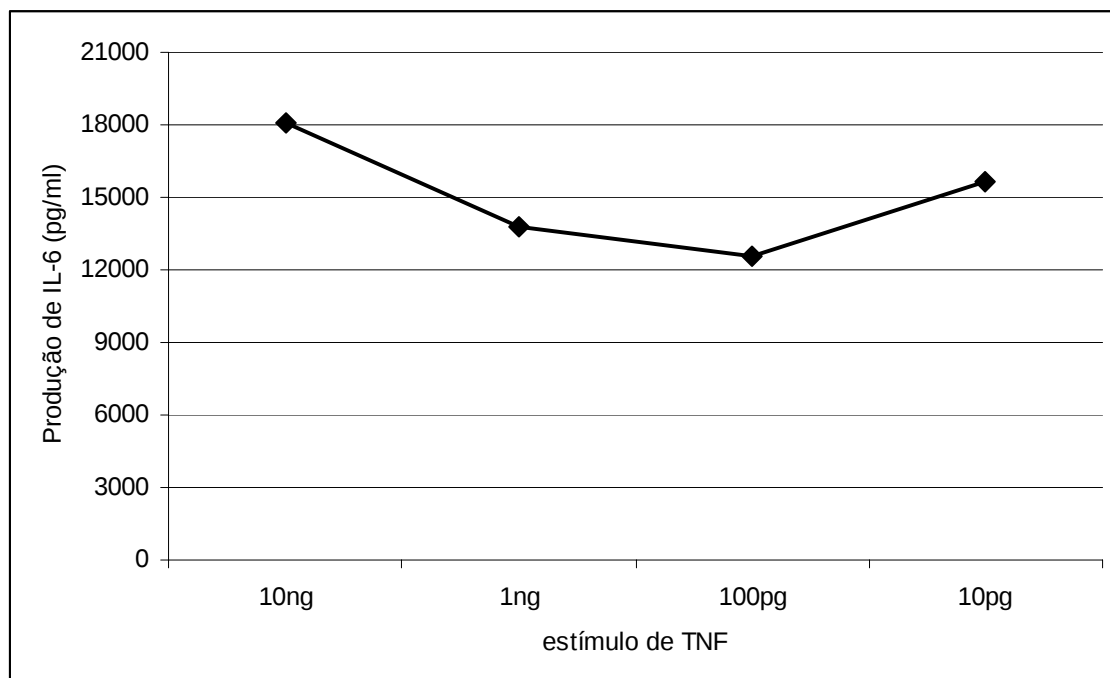
Prof. Dr. José Osmar Medina Pestana
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da
Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo

Ressaltamos que é de essencial importância que seja verificado, antes da divulgação dos processos e/ou resultados obtidos nesta pesquisa, se os mesmos são potencialmente patenteáveis ou passíveis de outras formas de proteção intelectual/industrial. A proteção por meio do depósito de patente, ou de outras formas de proteção da propriedade intelectual, evita a ação indevida de terceiros e confere maior segurança quando da publicação dos resultados da pesquisa."

Rua Botucatu, 572 - 1º andar - CEP 04023-062 - São Paulo/Brasil
Tel.: (11) 5571.1062 Tel/Fax 5539.7162

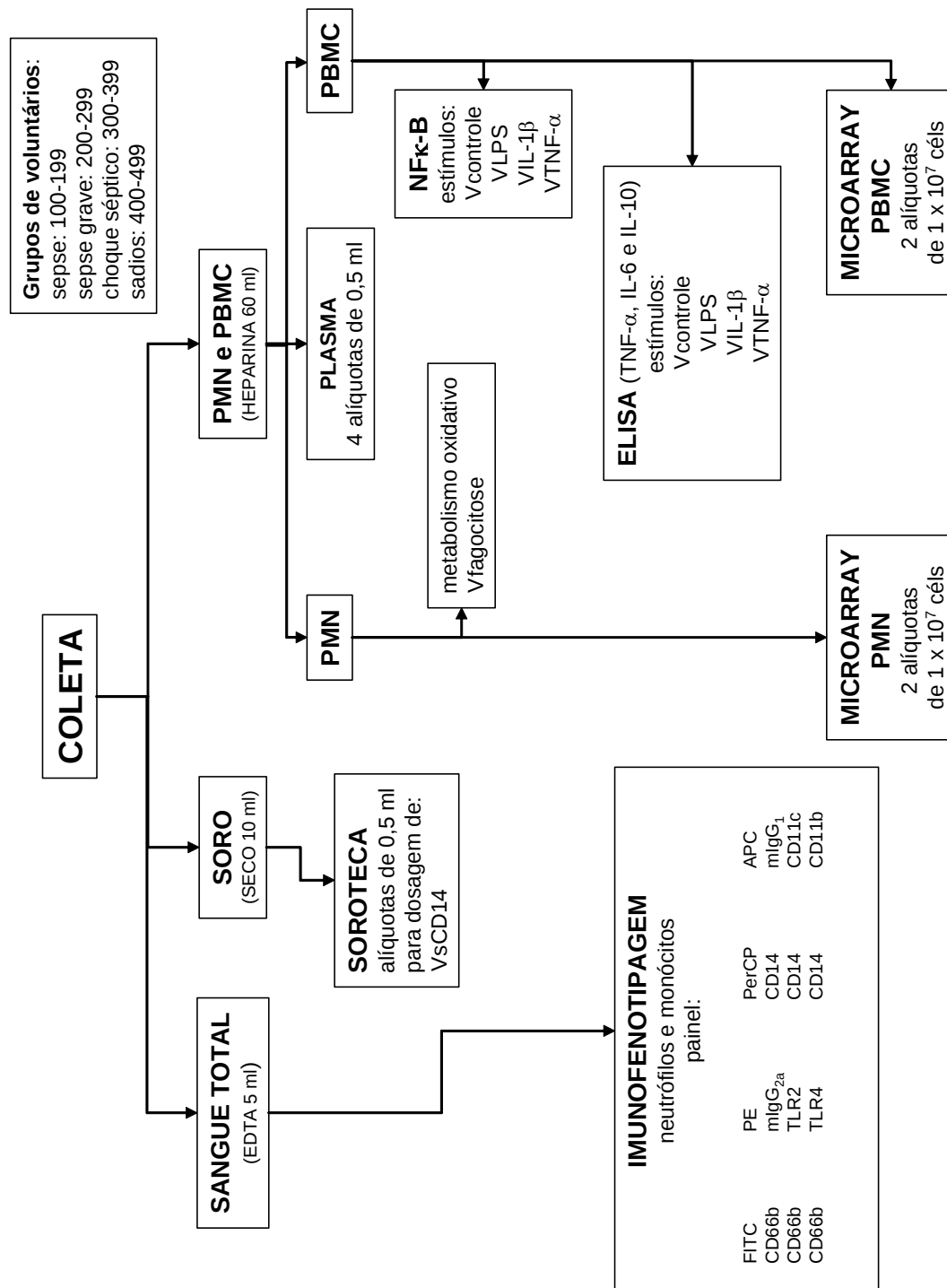
Anexo 2

Padronização: Dose-resposta da produção de IL-6 induzida por IL-1 β . Cultura de células mononucleares do sangue periférico estimuladas com IL-1 β (eixo x). Média da produção de IL-6 de quatro voluntários sadios (eixo y).



Padronização: Dose-resposta da produção de IL-6 induzida por TNF- α . Cultura de células mononucleares do sangue periférico estimuladas com TNF- α (eixo x). Média da produção de IL-6 de quatro voluntários sadios (eixo y).

Anexo 3



Anexo 4

PROJETO RESPOSTA CELULAR NA SEPSE

ASSUNTO: Coleta de Sangue Humano, Separação de Células Mononucleares do Sangue Periférico (PBMC), Contagem, Estímulo com LPS, IL1- β e TNF- α e Preparação Final, e Congelamento de PBMC Humano.

Escrito por: Milena Karina Coló Brunialti

Aprovado por: Prof. Dr. Reinaldo Salomão

Revisado em: 22/09/2003

Coletar: - 60 ml de sangue em tubo vacutainer contendo heparina;

1. Transferir sangue para um tubo de 50ml e diluir em parte igual com soro fisiológico.
2. Adicionar vagarosamente o sangue diluído a um tubo de 50ml contendo 15ml de ficoll-paque plus. Centrifugar a 2000rpm, 18°C por 20 minutos.
3. Coletar nuvem de células do tubo e transferir para outro tubo e completar com soro fisiológico. Separar a camada logo acima das hemácias onde estão os neutrófilos e encaminhar para o Paulo.
4. Continuar apenas com PBMC. Centrifugar 2000rpm, 18°C por 10 minutos. Desprezar sobrenadante.
5. Repetir a lavagem no tubo com 50ml de soro fisiológico. Centrifugar. Desprezar sobrenadante.
6. Suspende botão de células em 10ml de meio RPMI com 10% FCS Gibco.
7. Efetuar contagem de células em câmara de Neubauer: 10 μ l da suspensão de células + 90 μ l de corante trypan blue (diluição 1:10). Contar pelo menos dois quadrantes em diagonal. CÁLCULO: N^o total de células = (N^o de células contadas) x (10.000/ N^o de quadrantes contados) x (diluição de células) x (volume da suspensão celular).
8. Acertar concentração para 4 x 10⁶ cél/ml.
 - ↳ Para ensaio de gel shift: colocar 1,5 ml da suspensão por poço em placa de 6 poços em 4 poços.
 - ↳ Para ELISA: colocar 500 μ l da suspensão por poço em placa de 24 poços em 4 poços.

Anexo 4 (continuação)

- b O restante da suspensão de células deve ser congelado pelo menos a 1×10^7 células por microtubo. Centrifugar os microtubos e suspender botão de células em 1 ml de trizol. Homogeneizar e guardar em freezer -80°C . Identificar os microtubos com as iniciais do paciente, número, data da coleta.

9. Efetuar estímulos nas duas placas: Controle, LPS, IL1- β e TNF- α .

Para gel shift:

Controle (sem estímulo)

LPS (concentração final $100 \text{ ng}/2 \times 10^6 \text{ cel}$): pegar alíquota de $10 \text{ ng}/\mu\text{l}$ e pipetar $30 \mu\text{l}$ no orifício da placa.

TNF- α (concentração final $10 \text{ ng}/2 \times 10^6 \text{ cel}$): pegar alíquota de $350 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ e pipetar $2 \mu\text{l}$ em $700 \mu\text{l}$ de PBS+1%BSA = $1000 \text{ ng}/\mu\text{l}$.

Pegar $2 \mu\text{l}$ da solução a $1000 \text{ ng}/\mu\text{l}$ e pipetar em $2000 \mu\text{l}$ de PBS+1%BSA = $1 \text{ ng}/\mu\text{l}$.

Pipetar $30 \mu\text{l}$ da solução de TNF- α a $1 \text{ ng}/\mu\text{l}$ no orifício da placa de 6 poços.

IL-1 β (concentração final $1 \text{ ng}/2 \times 10^6 \text{ cel}$): pegar alíquota de $5 \text{ ng}/\mu\text{l}$ e pipetar $25 \mu\text{l}$ em $100 \mu\text{l}$ de PBS+0,1%BSA = $1 \text{ ng}/\mu\text{l}$.

Pipetar $3 \mu\text{l}$ da solução de IL-1 β a $1 \text{ ng}/\mu\text{l}$ no orifício da placa de 6 poços.

Para ELISA:

Controle (sem estímulo)

LPS (concentração final $100 \text{ ng}/2 \times 10^6 \text{ cel}$): pegar alíquota de $10 \text{ ng}/\mu\text{l}$ ou $10 \text{ ng}/\mu\text{l}$ e pipetar $10 \mu\text{l}$ no orifício da placa de 24 poços.

TNF- α (concentração final $0,01 \text{ ng}/2 \times 10^6 \text{ cel}$): pegar alíquota de $350 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ e pipetar $2 \mu\text{l}$ em $700 \mu\text{l}$ de PBS+1%BSA = $1000 \text{ ng}/\mu\text{l}$.

Pegar $2 \mu\text{l}$ da solução a $1000 \text{ ng}/\mu\text{l}$ e pipetar em $2000 \mu\text{l}$ de PBS+1%BSA = $1 \text{ ng}/\mu\text{l}$.

Diluir 1:100 $10 \mu\text{l}$ da solução de $1 \text{ ng}/\mu\text{l}$ + $990 \mu\text{l}$ de PBS+1%BSA = $0,01 \text{ ng}/\mu\text{l}$

Anexo 4 (continuação)

Diluir 1:10 10 μ l da solução de 0,01 ng/ μ l + 90 μ l de PBS+1%BSA = 0,001 ng/ μ l

Pipetar 10 μ l da solução de TNF- α a 0,001 ng/ μ l no orifício da placa de 24 poços.

IL-1 β (concentração final 0,01 ng/ 2×10^6 cel): pegar alíquota de 5 ng/ μ l e pipetar 25 μ l em 100 μ l de PBS+0,1%BSA = 1 ng/ μ l.

Diluir 1:100 10 μ l da solução de 1 ng/ μ l + 990 μ l de PBS+0,1%BSA = 0,01 ng/ μ l

Diluir 1:10 10 μ l da solução de 0,01 ng/ μ l + 90 μ l de PBS+0,1%BSA = 0,001 ng/ μ l

Pipetar 10 μ l da solução de IL-1 β a 0,001 ng/ μ l no orifício da placa de 24 poços.

10. Incubar placa de gel shift (6 poços) por 2 horas. Incubar placa de 24 poços por 24 horas.

11. Para gel shift: após 2 horas de incubação colher, em tubo de 15 ml identificado, todo o sobrenadante e efetuar 3 lavagens com 2-3 ml de PBS estéril gelado, utilizando o rodinho para colher as células. Centrifugar 2000 rpm durante 5 minutos. Desprezar sobrenadante. Suspende o pellet em 700 μ l de PBS e transferir para um microtubo. Lave o tubo de 15 ml com mais 700 μ l de PBS e transfira novamente para o microtubo. Desprezar sobrenadante e guardar botão de células seco em freezer -80°C.

12. Para ELISA: após 20-24 horas de incubação colher, em tubo de microtubo identificado, todo o sobrenadante. Centrifugar 2000 rpm durante 5 minutos. Fazer três alíquotas de sobrenadante de 165 μ l cada. Guardar sobrenadante em freezer -80°C.

Anexo 4 (continuação)

Anexo 5**PROJETO RESOSTA CELULAR NA SEPSE****AMOSTRAS DE SORO.****Procedimento:**

1. Centrifugue o tubo durante 15 minutos a 2600 rpm a 4°C.
2. Faça alíquotas de 0,5 ml, identifique e armazenar em freezer -70 °C
3. Preencha todas as informações abaixo:

Iniciais	Alocação	Data da coleta de sangue	Nº de alíquotas de soro	Preparado por

Anexo 6**PROJETO RESPOSTA CELULAR NA SEPSE**

ASSUNTO: Compensação e Imunofenotipagem de Monócitos e Neutrófilos de Sangue Periférico

Coletar: 5ml de sangue em tubo vacutainer com EDTA.

1. Distribuir anticorpos nos tubos para citometria conforme tabela abaixo:

TUBO	FITC	PE	PerPC	APC
1	5µl CD66b	10µl mIgG_{2a}	4µl CD14	2µl mIgG₁
2				

ISOLAMENTO, CONTAGEM, ESTÍMULO E CONGELAMENTO CELULAR

CÁLCULO: $\text{N}^\circ \text{ total de células} = (\text{N}^\circ \text{ de células contadas}) \times (10.000 / \text{N}^\circ \text{ de quadrantes contados}) \times (\text{diluição de células}) \times (\text{volume da suspensão celular})$

CÁLCULO: $\text{N}^\circ \text{ total de células} = (\text{N}^\circ \text{ de células contadas}) \times (10.000 / \text{N}^\circ \text{ de quadrantes contados}) \times (\text{diluição de células}) \times (\text{volume da suspensão celular})$

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)