

NATÁLIA ESTEVAM GOMES

RESPOSTA DE NEUTRÓFILOS E MONÓCITOS DO SANGUE  
PERIFÉRICO AO LPS DE BACTÉRIAS LISAS E RUGOSAS

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

São Paulo  
2008

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

NATÁLIA ESTEVAM GOMES

RESPOSTA DE NEUTRÓFILOS E MONÓCITOS DO SANGUE  
PERIFÉRICO AO LPS DE BACTÉRIAS LISAS E RUGOSAS

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

Orientador: Prof. Dr. Reinaldo Salomão  
Co-orientadora: Dra. Milena Karina Coló Brunialti

São Paulo  
2008

Gomes, Natália Estevam

**Resposta de neutrófilos e monócitos do sangue periférico ao LPS de bactérias lisas e rugosas.** / Natália Estevam Gomes. – São Paulo, 2008. xx, 138f.

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

Título em inglês: Neutrophils and monocytes response to LPS from smooth and rough bacteria.

1. Antígenos CD14. 2. Ativação de Neutrófilo. 3. Receptores da Superfície Celular. 4. Proteínas de Membrana. 5. Monócitos.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO  
ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA  
DEPARTAMENTO DE MEDICINA  
DISCIPLINA DE INFECTOLOGIA

Chefe do Departamento: Profa. Dra. Emilia Inoue Sato

Chefe da Disciplina: Prof. Dr. Sérgio Barsanti Wey

Coordenador do Curso de Pós-Graduação: Prof. Dr. Ricardo Sobhie Diaz

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO  
ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA  
DEPARTAMENTO DE MEDICINA  
DISCIPLINA DE INFECTOLOGIA

Banca

Prof. Dr. Fernando de Queiroz Cunha / Departamento de Farmacologia, FMRP-USP  
Prof. Dr. Hugo Pequeno Monteiro / Divisão de Biologia Molecular, Departamento de Bioquímica,  
UNIFESP  
Dr. Otelo Rigato Júnior / Disciplina de Infectologia, Departamento de Medicina, UNIFESP  
Suplente: Prof. Dr. Heraldo Possolo de Souza / Clínica Médica, Faculdade de Medicina, USP

## *Dedicatória*

*A Deus. Ao meu pai, Dalto Gomes, e à minha mãe, Eliéte Estevam Gomes, pelo amor incondicional e tantos ensinamentos. Aos meus irmãos Gabriela e Daniel pelo apoio. A meu sobrinho Túlio por ser o menino mais carinhoso do mundo.*

## *Agradecimentos*

*Ao professor **Dr. Reinaldo Salomão**, pela oportunidade de realização deste trabalho, pela paciência e, sobretudo, pelo exemplo de pesquisador. Obrigada por abrir as portas deste mundo tão admirável da Ciência.*

*À minha amiga e co-orientadora **Dra. Milena Karina Coló Brunialti**, por toda a ajuda dada, conhecimento dividido, dedicação e discussão de projeto e resultados.*

*Aos professores **Hugo P. Monteiro, Ricardo P. Bertolla e José Roberto Leite**, por todas as colaborações, idéias e apoio.*

*A **Ricardo P. Bertolla e Pedro L. A. Scherholz** por terem me ajudado a tirar as fotos das células e núcleos.*

*Aos meus amigos **Maria da Luz, Leandro, Taís, Aline, Giovana, Viviane, Sidnéia, Ellen, Aripuanã e Sandra**. Obrigada por todo o carinho, incentivo nos momentos difíceis, participação e ajuda diária. A amizade de vocês vale mais que a experiência científica adquirida ao longo do período que permaneci no Laboratório de Imunologia I. Em especial a **Amanda e Marialice**, minhas pupilas, amigas, companheiras de experimentos infundáveis... Obrigada pela ajuda! Sem vocês eu estaria ainda correndo amostras!*

*Aos voluntários que aceitaram participar deste estudo.*

*Aos meus amigos **Paola, Carol, Átila, Suzy, Karina, Clarissa, Ana Paula, Renato e Andréa**, por todo apoio, boas conversas, momentos divertidos, risadas homéricas. Em especial, quero agradecer*

à **Larissa** e **Dani**, por tudo que fizeram por mim e por serem amigas tão amadas. Sempre levarei vocês em meu coração. De forma mais especial ainda, agradeço à **Vanessa**, pelo apoio, grande ajuda e amizade. Você foi um anjo que Deus colocou em meu caminho.

A todos os profissionais do Laboratório de Imunologia I, pelo apoio no desenvolvimento de minhas atividades.

Aos meus pais **Eliéte** e **Dalto**, pelo exemplo de vida, pela força e por nunca desistirem de mim. Amo muito vocês! À minha irmã **Gabriela**, por todos os conselhos, puxões de orelha e alegrias divididas. Você é um anjo que eu amo muito.

Ao meu sobrinho **Túlio**, por ter trazido tanto amor e felicidade a todos.

Aos meus familiares, por todos os momentos bons que passamos juntos e pelo apoio.

A todos os que participam de minha vida, mas não foram mencionados.

E, sobretudo, a **Deus** e a **Nossa Senhora**.

Esta dissertação só foi possível por grande esforço pessoal, ajuda dos meus familiares e amigos.

Obrigada a todos.

## *Agradecimentos*

*À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro ao projeto (programa de mestrado, n.º do processo 05/58015-7; financiamento de Projeto Regular, n.º do processo 04/15584-2).*

*“Conseqüiremos um enorme crescimento pessoal se tivermos a coragem de encarar todas as nossas sombras interiores. O autoconhecimento é, sem dúvida, a chave da liberdade!” – P. Gaudêncio*

*“Todo mundo é um cientista maluco e a vida é o laboratório. A gente está sempre experimentando, tentando achar um jeito de viver, de resolver os problemas, de se livrar da loucura do caos” - D. Cronenberg*

## Sumário

<b>Dedicatória.....</b>	<b>vi</b>
<b>Agradecimentos.....</b>	<b>vii</b>
<b>Listas.....</b>	<b>xv</b>
<b>Resumo.....</b>	<b>xx</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
1.1 Sepse.....	2
1.2 Lipopolissacarídeo (LPS) e resposta inflamatória.....	2
1.2.1 Diferentes formas de LPS.....	4
1.2.2 Ação biológica do LPS.....	5
1.2.3 Integrinas, receptores envolvidos em resposta inflamatória e ação bactericida.....	6
1.3 Sinalização desencadeada pelo LPS.....	8
1.4 Justificativa.....	11
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>13</b>
<b>3. MATERIAIS.....</b>	<b>15</b>
3.1 Anticorpos.....	16
3.2 Aparelhos e Softwares.....	16
3.3 Reagentes e estímulos.....	17
3.4 Soluções e meio de cultura.....	18
<b>4. MÉTODOS.....</b>	<b>20</b>
4.1. Análise da expressão de receptores na superfície de leucócitos após estimulação com r e sLPS.....	21
4.1.1 Coleta de sangue.....	21
4.1.2. Estimulação <i>in vitro</i> de sangue total para estudo da dinâmica de receptores da superfície de monócitos e neutrófilos.....	21
4.1.2.1 Dose-Resposta.....	21
4.1.2.2 Cinética.....	22
4.1.2.3 Cinética tardia.....	22
4.1.3 Estudo da influência da presença de plasma na expressão de receptores de superfície de neutrófilos e monócitos após estimulação com r e sLPS.....	23

4.1.4 Estimulação <i>in vitro</i> de polimorfonucleares e células mononucleares do sangue periférico para estudo da dinâmica de receptores de superfície.....	23
4.1.4.1 Separação de células mononucleares do sangue periférico e polimorfonucleares .....	23
4.1.4.2 Estudo da expressão de receptores na superfície das células separadas e em co-cultura.....	24
4.1.5 Citometria de fluxo.....	25
4.1.5.1 Aquisição e análise de eventos em sangue total e co-cultura....	25
4.1.5.2 Aquisição e análise de eventos em sistema de células separadas.....	28
4.2 Estimulação <i>in vitro</i> de sangue total para estudo da produção intracelular de espécies reativas de oxigênio.....	30
4.2.1 Coleta de sangue.....	30
4.2.2 Dose-resposta.....	30
4.2.3 Cinética.....	31
4.2.4 Citometria de fluxo.....	31
4.2.4.1 Aquisição.....	31
4.2.4.2 Análise.....	31
4.3 Estimulação <i>in vitro</i> de sangue total para estudo da produção de óxido nítrico.....	33
4.3.1 Coleta de sangue.....	34
4.3.2 Dose-reposta.....	34
4.3.3 Cinética.....	35
4.3.4 Citometria de fluxo.....	35
4.3.4.1 Aquisição.....	35
4.3.4.2 Análise.....	35
4.4 Detecção da ativação de ERK1/2, p38 e JNK por <i>Citometric Bead Array</i> (CBA) <i>Flex Set</i> após estimulação de leucócitos com r e sLPS.....	36
4.4.1 Coleta de sangue.....	37
4.4.2 Separação de CMSP e PMN.....	37
4.4.3 Estimulação das CMSP e PMN.....	38
4.4.4 Lavagem e lise das CMSP e PMN.....	39
4.4.5 Determinação da concentração protéica.....	39
4.4.6 Realização do ensaio de CBA <i>Flex Set</i> para detecção de fosfo-ERK, fosfo-p38 e fosfo-JNK.....	40

4.4.6.1	Preparação das amostras.....	40
4.4.6.2	Preparação dos padrões do ensaio.....	40
4.4.6.3	Preparação das partículas de captura.....	40
4.4.6.4	Preparação dos reagentes de detecção.....	40
4.4.6.5	Procedimento para ensaio.....	40
4.4.6.6	Aquisição das amostras.....	41
4.4.6.7	Análise de dados utilizando FCAP Array.....	41
4.5	Detecção da translocação das subunidades de NFκB p65 e p50 para o núcleo de PMN após estimulação com r e sLPS.....	42
4.5.1	Coleta de sangue.....	42
4.5.2	Separação de PMN.....	42
4.5.3	Estimulação das PMN.....	42
4.5.4	Fixação das amostras.....	42
4.5.5	Lise das células.....	42
4.5.6	Marcação de p65 e p50 nos núcleos isolados.....	43
4.5.7	Aquisição das amostras.....	43
4.5.7.1	Aquisição.....	43
4.5.7.2	Análise.....	43
4.6	Análise Estatística.....	44
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>46</b>
5.1.	Análise da expressão de receptores na superfície de leucócitos após estimulação com r e sLPS.....	47
5.1.1.	Estimulação <i>in vitro</i> de sangue total para estudo da dinâmica de receptores na superfície de monócitos e neutrófilos.....	47
5.1.1.1	Dose-Resposta.....	47
5.1.1.2	Cinética.....	48
5.1.2	Estudo da influência da presença de plasma na expressão de receptores de superfície de neutrófilos e monócitos após estimulação com r e sLPS.....	60
5.1.3	Estimulação <i>in vitro</i> de PMN e CMSP para estudo da dinâmica de receptores de superfície.....	63
5.2	Estimulação <i>in vitro</i> de sangue total para estudo da produção intracelular de espécies reativas de oxigênio.....	66
5.3	Estimulação <i>in vitro</i> de sangue total para estudo da produção de óxido nítrico.....	68
5.4	Ativação de p38 por <i>Citometric Bead Array (CBA) Flex Set</i> após estimulação	

de leucócitos com r e sLPS.....	72
5.5 Translocação das subunidades de NFκB p50 e p65 para o núcleo após estimulação de PMN com r e sLPS.....	73
<b>6. DISCUSSÃO.....</b>	<b>77</b>
<b>7. CONCLUSÕES.....</b>	<b>89</b>
<b>8. ANEXOS.....</b>	<b>91</b>
1. Dosagem de EROs com sangue total sem diluição.....	92
2. Dosagem de EROs com sangue total diluído em PBS.....	96
3. Padronização do protocolo de dosagem do NO utilizando DAF-FM DA.....	97
4. Estimulação <i>in vitro</i> de sangue total para estudo da produção intracelular de citocinas.....	97
5. Separação de núcleo para corrida do mesmo no citômetro.....	98
<b>9. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>102</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>111</b>
<b>Apêndices.....</b>	<b>113</b>

## *Lista de figuras*

<b>Figura 1.1</b>	Uma bactéria gram-negativa.....	3
<b>Figura 1.2</b>	Representação esquemática do LPS de <i>Salmonella</i> .....	4
<b>Figura 1.3</b>	Representação esquemática das diferentes formas de LPS.....	5
<b>Figura 1.4</b>	Mecanismo de rolamento e migração de neutrófilos para o foco infeccioso...	8
<b>Figura 1.5</b>	Vias de sinalização dos TLRs.....	10
<b>Figura 1.6</b>	Sinalização dependente e independente de CD14.....	11
<b>Figura 4.1</b>	Estratégia de aquisição de monócitos em sangue total ou co-cultura.....	26
<b>Figura 4.2</b>	Estratégia de análise da expressão de receptores em sangue total.....	26
<b>Figura 4.3</b>	Análise dos receptores CXCR2 e CD11b na superfície de neutrófilos.....	27
<b>Figura 4.4</b>	Estratégia de análise da intensidade de expressão do receptor CD14 em monócitos e CD66b em neutrófilos .....	28
<b>Figura 4.5</b>	Estratégia de aquisição de monócitos e neutrófilos em células separadas.....	29
<b>Figura 4.6</b>	Esquema representativo da reação do DCFH-DA.....	30
<b>Figura 4.7</b>	Estratégia de análise da produção de EROs em sangue total.....	32
<b>Figura 4.8</b>	Histogramas de DCF de monócitos e de neutrófilos.....	33
<b>Figura 4.9</b>	Reação esquemática para detecção de óxido nítrico por DAF-FM diacetato.	34
<b>Figura 4.10</b>	Análise da produção de NO por neutrófilos e monócitos.....	36
<b>Figura 4.11</b>	Esquema representativo da reação existente no CBA.....	37
<b>Figura 4.12</b>	Gráficos observados durante a aquisição das amostras do CBA.....	38
<b>Figura 4.13</b>	Aquisição e análise da translocação de p65 e p50 para o núcleo.....	44
<b>Figura 5.1</b>	Curva dose-resposta da expressão de CD11b na superfície de monócitos induzida por r e sLPS.....	47
<b>Figura 5.2</b>	Curva dose-resposta da expressão de CD11b na superfície de neutrófilos induzida por r e sLPS.....	48
<b>Figura 5.3</b>	Razão da expressão de CD14 na superfície de monócitos estimulados com r ou sLPS em relação ao controle, nos tempos de incubação de 5, 15, 30, 60, 180 e 360 min.....	49
<b>Figura 5.4</b>	Razão da expressão de CD14 na superfície de monócitos estimulados com r ou sLPS em relação ao controle, nos tempos de incubação de 6, 10 e 24 h.....	50
<b>Figura 5.5</b>	Expressão de CD14 na superfície de neutrófilos após incubação com diferentes estímulos por 5, 15, 30, 60, 180 e 360 min.....	51
<b>Figura 5.6</b>	Cinética da expressão de TLR4 na superfície de monócitos induzida por r e sLPS. ....	52
<b>Figura 5.7</b>	Cinética da expressão de TLR4 na superfície de neutrófilos induzida por r e sLPS.....	53
<b>Figura 5.8</b>	Cinética da expressão de CXCR2 na superfície de neutrófilos induzida por r e sLPS.....	54
<b>Figura 5.9</b>	Expressão de CD66b na superfície de neutrófilos após incubação com diferentes estímulos por 5, 15, 30, 60, 180 e 360 minutos.....	55
<b>Figura 5.10</b>	Cinética da expressão de CD11b na superfície de monócitos induzida por r e sLPS.....	56
<b>Figura 5.11</b>	Cinética da expressão de CD11b na superfície de neutrófilos induzida por r e sLPS.....	57
<b>Figura 5.12</b>	Cinética da expressão de CD11c na superfície de monócitos induzida por r e sLPS.....	58
<b>Figura 5.13</b>	Cinética da expressão de CD11c na superfície de neutrófilos induzida por r e sLPS.....	59
<b>Figura 5.14</b>	Cinética da expressão de HLA-DR na superfície de monócitos induzida por r e sLPS.....	60

<b>Figura 5.15</b>	Expressão de CD14 e CD11b na superfície de monócitos em modelo utilizando diferentes concentrações de plasma.....	61
<b>Figura 5.16</b>	Expressão de CD66b, CD11b e CXCR2 na superfície de neutrófilos em modelo utilizando diferentes concentrações de plasma.....	62
<b>Figura 5.17</b>	Expressão de CD14 e CD11b na superfície de monócitos de CMSP.....	64
<b>Figura 5.18</b>	Expressão de CD66b e CD11b na superfície de neutrófilos de PMN.....	64
<b>Figura 5.19</b>	Expressão de CD66b na superfície de neutrófilos co-cultivados com CMSP.	65
<b>Figura 5.20</b>	Expressão de CD11b na superfície de neutrófilos co-cultivados com CMSP.	65
<b>Figura 5.21</b>	Curva da dose-resposta de produção de EROs por monócitos induzida por r e sLPS.....	66
<b>Figura 5.22</b>	Curva da dose-resposta de produção de EROs por neutrófilos induzida por r e sLPS.....	67
<b>Figura 5.23</b>	Cinética da produção de EROs por neutrófilos após diferentes estímulos.....	68
<b>Figura 5.24</b>	Curva da dose-resposta de produção de NO por monócitos induzida por r e sLPS.....	69
<b>Figura 5.25</b>	Curva da dose-resposta de produção NO por neutrófilos induzida por r e sLPS.....	69
<b>Figura 5.26</b>	Cinética de produção de NO por monócitos induzida por r e sLPS.....	70
<b>Figura 5.27</b>	Cinética de produção de NO por neutrófilos induzida por r e sLPS.....	71
<b>Figura 5.28</b>	Produção de NO por monócitos e neutrófilos em diferentes condições de estímulo por 30 min.....	71
<b>Figura 5.29</b>	Curva dose-resposta da mensuração de fosfo-p38 no citoplasma de CMSP induzida por r e sLPS.....	72
<b>Figura 5.30</b>	Curva dose-resposta da mensuração de fosfo-p38 no citoplasma de PMN induzida por r e sLPS.....	73
<b>Figura 5.31</b>	Fotos tiradas de células íntegras e núcleos isolados após marcação de actina em verde e DNA em azul.....	74
<b>Figura 5.32</b>	Fotos com maior aumento tiradas de célula íntegra e núcleos isolados após marcação de actina em verde e DNA em azul.....	74
<b>Figura 5.33</b>	Fotos tiradas de células íntegras e núcleos isolados após coloração com hematoxilina/eosina .....	75
<b>Figura 5.34</b>	Curva cinética de translocação de p50 para o núcleo de PMN induzida por r e sLPS. ....	76
<b>Figura 5.35</b>	Curva cinética de translocação de p65 para o núcleo de PMN induzida por r e sLPS. ....	76
<b>Figura A.1</b>	Curva da dose-resposta da produção de EROs em monócitos induzida por r e sLPS.....	93
<b>Figura A.2</b>	Curva da dose-resposta da produção de EROs em neutrófilos induzida por r e sLPS.....	94
<b>Figura A.3</b>	Cinética da produção de EROs induzida por r e sLPS em monócitos.....	95
<b>Figura A.4</b>	Cinética da produção de EROs induzida por r e sLPS em neutrófilos.....	96
<b>Figura A.5</b>	Fotos tiradas de células íntegras e núcleos após marcação de actina em verde e DNA em azul.....	100
<b>Figura A.6</b>	Fotos com maior aumento tiradas de célula íntegra e núcleos após marcação de actina em verde, DNA em azul e vermelho.....	100

## *Lista de Tabelas*

<b>Tabela 3.1</b>	Lista de anticorpos utilizados no estudo.....	16
<b>Tabela 4.1</b>	Painel de anticorpos utilizados em cada tubo na dose-resposta para estudo de dinâmica de expressão de receptores em sangue total.....	22
<b>Tabela 4.2</b>	Painel de anticorpos utilizados em cada tubo na cinética para estudo de dinâmica de expressão de receptores em sangue total.....	22
<b>Tabela 4.3</b>	Painel de anticorpos utilizados em cada tubo na cinética tardia para estudo de dinâmica de expressão de receptores em sangue total.....	23
<b>Tabela 4.4</b>	Painel de anticorpos utilizados em cada tubo no estudo de influência do plasma na dinâmica de expressão de receptores.....	23
<b>Tabela 4.5</b>	Painel de anticorpos utilizados em cada tubo para estudo da dinâmica de expressão de receptores em células separadas ou co-cultivadas.....	25
<b>Tabela 4.6</b>	Identificação e classificação das variáveis.....	45
<b>Tabela A.1</b>	Painel de anticorpos utilizados em cada tubo para ensaio de citocinas intracelulares.....	98

## *Lista de abreviaturas e símbolos*

ANOVA	Análise de variância
APC	Alofococianina
APC-Cy7	Alofococianina-Cy7
BPI	Proteína bactericida por aumento de permeabilidade
CBA	<i>Citometric Bead Array</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CD14 ou mCD14	CD14 de membrana
CEP	Comitê de ética em pesquisa
CMSP	Células mononucleares do sangue periférico
CXCR	Receptores para quimiocinas CXC
DAF-FM	4-amino-5-metilamino- 2',7'-difluorofluoresceína
DAF-FM DA	4-amino-5-metilamino- 2',7'-difluorofluoresceína diacetato
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindole
DCF	Diclorofluoresceína
DCFH	2'7'-diclorofluoresceína
DCFH-DA	2'7'-diclorofluoresceína diacetato
DMSO	Dimetilsulfóxido
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
ERK1/2	Quinases regulada por sinal extracelular 1/2
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FITC	Fluoresceína isotiocianato
FSC	Dispersão frontal de luz
x g	Força centrífuga rotacional
Gal	Galactose
Glc	Glicose
GlcN	c-glucosamina
GlcNac	N-acetil-glucosamina
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
h	Hora (s)
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio
HE	Hematoxilina/eosina
Hep	L-glicero-D-mano-heptose
HEPES	Ácido Etanosulfônico 4-2 Hidroietil Piperazina-1
HLADR	Antígeno leucocitário humano-DR
IFN	interferon
I $\kappa$ B	Proteína inibitória do NF $\kappa$ B
IL	Interleucina
iNOS	NO sintase induzível
IRAK-1	Quinase 1 associada ao IL-1R
IRF	Fator regulador de interferon
JNK	N-terminal c-Jun quinase
kDa	Quilodaltons
Kdo	2 -queto-desoxioctonato
LBP	Proteína ligante de lipopolissacarídeo
LPS	Lipopolissacarídeo ou endotoxina
Mal	Adaptador semelhante a MyD88
MAPKs	Proteínas quinase ativadoras de mitose
MD-2	Proteína de diferenciação mielóide-2
MGIF	Média geométrica da intensidade de fluorescência

min	Minutos
mL	Mililitro
MyD88	Fator 88 de diferenciação mielóide
NADPH-oxidase	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase
NFκB	Fator de transcrição κB
ng	nanograma
nm	Nanômetros
NO	Óxido nítrico
°	Graus Celsius
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Ânion superóxido
P	Fosfato
PAMP	Padrão molecular associado à patógenos
PBS	Tampão fosfato
PE	Ficoeritrina
PerCP	Clorofila peridina
pH	Potencial de hidrogênio
PMA	phorbol 12-myristate 13-acetate
PMN	Polimorfonucleares
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonil
PRRs	Receptores de reconhecimento padrão
rLPS	Forma R de LPS
s	segundos
sCD14	CD14 solúvel
sLPS	Forma S de LPS
SSC	Dispersão lateral de luz
TCR	Receptor de linfócitos T
TIR	Domínio homólogo ao receptor Toll/IL-1
TIRAP	proteína adaptadora contendo o domínio TIR
TLR	Receptor do tipo <i>Toll</i>
TNF-α	Fator de necrose tumoral-alfa
TRAF6	Fator associado ao receptor de necrose tumoral 6
TRAM	Molécula adaptadora relacionada a TRIF
TRIF	Molécula adaptadora de interferon-β
ug	micrograma
uL	microlitros

## *Resumo*

**Introdução:** O LPS induz a ativação celular após ligação com CD14 e TLR4. A forma R de LPS (sem o polissacarídeo O) pode ativar de forma independente de CD14. Neutrófilos e monócitos diferem de forma expressiva em sua expressão de CD14 na superfície. **Objetivos:** Comparar a ação biológica de formas R e S de LPS em neutrófilos e monócitos do sangue periférico de humanos. **Métodos:** A modulação de receptores de superfície celular foi observada em monócitos e neutrófilos, e produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e de óxido nítrico (NO), além de ativação de p38 e NFκB foram avaliadas em neutrófilos por citometria de fluxo, após incubação com r e sLPS. **Resultados:** Houve uma pequena alteração de TLR4 em monócitos com 6 h de incubação, enquanto nenhuma modulação foi vista para TLR2 em ambas as células. A modulação de CD14 na superfície de monócitos mostrou-se bifásica, havendo incremento inicial na primeira hora seguida de queda com 6 h. Não foi observada modulação de CD14 na superfície de neutrófilos. Ambas as formas de LPS levaram à indução de CD66b na superfície de neutrófilos, efeito que permanece pelo menos até 24 h de incubação. CD11b foi aumentado em neutrófilos e monócitos por r e sLPS, chegando até 4 vezes a expressão depois de 3h, enquanto que a expressão CXCR2 cai em poucos minutos e permanece reduzida em neutrófilos. A expressão de HLADR foi aumentada nos monócitos no tempo de 3h. O efeito do sLPS na expressão de CD11b, CD66b e CXCR2 em neutrófilos mostrou-se um pouco mais precoce. Ambas as formas de LPS induziram pequena produção de NO e de EROs, quando comparadas com outros estímulos, assim como a translocação de NFκB p65 e p50 e ativação de p38. **Conclusões:** as formas R e S de LPS ativam similarmente os neutrófilos, apesar de sua baixa expressão de CD14 na superfície. Enquanto proteínas do soro podem otimizar a ação do LPS e sCD14 pode suprir a falta de CD14 em neutrófilos, e interações com monócitos podem ter seu papel na resposta dessas células ao LPS, é provável que outros receptores estejam envolvidos na sinalização ao LPS em neutrófilos. Uma modulação complexa de receptores de superfície foi vista em ambas as células com aumento ou decréscimo dependendo do receptor avaliado.

## *1. Introdução*

---

## 1.1 Sepses

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. O processo começa com uma infecção, com ou sem resposta inflamatória sistêmica, podendo progredir a resposta sistêmica com sepsis grave (sepsis associada a uma disfunção orgânica) ou choque séptico (sepsis grave com hipotensão refratária a reposição volêmica)<sup>(1)</sup>.

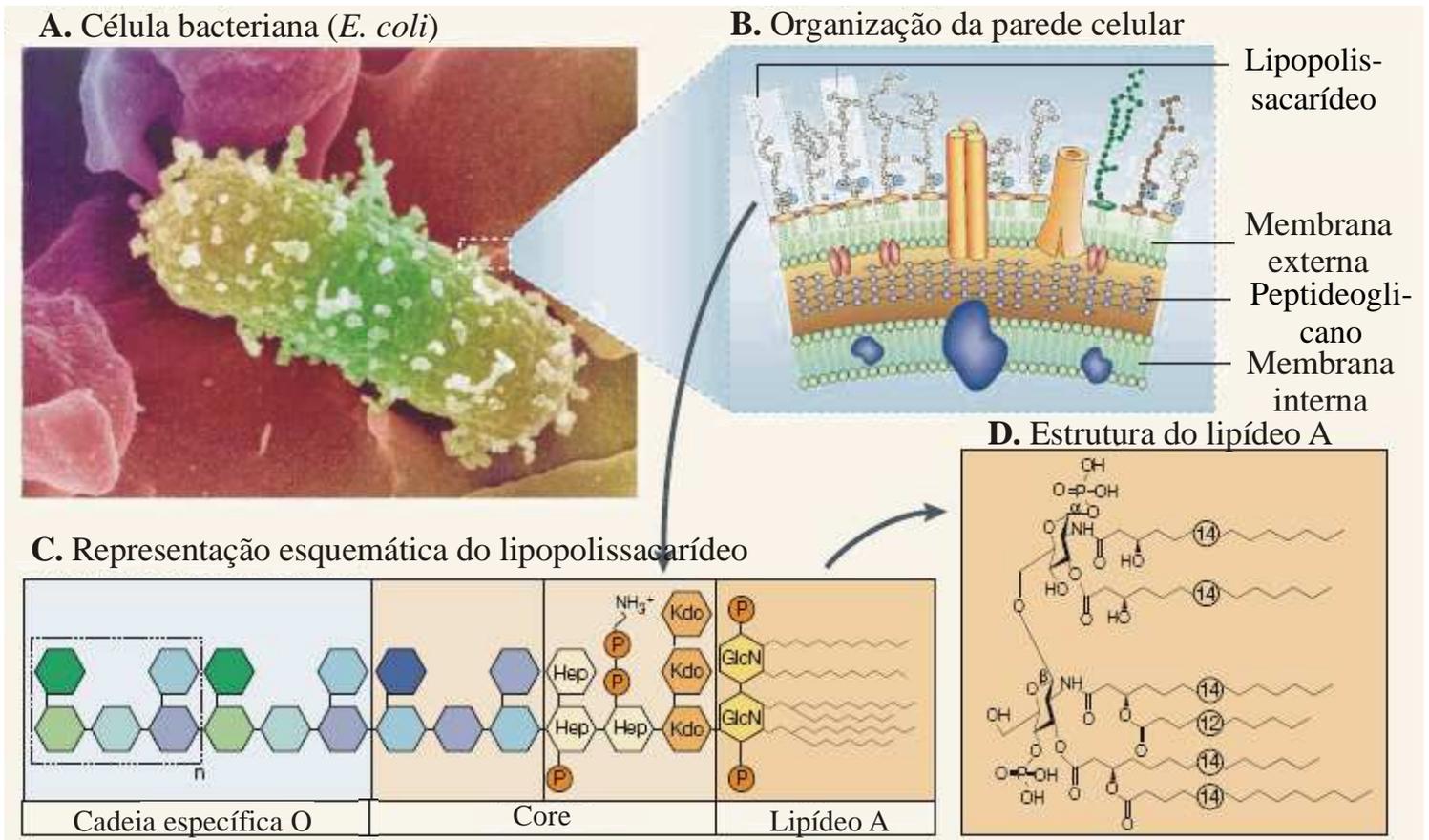
A importância da sepsis pode ser inferida pela sua elevada morbidade e mortalidade. Avaliando incidência e mortalidade associadas às infecções de corrente sanguínea no Hospital São Paulo, hospital de ensino da Universidade Federal de São Paulo, entre 1985 e 1986, encontrou-se incidência de 21,7 episódios por 1000 admissões, com mortalidade de 33,4%<sup>(2, 3)</sup>. Um estudo brasileiro multicêntrico observacional (BASES - *Brazilian Sepsis Epidemiological Study*), conduzido em cinco unidades de terapia intensiva, mostrou incidência de sepsis de 61,4; sepsis grave 35,6 e choque séptico 30,0 para cada 1000 pacientes-dia. As taxas de mortalidade para os pacientes em sepsis, sepsis grave e choque séptico foram de 34,7%; 47,3% e 52,2%; respectivamente<sup>(4)</sup>. Em revisão recente da literatura sobre epidemiologia de sepsis, o autor sugere que a frequência e mortalidade devido à sepsis e sepsis grave podem ser piores nos países da América Latina do que em países desenvolvidos<sup>(5)</sup>.

## 1.2 Lipopolissacarídeo e resposta inflamatória

Embora a interação do hospedeiro com bactérias seja comum, a ocorrência de infecção e suas complicações sistêmicas são relativamente raras. Isto porque há um equilíbrio entre os fatores de defesa do hospedeiro e os de virulência da bactéria. O desequilíbrio entre estes, frequente no ambiente hospitalar devido a doenças de base, terapia invasiva e uso de antimicrobianos, pode resultar em infecção.

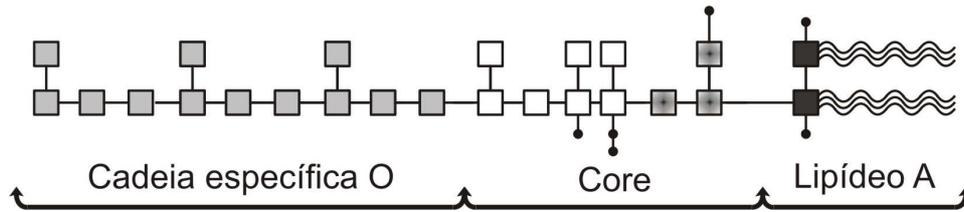
Consideram-se características do sistema imune, dos mais avançados aos primitivos, que ele seja capaz de reconhecer uma grande diversidade de patógenos, matar tais patógenos e poupar o tecido do hospedeiro. Os sistemas imunes inato e adaptativo possuem respostas entrelaçadas<sup>(6)</sup>, sendo os principais componentes da imunidade inata os elementos celulares e humorais, cada um com suas armas aferentes e eferentes. No presente estudo, focamos em respostas celulares a um dos padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs) mais bem estudados: a endotoxina ou lipopolissacarídeo (LPS).

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<sup>(7)</sup>. O LPS está presente na membrana externa das bactérias gram-negativas e desempenha importante função na viabilidade bacteriana e na interação com o hospedeiro<sup>(7)</sup> (figura 1.1B).



**Figura 1.1:** Uma bactéria gram-negativa. Micrografia eletrônica de uma *Escherichia coli* (A), junto com uma representação esquemática da localização do lipopolissacarídeo (LPS) na parede bacteriana (B) e sua estrutura (C). Também é mostrada a estrutura primária do centro tóxico do LPS, o lipídeo A (D). GlcN, c-glucosamina; Hep, L-glicero-D-mano-heptose; Kdo, 2-queto-desoioctonato; P, fosfato (adaptado de Beutler & Rietschel<sup>(8)</sup>).

Após a morte e lise bacteriana, e também quando a bactéria se multiplica, o LPS é liberado de sua superfície. A molécula do LPS, sintetizada pelas bactérias selvagens (LPS de forma S), pode ser dividida, estrutural e funcionalmente, em três sub-regiões: polissacarídeo O, região central (*core*) e lipídeo A (figura 1.1C e 1.2). O lipídeo A representa a estrutura mais conservada do LPS e retém a toxicidade da molécula<sup>(9)</sup>, o que foi confirmado quando se demonstrou que o lipídeo A sintético tinha atividade biológica idêntica ao lipídeo A e ao LPS bacterianos<sup>(10)</sup>. Por intermédio do lipídeo A, o LPS interage com vários tipos celulares, como células mononucleares, células endoteliais, polimorfonucleares e, de particular importância, os monócitos e macrófagos.

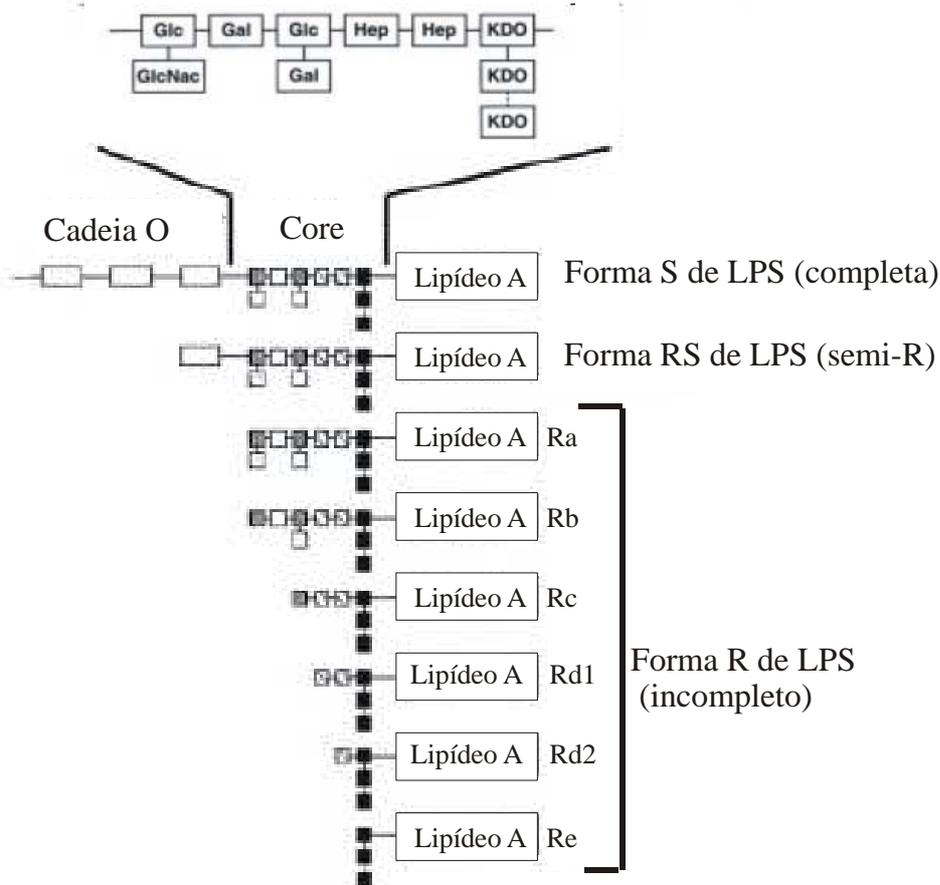


**Figura 1.2:** Representação esquemática do LPS de *Salmonella*, mostrando a cadeia específica O, o core e o lipídeo A<sup>(9)</sup>.

### 1.2.1 Diferentes formas de LPS

A morfologia da colônia (*smooth* – lisa ou *rough* – rugosa) indica seu *status* de O-glicosilação. Variantes microbianas com longas cadeias no polissacarídeo O formam colônias lisas, enquanto as com curtas cadeias formam colônias rugosas, de onde surge a designação de LPS de tipo S (de colônias lisas) e de tipo R (de colônias rugosas) (figura 1.3). A forma R, sintetizada pelas mutantes rugosas de bactérias gram-negativas, não possui a cadeia O específica. Além disso, o *core* pode apresentar diferentes números de polissacarídeos, dependendo da classe (Ra a Re) a qual o mutante pertence<sup>(11-14)</sup> (figura 1.3). O LPS obtido de bactérias selvagens é sempre uma mistura heterogênea de moléculas de forma S, contendo de 1 a 50 repetições de unidades de oligossacarídeos, e contém uma porção variável de moléculas de forma R. Muitas bactérias de relevância clínica sintetizam este tipo heterogênico de LPS. Em adição, bactérias gram-negativas selvagens, como *Chlamydia* e *Neisseria*, sintetizam LPS nos quais o número de resíduos de açúcar é reduzido e assim se assemelham à forma R, pelo menos nas propriedades físico-químicas<sup>(15)</sup>.

As moléculas de LPS são anfipáticas e sua hidrofobicidade diminui com o aumento no número de resíduos de açúcar<sup>(11-14)</sup>. Baseadas nestas diferenças, as formas R e S apresentam períodos diferentes de degradação no sangue e captação pelas células, além de diferente habilidade de induzir o metabolismo oxidativo em granulócitos humanos<sup>(16)</sup> e ativar o sistema complemento<sup>(17)</sup>. Em estudo utilizando alguns fenótipos de *Brucella* foi mostrada diferença de tráfego intracelular e produção de citocinas/quimiocinas por monócitos humanos<sup>(18)</sup>, denotando diferentes respostas do hospedeiro ao rLPS e sLPS. A ação biológica do LPS é mais bem discutida no próximo item.



**Figura 1.3:** Representação esquemática das diferentes formas de LPS. O LPS possui o lipídeo A, o *core* e o polissacarídeo O (antígeno O). Dependendo de quão completa é a molécula de LPS, diferentes formas de LPS R, RS e S podem ser diferenciadas (Kdo, 2-*queto*-desoxioctonato; Hep, L-glicero-D-mano-heptose; Glc, glicose; Gal, galactose; GlcNac, N-acetil-glucosamina)<sup>(15)</sup>.

### 1.2.2 Ação biológica do LPS

Os lipopolissacarídeos de formas R e S ativam macrófagos, que liberam mediadores como o fator de necrose tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ), 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<sup>(19)</sup>. Assim, eles são potentes geradores de resposta inflamatória. *In vivo*, estas moléculas podem ter ação local ou serem liberadas na circulação, através da qual são transportadas para diferentes células e órgãos, resultando na repercussão sistêmica da infecção<sup>(7)</sup>.

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, com alta afinidade pela endotoxina bacteriana, forma o complexo LPS-LBP<sup>(20, 21)</sup>, e facilita a ligação do LPS ao CD14, potencializando a ativação do macrófago induzida pelo LPS, e

subseqüentemente a produção de citocinas pro-inflamatórias, como o TNF- $\alpha$ <sup>(20, 22)</sup>. Desta forma aumenta a capacidade do hospedeiro na detecção de LPS em fase inicial da infecção, podendo ser importante para o controle da mesma<sup>(23, 24)</sup>. Entretanto, a presença da LBP pode ser deletéria em estágios avançados de infecção, exacerbando ainda mais a resposta inflamatória<sup>(25)</sup>. Altas concentrações de LBP presentes durante a fase aguda da infecção inibem a resposta inflamatória a produtos patogênicos<sup>(26)</sup>, enquanto que em baixas concentrações age como um receptor solúvel para o LPS e amplifica os efeitos da endotoxina nas células alvo<sup>(26, 27)</sup>.

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)<sup>(22)</sup>. O receptor CD14 é composto de glicoproteína ancorada a membrana por glicosilfosfatidilinositol (GPI) de 55 kDa e é encontrado na membrana de monócitos, macrófagos e em menor proporção em granulócitos<sup>(24)</sup>. O sCD14 é encontrado no plasma, soro e sobrenadante de cultura celular e 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<sup>(28, 29)</sup>.

### 1.2.3 Integrinas, receptores envolvidos em resposta inflamatória e ação bactericida

As células efectoras mais importantes da imunidade inata são os neutrófilos e macrófagos, os quais são capazes de fagocitar e englobar patógenos, secretar um amplo espectro de citocinas e quimiocinas, e assim coordenar mecanismos adicionais de resposta. Os macrófagos, derivados dos monócitos do sangue, são células apresentadoras de antígenos, interligando a imunidade inata e adaptativa. Estão presentes em vários tecidos do corpo, sendo capazes de fagocitar e matar micróbios, mas sua principal função é recrutar outras células para o sítio da infecção, como as polimorfonucleares, e apresentar os antígenos. Os fagócitos polimorfonucleares (neutrófilos, basófilos e eosinófilos) são de função chave para conter a infecção. Neutrófilos são células matadoras profissionais, embora tenham vida curta na circulação (apenas 6 h), tendo armas efectoras importantes. A exposição de neutrófilos a bactéria ou a produtos bacterianos ativa essas células, desencadeando a resposta inflamatória, que resulta na eliminação do patógeno.

Antes que os micróbios sejam fagocitados e destruídos, leucócitos presentes na periferia precisam alcançá-los, um complexo processo que envolve a atração por quimiocinas, rolamento e adesão sobre a superfície dos vasos, seguida da migração celular para o meio extra-vascular<sup>(30)</sup> (figura 1.4).

A resposta de leucócitos a citocinas quimioatrativas (quimiocinas) é um evento central em respostas inflamatórias. A IL-8 pertence às quimiocinas CXC e tem um papel central no

recrutamento de polimorfonucleares (PMN) aos sítios de infecção, causado por produtos bacterianos ou injúria tecidual<sup>(31, 32)</sup>. A IL-8 atrai e ativa os PMN via receptores CXCR1, que se ligam seletivamente ao IL-8 com alta afinidade, e CXCR2, que se ligam a uma grande variedade de quimiocinas CXC, incluindo IL-8<sup>(32, 33)</sup>.

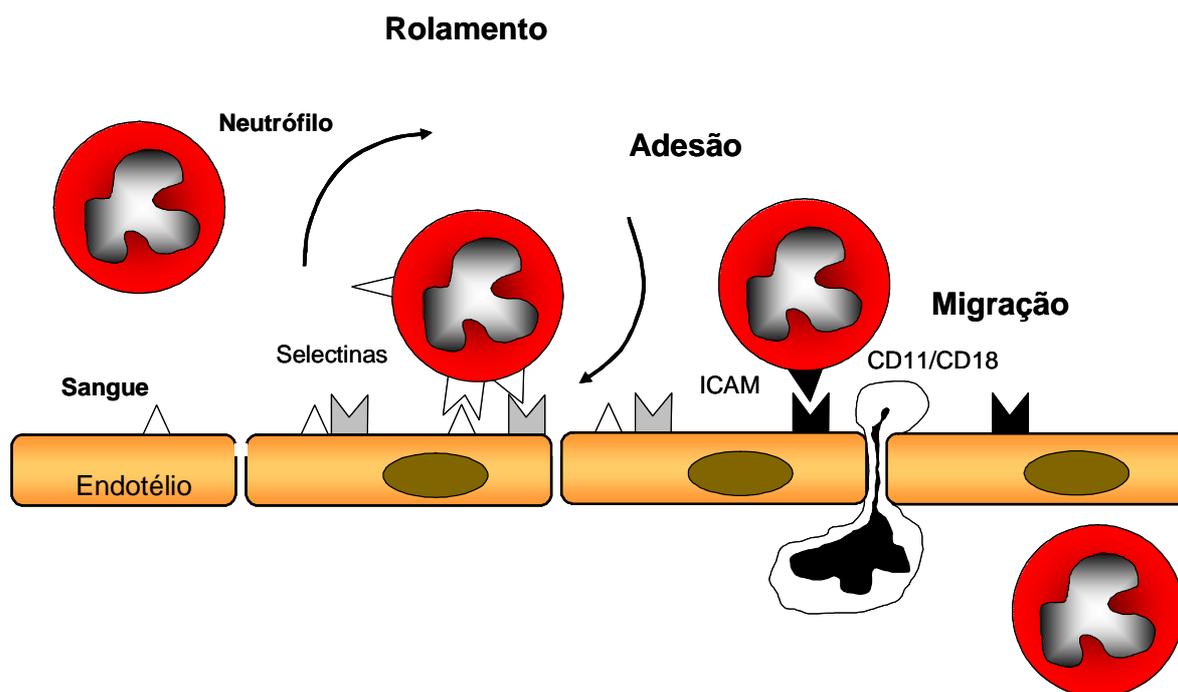
As integrinas formam heterodímeros através da associação das subunidades  $\alpha_L$  (CD11a),  $\alpha_M$  (CD11b),  $\alpha_X$  (CD11c) e  $\alpha_D$  (CD11d) com a subunidade  $\beta_2$  (CD18)<sup>(34)</sup>, e são importantes na interação dos leucócitos com as moléculas de adesão do endotélio para posterior migração celular, mesmo na ausência de infecção. Entretanto, a expressão destas moléculas de superfície pode estar aumentada na presença de agentes patogênicos, através da liberação de mediadores inflamatórios pelas células endoteliais, como quimiocinas e citocinas, o que por um lado é importante para a migração para o foco infeccioso e por outro pode contribuir para lesão e disfunção orgânica<sup>(35)</sup>. Além do papel na migração de leucócitos, é importante lembrar que o CD11b/CD18 já chegou a ser sugerido como receptor do LPS em macrófagos humanos<sup>(36)</sup>. Em estudo de Perera *et al.*<sup>(37)</sup> foi indicado que CD11b/CD18 pode não ser necessário para as respostas induzidas por LPS, como a produção de citocinas, mas que tem um papel significativo na produção ótima dos genes COX-2, IL-12 p35 e IL-12 p40 em resposta a tal antígeno em macrófagos de origem murina. Uma associação transiente entre CD14 e CD11b/CD18 também foi reportada em neutrófilos em resposta a LPS<sup>(38)</sup>.

CD66b é outra glicoproteína que parece envolvida na ativação<sup>(39)</sup> e migração de neutrófilos, através da regulação da adesividade do CD11b/CD18<sup>(40)</sup>, e na adesão destas células à fibronectina, uma glicoproteína presente no endotélio e na matriz extracelular, que participa de migração de células<sup>(41)</sup>. Assim, apresenta papel crucial na diapedese.

Depois de atravessar o endotélio, os fagócitos podem realizar sua função e matar os parasitas invasores. Patógenos invasores são fagocitados e mortos através de um arsenal potente de enzimas, proteínas catiônicas, espécies reativas de oxigênio (EROs)<sup>(42)</sup>, espécies reativas de nitrogênio, e outras, liberadas pelos fagossomos<sup>(43, 44)</sup>. A geração de EROs em fagócitos é dependente principalmente de NADPH-oxidase, um complexo enzimático presente na membrana citoplasmática, que uma vez ativado atua como doador de elétrons e converte o oxigênio molecular em seu produto reduzido, o ânion superóxido ( $O_2^-$ ). O ânion superóxido é convertido em peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) através de uma reação catalisada pela enzima superóxido dismutase. Em consequência, o  $H_2O_2$  é substrato para a geração de oxidantes potentes<sup>(6, 45, 46)</sup>.

Parte dos sintomas produzidos pela endotoxemia pode ser resultado de aumento de liberação de óxido nítrico (NO) e, de fato, vários artigos mostraram que há aumento considerável de metabólitos de NO no plasma durante a endotoxemia<sup>(47, 48)</sup>. Leucócitos podem representar um

importante gerador deste mediador. A indução de NO sintase (iNOS) em fagócitos mononucleares é dependente, *in vivo* e *in vitro*, de ativação por citocinas que agem sinergicamente com produtos bacterianos<sup>(49, 50)</sup>. É bem estabelecido que o LPS leva à indução de iNOS em granulócitos<sup>(42, 50, 51)</sup> e monócitos<sup>(50)</sup> humanos. O NO produzido pelos leucócitos participa da atividade de morte de diferentes patógenos<sup>(52, 53)</sup>, além de ser um mecanismo autócrino que pode regular a ativação e migração de neutrófilos durante várias condições patofisiológicas *in vivo*<sup>(54)</sup>.



**Figura 1.4:** Mecanismo de rolamento e migração de neutrófilos para o foco infeccioso (adaptado de Falcão *et al.*<sup>(55)</sup>; Abbas *et al.*<sup>(56)</sup>).

### 1.3 Sinalização desencadeada pelo LPS

O mecanismo pelo qual o CD14 transmite um sinal capaz de causar ativação celular 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<sup>(24)</sup>. Poltorak *et al.*<sup>(57)</sup> 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 permitindo a estes camundongos um fenótipo de resistência ao LPS. Desta forma, é possível que mutações no gene *Tlr4* em humanos possam influenciar na suscetibilidade e evolução a infecção por bactérias gram-negativas<sup>(58)</sup>.

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<sup>(59)</sup>.

Os monócitos e macrófagos expressam outros receptores de superfície envolvidos no reconhecimento e sinalização do LPS. São as moléculas da família das integrinas, já citadas no item 1.2.3. Os receptores CD11b/CD18 e CD11c/CD18 estariam envolvidos no reconhecimento do LPS<sup>(60)</sup>. Há indícios que CD11/CD18 e CD14 utilizam um caminho comum de ativação celular induzida pelo LPS, o TLR4. Entretanto devido à baixa eficiência do complexo CD11/CD18-TLR4 em comparação com CD14-TLR4, sua relevância biológica provavelmente é limitada<sup>(61)</sup>.

O reconhecimento precoce da presença de microrganismos é imperativo para o hospedeiro controlar o processo infeccioso. Os patógenos têm estruturas moleculares conservadas, chamadas de PAMPs, como, por exemplo, LPS, peptidoglicano, ácido lipoteicóico, lipoproteínas e DNA bacteriano, que são identificadas através dos receptores de reconhecimento padrão (PRRs) presentes nas células de imunidade inata do hospedeiro. Desta forma se inicia uma resposta imune imediata a invasão microbiana. Os TLRs, conservados evolutivamente, são um exemplo dos primeiros sensores da imunidade inata<sup>(62)</sup>.

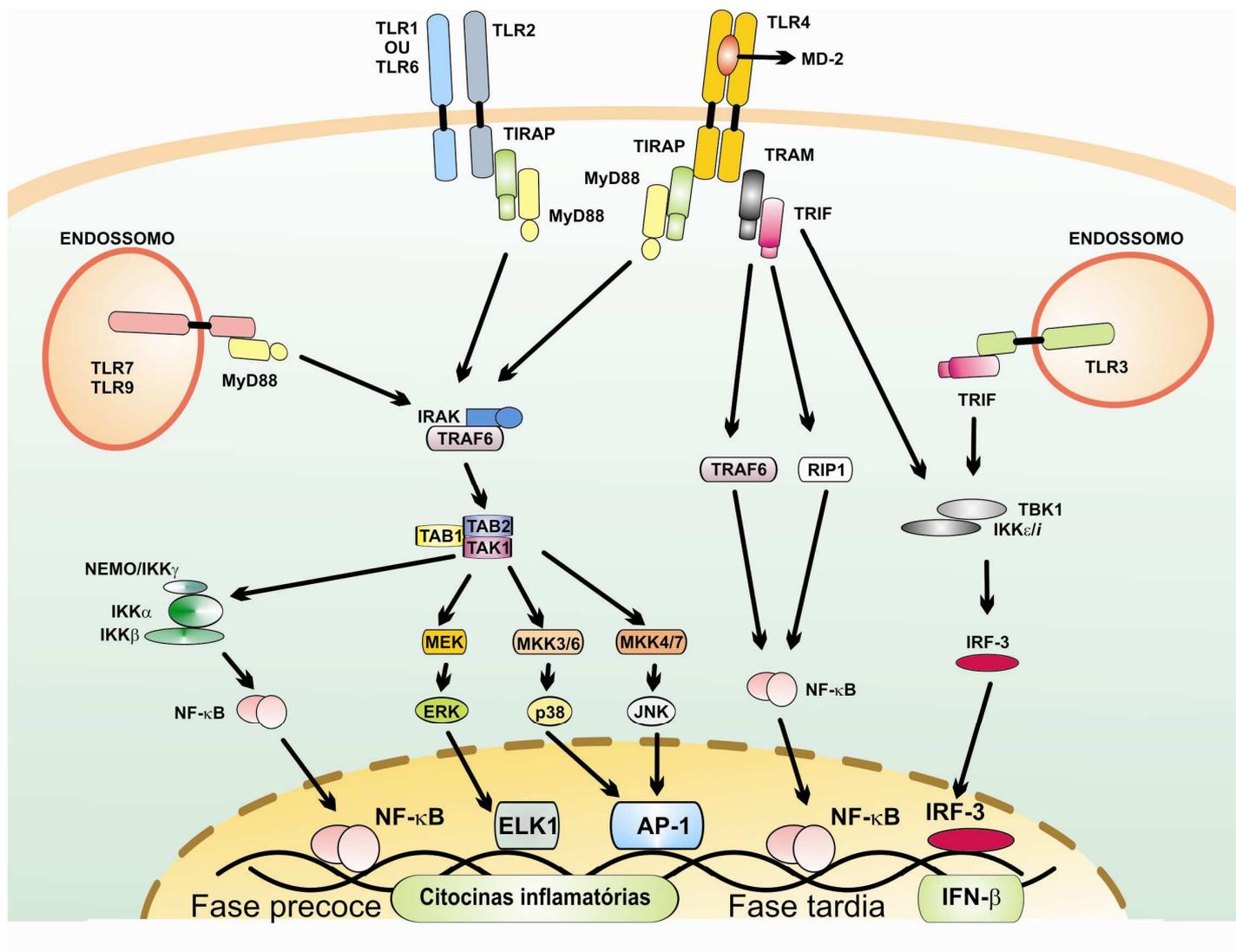
Os TLRs são compostos por proteínas transmembranas ricas em leucina com porção citoplasmática muito similar ao receptor de interleucina-1, conseqüentemente funcionam como transdutor de sinalização. Esta porção é conhecida como domínio homólogo ao receptor Toll/IL-1 (TIR)<sup>(63)</sup>.

Os TLR2 e TLR4 são essenciais no reconhecimento de diferentes componentes da parede bacteriana. Este reconhecimento é feito através da formação de dímeros, que podem ser heterodímeros, como no caso do TLR2 (com o TLR1 e TLR6), ou homodímeros, como no caso do TLR4. Isto explicaria porque estes receptores são capazes de identificar uma variedade maior de ligantes do que o TLR4<sup>(64)</sup>.

A sinalização por TLRs pode ocorrer através de mecanismos dependentes de MyD88 e independentes de MyD88 (também conhecidos como dependentes de molécula adaptadora de interferon- $\beta$  (TRIF)). A sinalização dependente de MyD88 envolve outra molécula chamada proteína adaptadora contendo o domínio TIR (TIRAP), que recruta a quinase 1 associada ao IL-1R (IRAK-1), e o fator associado ao receptor de necrose tumoral 6 (TRAF6), levando a ativação de 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)<sup>(61)</sup>, ou translocação do fator de transcrição NF $\kappa$ B. A sinalização dependente de MyD88 é crucial para a produção de citocinas inflamatórias como o TNF- $\alpha$ . A sinalização dependente de TRIF (ou independente de

MyD88) envolve a molécula adaptadora relacionada à TRIF (TRAM), levando à ativação dos fatores de transcrição IRF-3 e IRF-7, promovendo a síntese de interferon (IFN)- $\beta$  e IFN- $\alpha$ , respectivamente. Translocação do fator de transcrição NF $\kappa$ B também pode ocorrer, embora seja mais tardiamente<sup>(65)</sup> (figura 1.5). Ambas as vias estão envolvidas na produção de óxido nítrico sintase induzível, levando à produção de NO, atualmente visto como importante mediador inflamatório e mecanismo efetor na morte de patógenos<sup>(6, 66)</sup>.

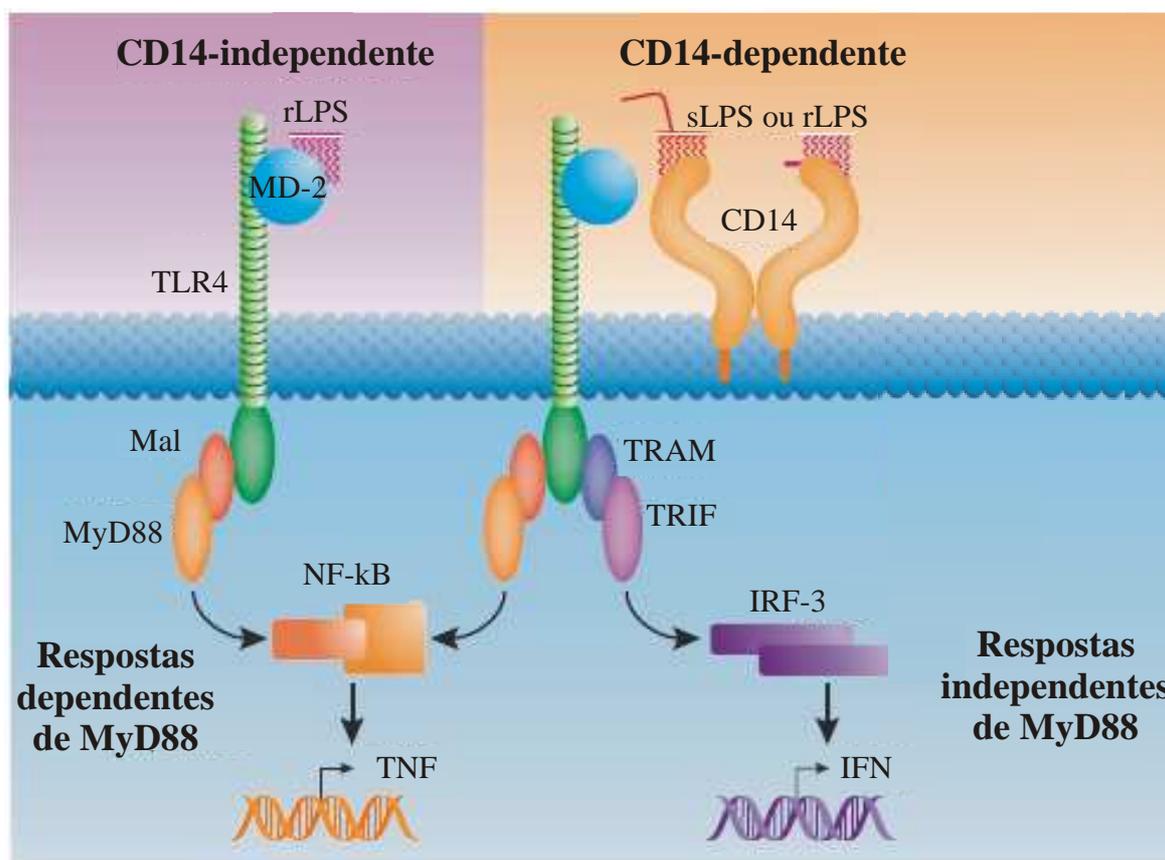
O fator de transcrição NF $\kappa$ B consiste de homo ou heterodímeros de um grupo de 5 proteínas, chamadas NF $\kappa$ B1 (p50 e seu precursor p105), NF $\kappa$ B2 (p52 e seu precursor p100), p65/RelA, c-Rel e RelB<sup>(67)</sup>. No estado repouso, NF $\kappa$ B se encontra preso no citoplasma da célula por uma forte associação com proteínas inibitórias chamadas de I $\kappa$ Bs. Com a estimulação celular, as proteínas I $\kappa$ Bs são rapidamente fosforiladas e degradadas por proteossomas, e o NF $\kappa$ B liberto transloca para o núcleo para regular a expressão de múltiplos genes<sup>(68)</sup>.



**Figura 1.5:** Vias de sinalização dos TLRs (adaptado de Takeda & Akira<sup>(65, 69)</sup> e Liew *et al.*<sup>(69)</sup>).

## 1.4 Justificativa

Importante progresso na compreensão da sinalização de resposta celular por formas R e S de LPS foi alcançado recentemente. Demonstrou-se, a partir de camundongos geneticamente modificados, que a forma R de LPS poderia induzir sinalização celular de forma independente de CD14. Esta sinalização ocorreria pela via dependente de MyD88. A forma R de LPS, assim como o sLPS, também pode se acoplar a CD14/MD2/TLR4 induzindo sinalização por via MyD88 dependente e independente. Em contraste, a forma S de LPS dependeria do CD14 para efetivamente induzir sinalização celular<sup>(70, 71)</sup> (figura 1.6). Lipídeo A e rLPS são capazes de ativar TLR4/MD-2 sem CD14, enquanto a forma S de LPS requer CD14<sup>(15)</sup>.



**Figura 1.6:** Sinalização dependente e independente de CD14. O complexo TLR4-MD2 pode se ligar à forma R, mas não à forma S de LPS sem a necessidade de CD14. A sinalização por este complexo é limitada à via dependente de MyD88, usando os adaptadores Mal e MyD88 para ativar NFκB. O complexo TLR4-MD2 pode se ligar a ambas as formas (r e sLPS) em um processo dependente de CD14. Adicionando-se aos sinais dependentes de MyD88, este complexo também pode ativar respostas independentes de MyD88 via TRAM e TRIF, levando à ativação de IRF-3 (adaptado de Godowski<sup>(71)</sup>).

Para sinalização através de via independente de MyD88, entretanto, CD14 é necessário tanto para r quanto para sLPS<sup>(70)</sup>. Estes estudos ajudam a compreender a resposta celular induzida

por LPS em células desprovidas de CD14 na superfície. Este é o caso de células como mastócitos, onde a forma R induziu maior atividade que a forma S<sup>(15)</sup>. Obviamente, deve-se considerar que preparações de forma S de LPS são heterogêneas e apresentam conteúdo de estruturas de forma R, como é classicamente demonstrada em eletroforese por gel de agarose.

Outro estudo mostrou que quanto maior a quantidade de carboidratos retirada do sLPS, maior o decaimento da sensibilidade de macrófagos de camundongos CD14<sup>+/+</sup> (em até 500 vezes). Em contraste, macrófagos CD14<sup>-/-</sup> são incapazes de distinguir entre sLPS e suas várias estruturas parciais, além de serem muito menos sensíveis ao sLPS quando comparados àqueles que expressam o CD14<sup>(72)</sup>.

Há enorme interesse na melhor compreensão da resposta de neutrófilos ao LPS. Como se sabe, estas células expressam muito menos CD14 em sua superfície que os monócitos, todavia são extremamente sensíveis à ação do LPS<sup>(6)</sup>. É de grande importância então estudar a dinâmica da expressão de CD14 nesta célula, ao mesmo tempo em que se compara a ação de forma R e S de LPS em monócitos e neutrófilos do sangue periférico.

Neste estudo avaliamos a expressão de CXCR2, um receptor envolvido no processo de quimiotaxia de neutrófilos, TLR2 e TLR4, os PRRs de bactérias gram-positivas e gram-negativas, CD66b, uma selectina com funções de sinalização<sup>(73)</sup>, e CD11b e CD11c, integrinas envolvidas em adesão a células endoteliais, assim como na sinalização a LPS<sup>(74)</sup>. A atividade de neutrófilos também foi avaliada pela geração de EROs e de NO, e a ativação de proteínas de sinalização. Também analisamos os mesmos receptores em monócitos, incluindo o CD14 e HLADR, além do metabolismo oxidativo, produção de NO e ativação de proteínas de sinalização.

## *2. Objetivos*

---

Após explanação inicial, os objetivos do presente trabalho foram:

- Objetivo geral:

Comparar a ação biológica de formas R e S de LPS em neutrófilos e monócitos do sangue periférico de humanos sadios.

- Os objetivos específicos foram avaliar a resposta ao R e S de LPS quanto a:

1. Dinâmica da expressão dos receptores CD14, CD66b, TLR2, TLR4, CXCR2, HLADR, CD11b e CD11c na superfície de monócitos e granulócitos.
2. Indução de produção de espécies reativas de oxigênio em neutrófilos.
3. Produção de óxido nítrico em monócitos e neutrófilos.
4. Indução de ativação de p38 em monócitos e neutrófilos.
5. Indução de translocação de p65 e p50 em neutrófilos.

### *3. Materiais*

---

### 3.1 Anticorpos

**Tabela 3.1:** Lista de anticorpos utilizados no estudo.

Anticorpo	Quantidade ( $\mu$ l)	Clone	Isotipo	Fabricante
CD66b FITC <sup>1</sup>	5	G1OF5	mIgM	BD Bioscience Pharmingen
CD11c APC <sup>2</sup>	2	S-HCL-3	mIgG <sub>2b</sub>	BD Bioscience
CD11b APC	2	D12	mIgG <sub>2a</sub>	BD Bioscience
CD14 PerCP <sup>3</sup>	6	M $\phi$ P9	mIgG <sub>2b</sub>	BD Bioscience
CXCR2 APC	3	6C6	mIgG <sub>1</sub>	BD Bioscience Pharmingen
HLA-DR PE <sup>4</sup>	2	27-35	mIgG <sub>2b</sub>	BD Bioscience Pharmingen
TLR2 PE	10	TL2.1	mIgG <sub>2a</sub>	eBioscience
TLR4 PE	20	HTA125	mIgG <sub>2a</sub>	eBioscience
TNF- $\alpha$ APC	50 uL (1:100)*	MAb11	mIgG <sub>1</sub>	BD Bioscience Pharmingen
IL10 APC	50 uL (1:50)*	JES3-19F1	rIgG <sub>2a</sub>	BD Bioscience Pharmingen
IL8 PE	15uL	AS14	mIgG <sub>1</sub>	BD Bioscience
IL6 PE	10 uL	AS12	mIgG <sub>1</sub>	BD Bioscience
CD14 PE	5uL	M5E2	mIgG <sub>2a</sub>	BD Bioscience Pharmingen
CD15 APC	4uL	HI98	mIgM	BD Bioscience Pharmingen
p50 PE	10 uL	sc-8414	IgG1	Santa Cruz Biotechnology
p65 PE	10 uL	sc-8008	IgG1	Santa Cruz Biotechnology

1. FITC: fluoresceína isotiocianato

2. APC: alofocianina

3. PerCP: clorofila peridina

4. PE: ficoeritrina

\* anticorpos diluídos em tampão de permeabilização.

### 3.2 Aparelhos e Softwares

- BD FACSCalibur (BD Bioscences)
- BD FACSCanto (BD Bioscences)
- Cell Quest™ Software versão 3.3 (BD Bioscences)
- Centrífuga 5403 (Eppendorf)
- Centrífuga citológica modelo 248 (Fanem)
- FACSDiva Software versão 4.1 (BD Bioscences)
- FCAP Array Software versão 1.0.1 (BD Bioscences)
- HP Workstation XW4200 (Microsoft)
- Image Pro 6.0 (Microsoft)
- Leitor Multiscan EX (Labsystems)
- Macintosh Power PC, modelo G4 (Apple Computer Inc.)
- Microcentrífuga 5415R (Eppendorf)

- Microscópio de fluorescência Olympus BX51 equipado com módulo de epifluorescência e régua de filtros para DAPI, FITC e Texas Red. Câmera acoplada DP71 (Olympus)
- Microsoft Office Excel 2003 (Microsoft)
- Sistema de captura de imagem AxioVision Rel.4.2 acoplado ao microscópio AxioLab Standart 2.0 (Carl Zeiss)
- Sonicador VC 130 (Sonics & Materials Inc.)
- Vórtex MS1 Minishaker (IKA)

### 3.3 Reagentes e estímulos

- 7-AAD (BD Bioscience Pharmingen)
- DAPI I (Abbott Molecular Inc)
- Entellan (Merck)
- Faloidina-FITC, gentilmente doada pelo laboratório de Parasitologia da Disciplina de MicroImunoParasito da Universidade Federal de São Paulo
- Ficoll-paque plus (Amersham Bioscience)
- Fosfo-ERK1/2 (T202/Y204) *Flex Set* (BD Biosciences)  
Padrão, Reagente de detecção e *Bead* de captura (posição C4) para a referida proteína
- Fosfo-p38 (T180/Y182) *Flex Set* (BD Biosciences)  
Padrão, Reagente de detecção e *Bead* de captura (posição B5) para a referida proteína
- Fosfo-JNK1/2 (T183/Y185) *Flex Set* (BD Biosciences)  
Padrão, Reagente de detecção e *Bead* de captura (posição B6) para a referida proteína
- LPS de *Salmonella abortus equi* (LPS forma S) e *Salmonella minnesota* (LPS forma Re)  
Obtidos pelo método do fenol-água e purificado com fenol, clorofórmio e éter de petróleo, gentilmente cedidos pelo Dr Chris Galanos, Instituto Max-Planck de Imunobiologia, Freiburg, Alemanha<sup>(11)</sup>.
- PMA (forbol 12-miristato 13-acetato) (Sigma)
- Reagente de Bradford (*BioRad*)
- Reagentes do kit *Cell Signaling Master Buffer Kit* (BD Biosciences)  
tampão de denaturação; tampão de lavagem C; diluente de ensaio; diluente de partículas de captura; diluente de reagente de detecção; partículas de calibração do citômetro (A1, F1, PE-F1, A9 e F9)
- *Staphylococcus aureus*, gentilmente doado por Dra. Aparecida Dalboni, da Disciplina de Nefrologia da Universidade Federal de São Paulo

- Solução fisiológica de NaCl a 0,9% estéril (Áster)
- Solução de inibidor de tripsina 1x (Sigma)
- Solução de lise BD<sup>TM</sup> (BD Biosciences)
- Soro AB humano (Valley Biomedical, Inc.)

### 3.4 Soluções e meio de cultura

- Corante *trypan blue*

*Trypan blue* (Sigma) 0,1% em PBS

- DAF-FM DA (Invitrogen): Solução estoque: 5 mM (diluída em Dimetilsulfóxido (DMSO) (Calbiochem)); Solução de uso: 0,05 mM (1 uL da estoque+99 uL de PBS); Concentração final no tubo: 10 uM

- DCFH-DA (Sigma): Solução estoque: 25 mM (diluída em Etanol (Merck)); Solução de uso: 0,3 mM (100 uL da estoque+8,2 mL de PBS); Concentração final no tubo: 60 uM

- Dextran 3%

Dextran 3% (Amershan) diluído em PBS estéril

- EDTA 3 mM

EDTA 3 mM (Sigma) diluído em PBS

- Eosina

Eosina (Merck) 2 g em 20 mL de etanol (Merck). Bicromato de potássio (Merck) 1 g em 160 mL de água. Soluções misturadas e adicionados 20 mL de solução aquosa saturada de ácido pícrico.

- Hematoxilina de Carazzi

Alúmen de potássio (Merck) 25 g em 350 mL de água destilada quente; parar o aquecimento, adicionar 0,5 g de Hematoxilina (Merck) à solução. Iodeto de potássio (Merck) 0,1 g em 50 mL de água destilada. Soluções juntas e 100 mL de glicerina (Merck). Para conservar colocar cristais de Timol.

- Meio de cultura RPMI 1640 pH 7,0

Meio RPMI 1640 autoclavável (Sigma), Penicilina G 10 IU/mL (Gibco), Estreptomicina sulfatada 10 ug/mL (Gibco), L-glutamina 200 mM (Sigma)

- Monensina 1 mM (Sigma)

Monensina 1 mM diluída em DMSO

- Paraformaldeído 1% pH 7,6

Paraformaldeído 1% (Polysciences, Inc) diluído em PBS

- Paraformaldeído 4% pH 7,6 ou Tampão de fixação (pH 7,4-7,6)

Paraformaldeído 4% diluído em PBS

- PBS 0,15 M pH 7,2

NaCl 0,286 M (Merck),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2,95 mM (LabSynth),  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  16,4 mM (LabSynth), KCl 5,56 mM (LabSynth)

- PBS 1% azida sódica

Azida sódica 1% (Sigma) diluído em PBS

- Solução de Cloreto de Amônio pH 7,4

$\text{NH}_4\text{Cl}$  296,1 mM (LabSynth),  $\text{KHCO}_3$  20 mM (LabSynth), EDTA 0,102 mM (Sigma)

- Solução estoque de albumina bovina sérica (BSA – Sigma) 100 mg/mL

10 mg de BSA em água milliQ q.s.p. 100 mL

- Tampão Citrato pH 7,6

Sacarose 250 mM (Sigma), Citrato trissódico 40 mM (Sigma), DMSO 5% em água milliQ

- Tampão de lavagem A

Soro bovino fetal 2% (Gibco), Azida sódica 0,01% diluídos em PBS

- Tampão de lavagem B

BSA 0,5%, Tween-20 (Casa Americana de Artigos para Laboratório) 0,05% diluídos em PBS

- Tampão de lise A pH 7,6

Ácido Etanosulfônico 4-2 Hidroxietil Piperazina-1 (HEPES) 20 mM (Sigma), Glicerol 10% (Merck), NaCl 150 mM, Triton X-100 1% (Sigma),  $\text{MgCl}_2$  1,5 mM (Sigma), EGTA 1 mM (Amresco, Inc.), diluídos em água milliQ.

Imediatamente antes do uso, adicionar ao tampão: Aprotinina 1 ug/mL(Sigma); Leupeptina 1 ug/mL (Sigma); PMSF (fluoreto de fenilmetilsulfonil) 1 mM (Amresco, Inc.); Ortovanadato de sódio 2 mM (Sigma) (feito no momento do uso, não usar solução estoque); Fluoreto de sódio 50 mM (Sigma) e Pirofosfato de sódio tetrabásico 10 mM (Sigma).

- Tampão de lise B pH 7,6

Citrato trissódico 3,4 mM, Nonidet P-40 0,1% (ICN Biomedicals), Tripsina 0,2% (Sigma),

Tetraclorido de espermina 1,5 mM (Sigma), Tris 0,5 mM (Invitrogen) qsp 100 mL

- Tampão de marcação pH 7,4-7,6

Soro bovino fetal 1%, Azida sódica 0,1% diluídos em PBS

- Tampão de permeabilização pH 7,4-7,6

Soro bovino fetal 1%, Saponina 0,1% (Sigma), Azida sódica 0,1% diluídos em PBS

- Triton X-100 0,1% em paraformaldeído 4%

## *4. Métodos*

---

Os voluntários sadios foram incluídos no estudo após assinatura do consentimento livre e esclarecido (vide Apêndice 2). O estudo teve início após aprovação (nº. 1304/05) pelo Comitê de Ética do Hospital São Paulo/UNIFESP (Apêndice 1). Eles pertenciam a diferentes faixas etárias, não estavam em uso de medicação e participaram espontaneamente do estudo.

Todos os reagentes, estímulos, anticorpos e soluções mencionadas nesta seção encontram-se descritos na seção Materiais.

#### **4.1. Análise da expressão de receptores na superfície de leucócitos após estimulação com r e sLPS**

##### **4.1.1 Coleta de sangue**

Para os estudos de dinâmica de receptores na superfície das células, de cada indivíduo sadio foram coletados de 20 mL a 40 mL de sangue em tubo a vácuo contendo heparina. As coletas e os ensaios de cada teste foram realizados em diferentes momentos.

##### **4.1.2 Estimulação *in vitro* de sangue total para estudo da dinâmica de receptores da superfície de monócitos e neutrófilos**

Foram feitas curvas de dose-resposta e cinética da expressão de receptores após estimulação com diferentes concentrações e tempos com r e sLPS, respectivamente.

A relação de anticorpos monoclonais de superfície que foram utilizados para identificação das populações de leucócitos, verificação da expressão de receptores e volumes utilizados estão contidos na seção Materiais (item 3.1).

##### **4.1.2.1 Dose-Resposta**

Quinhentos microlitros de sangue heparinizado foram distribuídos em tubos de polipropileno de 5 mL que posteriormente receberam um estímulo cada (rLPS ou sLPS nas concentrações de 0; 1; 10; 100 ou 1000 ng/mL). Foram feitos estímulos por 30 e 180 min, em estufa a 37°C de temperatura com saturação de 5% CO<sub>2</sub>. Após a incubação, 100 uL foram transferidos para tubos de citometria. Foram acrescentados 2 mL de PBS seguido de centrifugação a 2500 x g por 5 min a 4°C. Após o descarte do sobrenadante os tubos receberam 2 mL de solução de lise BD<sup>TM</sup>, sendo incubados durante 15 min em temperatura ambiente para lise

das hemácias. Em seguida, os tubos foram centrifugados e os sobrenadantes descartados. Foi feita nova lavagem com 2 mL de PBS. Os tubos receberam os anticorpos como descrito na tabela 4.1 e foram incubados por 15 min no escuro.

**Tabela 4.1:** Pannel de anticorpos utilizados em cada tubo na dose-resposta para estudo de dinâmica de expressão de receptores em sangue total\*.

Tubo	FITC	PE	PerCP	APC
1	CD66b	HLA-DR	CD14	CD11b

\*As quantidades dos anticorpos encontram-se na seção Materiais.

Posteriormente, foram acrescentados aos tubos 2 mL de PBS, sendo os mesmos novamente centrifugados. Após descarte dos sobrenadantes, as amostras foram suspensas em 0,3 mL de PBS com 1% azida de sódio.

A imunofenotipagem foi lida em citômetro de fluxo como descrito no item 4.1.5.

#### 4.1.2.2 Cinética

Quinhentos microlitros de sangue heparinizado foram distribuídos em tubos de polipropileno de 5 mL que posteriormente receberam um estímulo cada (meio, rLPS 100 ng/mL ou sLPS 100 ng/mL). Foram feitos estímulos por 5, 15, 30, 60, 180 e 360 min, em estufa a 37°C com 5% CO<sub>2</sub>. Após dados os tempos de incubação, cem microlitros foram transferidos para tubos de citometria. O protocolo de lavagem, lise de hemácias e marcação da superfície foi o mesmo do item 4.1.2.1, excetuando-se o pannel de anticorpos utilizados (tabela 4.2).

**Tabela 4.2:** Pannel de anticorpos utilizados em cada tubo na cinética para estudo de dinâmica de expressão de receptores em sangue total\*.

Tubo	FITC	PE	PerCP	APC
1	CD66b	TLR4	CD14	CD11b
2	CD66b	TLR2	CD14	CD11c
3	CD66b	HLA-DR	CD14	CXCR2

\*As quantidades dos anticorpos encontram-se na seção Materiais.

#### 4.1.2.3 Cinética tardia

Quinhentos microlitros de sangue heparinizado foram distribuídos em tubos de polipropileno de 5 mL que posteriormente receberam um estímulo cada (meio, rLPS 100 ng/mL ou sLPS 100 ng/mL). Foram feitos estímulos por 6, 10 e 24 h, em estufa a 37°C com 5% CO<sub>2</sub>. Após dados os tempos de incubação, 100 uL foram transferidos para tubos de citometria. O

protocolo de lavagem, lise de hemácias e marcação da superfície foi o mesmo do item 4.1.2.1, excetuando-se o painel de anticorpos utilizados (tabela 4.3).

**Tabela 4.3:** Painel de anticorpos utilizados em cada tubo na cinética tardia para estudo de dinâmica de expressão de receptores em sangue total\*.

Tubo	FITC	PE	PerCP	APC
1	CD66b	TLR4	CD14	CD11b

\*As quantidades dos anticorpos encontram-se na seção Materiais.

#### 4.1.3 Estudo da influência da presença de plasma na expressão de receptores de superfície de neutrófilos e monócitos após estimulação com r e sLPS

Os tubos de sangue foram centrifugados a 500 x g por 20 min em temperatura ambiente. Após a centrifugação, o plasma foi retirado de todos os tubos e substituído por diferentes condições em mesmo volume: plasma puro (100%), plasma diluído em meio de cultura RPMI (nas proporções de 50% e 30%) e meio de cultura RPMI (0%). Após inversão e agitação dos tubos, quinhentos microlitros de sangue foram distribuídos em tubos de polipropileno de 5 mL que posteriormente receberam um estímulo cada (meio, rLPS 100 ng/mL ou sLPS 100 ng/mL). Foram feitos estímulos por 3 h, em estufa a 37°C com 5% CO<sub>2</sub>. Após dado o tempo de incubação, cem microlitros foram transferidos para tubos de citometria. O protocolo de lavagem, lise de hemácias e marcação da superfície foi o mesmo do item 4.1.2.1, excetuando-se o painel de anticorpos utilizados (tabela 4.4).

**Tabela 4.4:** Painel de anticorpos utilizados em cada tubo no estudo de influência do plasma na dinâmica de expressão de receptores\*.

Tubo	FITC	PE	PerCP	APC
1	CD66b	-	CD14	CD11b
3	CD66b	-	CD14	CXCR2

\*As quantidades dos anticorpos encontram-se na seção Materiais.

#### 4.1.4 Estimulação *in vitro* de polimorfonucleares e células mononucleares do sangue periférico para estudo da dinâmica de receptores de superfície

##### 4.1.4.1 Separação de células mononucleares do sangue periférico (CMSP) e polimorfonucleares (PMN)

O sangue heparinizado foi diluído 1:1 em solução fisiológica de NaCl a 0,9% estéril. O sangue diluído foi adicionado sobre ficoll-paque plus e centrifugado a 800 x g durante 20 min a

temperatura ambiente. Durante a centrifugação as CMSP foram separadas através de uma diferença de gradiente de densidade formando uma "nuvem" de células acima da camada de ficoll-paque plus. Esta foi coletada e lavada duas vezes em 30 mL de solução fisiológica. As células foram deixadas por 2min em solução de cloreto de amônio para lise de hemácias, sendo adicionado 10 mL de meio RPMI suplementado com 5% de soro AB (concentração determinada em experimentos preliminares) para estabilização e feita nova centrifugação. O botão de células foi suspenso em 5 mL de meio de cultura RPMI. A viabilidade e contagem da suspensão de células foram feitas através do corante *trypan blue* e câmara de Neubauer, respectivamente. A suspensão de células foi corrigida para concentração desejada.

Para isolamento dos PMN a camada de células depositada sobre as hemácias foi submetida a gradiente de 3% dextran em PBS por 30 min. Em seguida o sobrenadante foi colhido e lavado em 20 mL de PBS gelado, com centrifugação de 500 x g por 5 min a 4°C. Foi realizada lise hipotônica das hemácias, adicionando ao botão de células 20 mL de solução 0,2% NaCl, seguido por homogeneização, 20 mL de 1,6% NaCl, seguido de homogeneização e 10 mL de PBS, sendo então centrifugado. O passo de lise das hemácias foi repetido por 2 a 3 vezes. O botão de células livre de hemácias foi suspenso em meio de cultura RPMI suplementado com 5% de soro AB. A viabilidade e contagem da suspensão de células foram feitas através do corante *trypan blue* e câmara de Neubauer, respectivamente. A suspensão de células foi corrigida para a concentração de células desejada.

Ao final das separações as células estavam prontas para serem utilizadas como descrito nos próximos itens.

#### **4.1.4.2 Estudo da expressão de receptores na superfície das células separadas e em co-cultura**

As suspensões de CMSP e de PMN foram distribuídas ou colocadas em co-culturas (com as seguintes diferentes percentagens de CMSP: 0; 12,5; 25 e 50%) em tubos de polipropileno de 5 mL e deixadas por 45 min em estufa a 5% CO<sub>2</sub> e 37°C para estabilização. Cada tubo recebeu um tratamento: meio, rLPS ou sLPS (na concentração de 100 ng/1x10<sup>6</sup> células), por 1 ou 6 h. Dados os tempos de incubação, as amostras foram centrifugadas, os tubos receberam os anticorpos como descrito na tabela 4.5 e foram incubados por 15 min no escuro.

**Tabela 4.5:** Painel de anticorpos utilizados em cada tubo para estudo da dinâmica de expressão de receptores em células separadas ou co-cultivadas\*.

Tubo	FITC	PE	PerCP	APC
CMSP	-	-	CD14	CD11b
PMN	CD66b	-	-	CD11b
CMSP+PM	CD66b	-	CD14	CD11b
N				

\*As quantidades dos anticorpos encontram-se na seção Materiais.

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.

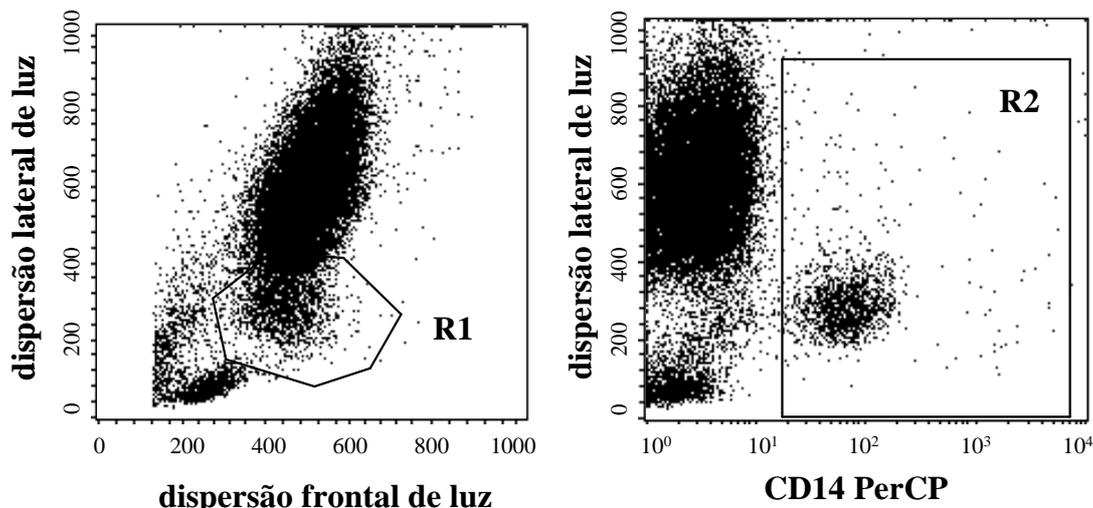
A imunofenotipagem foi lida em citômetro de fluxo como descrito no item 4.1.5.

#### 4.1.5 Citometria de fluxo

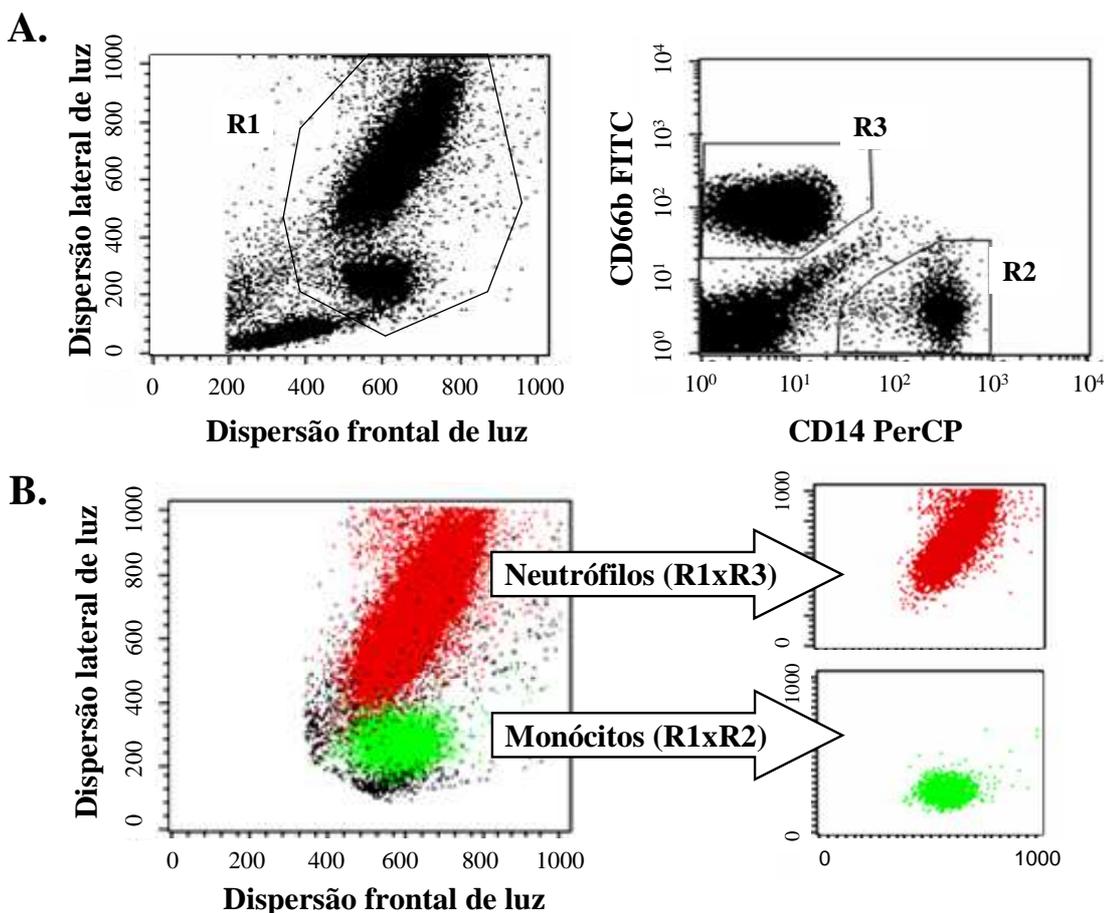
A leitura das amostras foi realizada em citômetro de fluxo FACSCalibur equipado com dois lasers, um de argônio e outro de diodo, com emissão de comprimentos de onda de 488 nm e 633 nm, respectivamente. O laser de argônio possibilita a excitação de três fluorocromos, FITC, PE e PerCP, e o de diodo excita 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 à unidade constituída por um microcomputador Macintosh Power PC, modelo G4, que permite controle sobre o citômetro e armazenamento dos dados em arquivo.

##### 4.1.5.1 Aquisição e análise de eventos em sangue total e co-cultura

Durante a aquisição dos dados, dois gráficos de pontos foram utilizados (figura 4.1). O primeiro, de dispersões frontal (FSC, *forward scatter*) e lateral de luz (SSC, *side scatter*), foi utilizado para determinar uma região R1 de morfologia de monócitos. Utilizando-se outro gráfico de SSC versus expressão de CD14 foi delimitada uma região R2 para eventos positivos para CD14 (marcador de monócitos) (figura 4.1). Através da combinação de R1 com R2, foram adquiridos 5000 eventos, os quais possuíam, portanto, morfologia de monócitos e positividade para CD14. Todos os eventos foram salvos. Tanto a aquisição dos eventos quanto a análise dos resultados foram realizadas através do programa CellQuest.

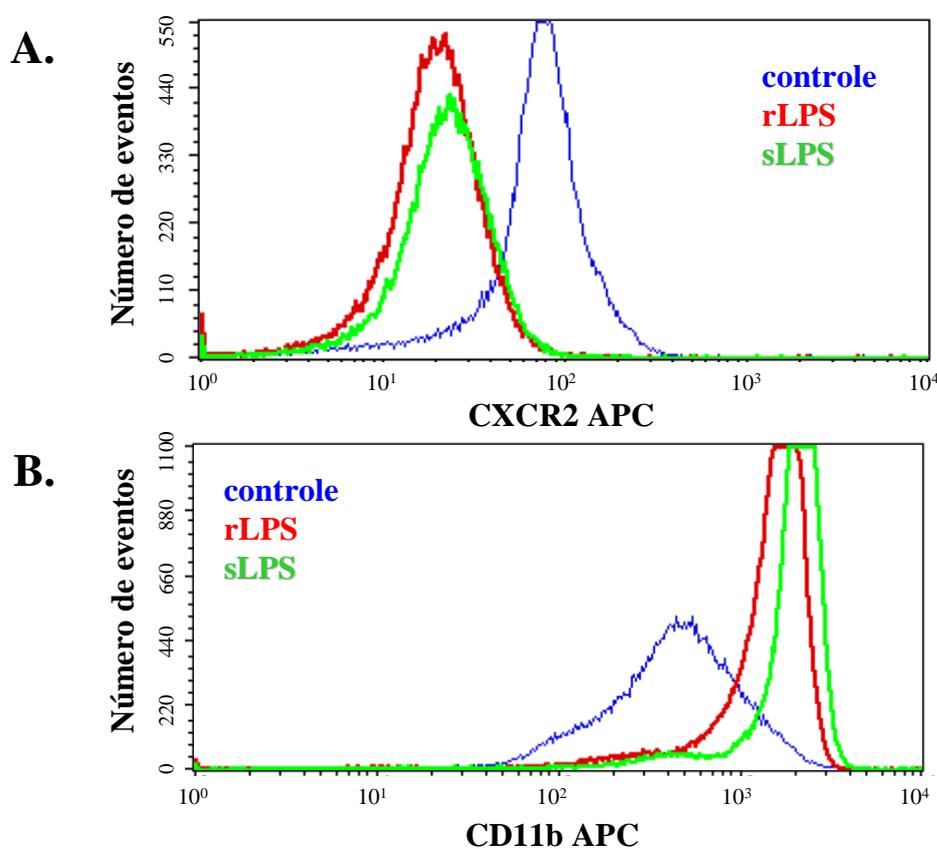


**Figura 4.1:** Estratégia de aquisição de monócitos em sangue total ou co-cultura. O gráfico da esquerda mostra FSC versus SSC. A região 1 (R1) separa a população característica de monócitos. O gráfico da direita mostra a expressão de CD14 e SSC. A região 2 (R2) separa os eventos CD14+. Durante a aquisição foram armazenados 5000 eventos combinando as regiões R1 e R2.



**Figura 4.2:** Estratégia de análise da expressão de receptores em sangue total. **A.** À esquerda: dispersão frontal e lateral de luz. A região 1 (R1) separa a população característica de monócitos e neutrófilos. À direita: região 2 (R2) mostra as células CD14+ (monócitos) e região 3 (R3) as células CD66b positivas (neutrófilos). **B.** A estratégia de análise proporciona uma boa definição das populações de monócito (R1xR2) e neutrófilos (R1xR3).

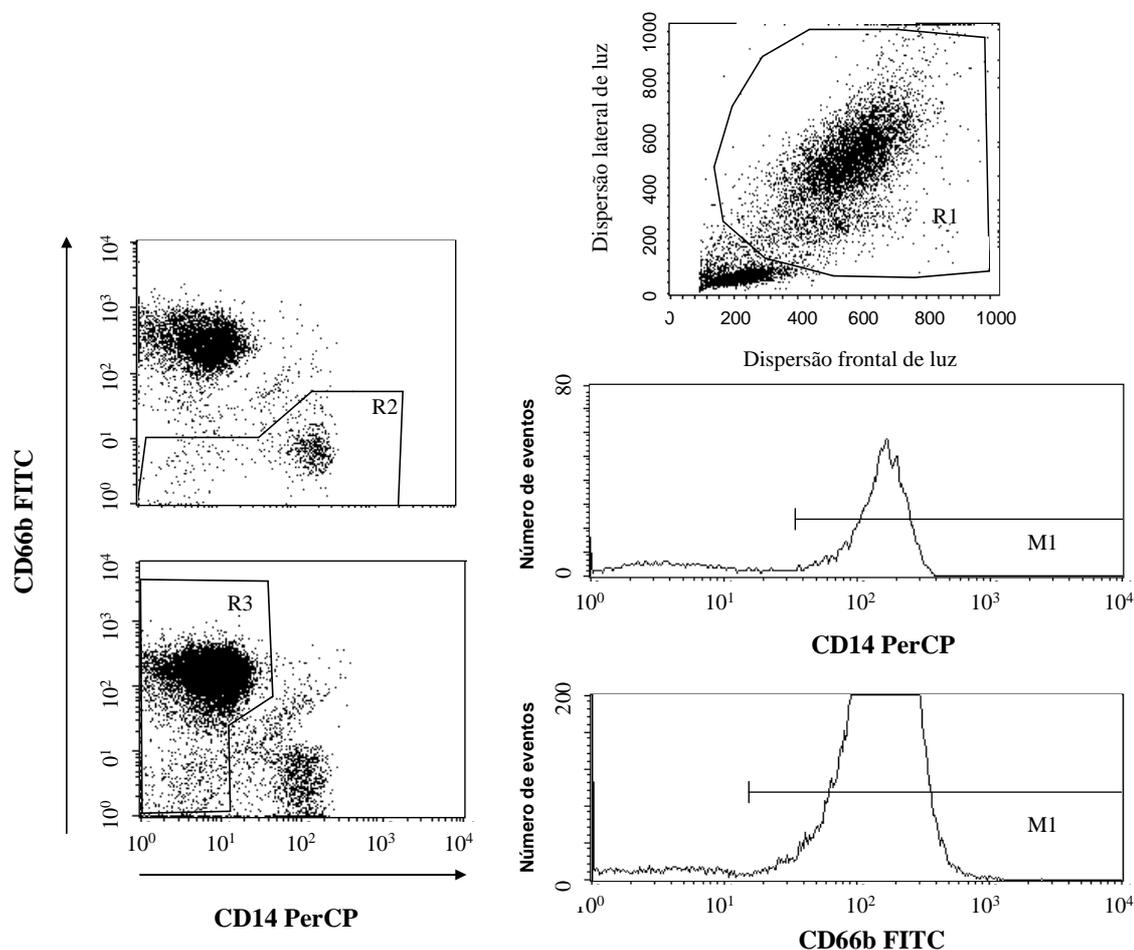
Como mostrado na figura 4.2A, durante a análise dos dados foi utilizado gráfico FSC versus SSC definindo-se uma região na morfologia de monócitos/neutrófilos (R1). Em outro gráfico mostrando expressão de CD66b (neutrófilos) versus expressão de CD14 (monócitos), desenharam-se as regiões R2 nas células CD14<sup>+</sup> e R3 nas células CD66b<sup>+</sup>. Combinando os eventos contidos nas janelas R1 e R2 foi possível identificar os monócitos de maior tamanho e excluir a contaminação de neutrófilos (figura 4.2B) e a combinação de R1 e R3 fornece a identificação dos neutrófilos. Para análise da expressão dos receptores TLR2, TLR4, CD11b, CD11c, CXCR2 e HLA-DR na superfície de neutrófilos e monócitos foram obtidas as médias geométricas da intensidade de fluorescência (MGIF) através de histogramas (figura 4.3).



**Figura 4.3:** Análise dos receptores CXCR2 e CD11b na superfície de neutrófilos. Ilustrando os histogramas dos diversos receptores, na população de neutrófilos, foi analisada a expressão de receptores CXCR2 (A) e CD11b (B) em diferentes condições de estímulo, de onde foram obtidas as MGIFs para cada condição.

Para análise da expressão de CD14 em monócitos e CD66b em neutrófilos utilizou-se estratégia similar, separando a região da morfologia de monócitos/neutrófilos (R1) e células CD66b negativas (R2) ou CD14 negativas (R3), como mostrado na figura 4.4. A combinação dos eventos contidos nas regiões R1 e R2 foi analisada em histograma para CD14 e R1 e R3 em

histograma para CD66b, sendo a MGIF deste receptor verificada dentro da marcação M1 (figura 4.4).

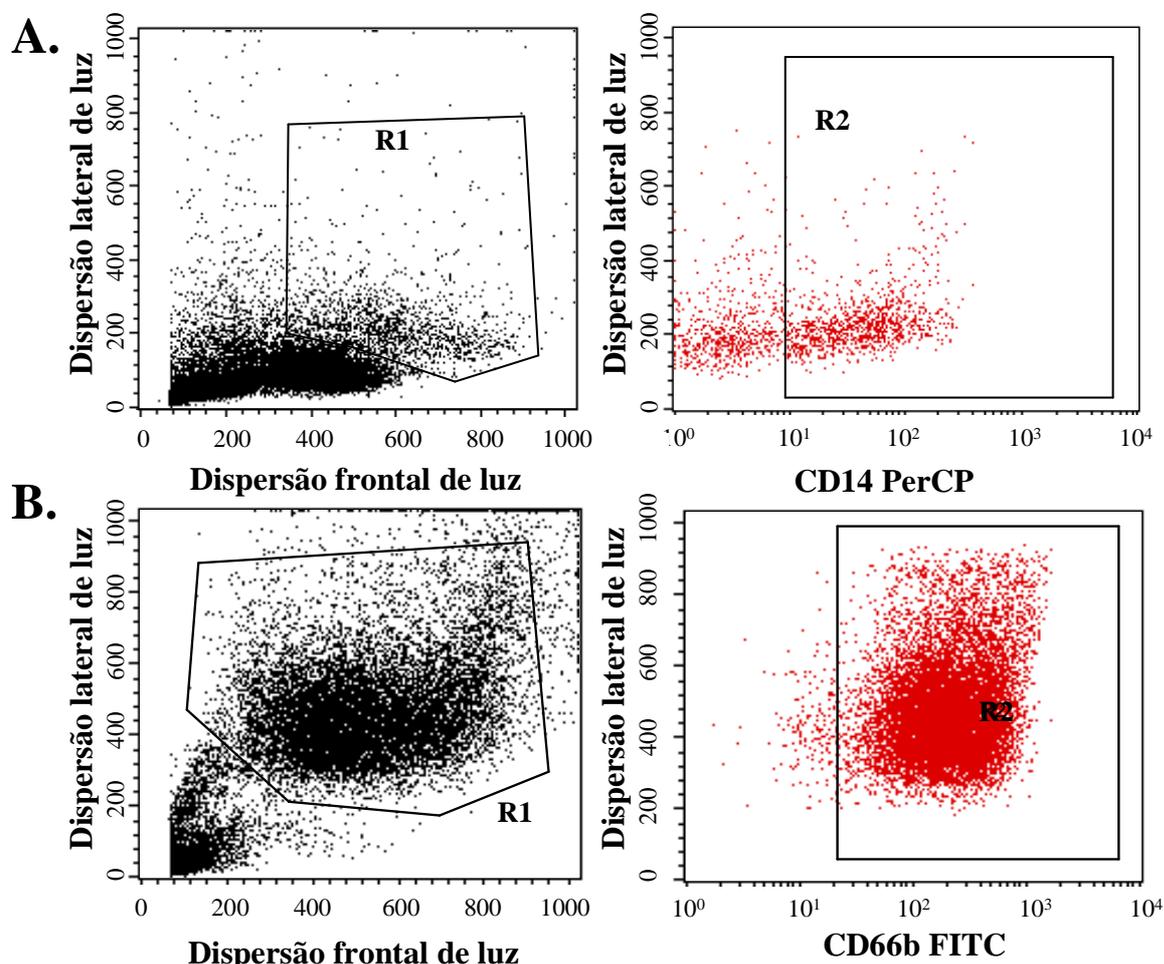


**Figura 4.4:** Estratégia de análise da intensidade de expressão do receptor CD14 em monócitos e CD66b em neutrófilos. A população de monócitos foi identificada combinando-se as regiões R1 e a negatividade para CD66b (R2) e a de neutrófilos combinando-se R1 e a negatividade para CD14 (R3). Os histogramas mostram a análise da expressão de CD14 na população de monócitos e de CD66b na população de neutrófilos, ambas dentro da marcação M1, que delimita as células positivas.

#### 4.1.5.2 Aquisição e análise de eventos em sistema de células separadas

Durante a aquisição dos dados, dois gráficos de pontos foram utilizados (figura 4.5). O primeiro, de FSC versus SSC, foi utilizado para determinar uma região R1 de morfologia da célula em estudo. Utilizando-se outro gráfico de SSC versus expressão do marcador (CD14 para monócitos e CD66b para neutrófilos), foi delimitada uma região R2 para eventos positivos. Através da combinação de R1 com R2, para os tubos de CMSP foram adquiridos 5000 eventos, os quais possuíam, portanto, morfologia de monócitos e positividade para CD14 (figura 4.5A). Para aquisição de PMN, foram adquiridos 50000 eventos da combinação de R1 com R2, os quais

possuíam morfologia de neutrófilos e positividade para CD66b (figura 4.5B). Todos os eventos foram salvos. Tanto a aquisição dos eventos quanto a análise dos resultados foram realizadas através do programa CellQuest.

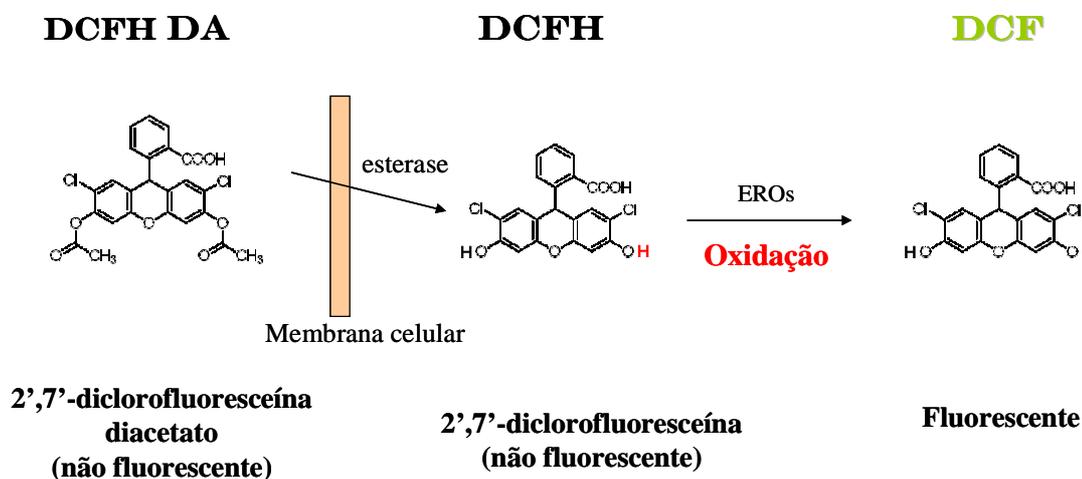


**Figura 4.5:** Estratégia de aquisição de monócitos (A) e neutrófilos (B) em células separadas. O gráfico da esquerda mostra FSC versus SSC. A região 1 (R1) separa a população característica de monócitos (A) ou neutrófilos (B). O gráfico da direita mostra a expressão de CD14 (A) ou CD66b (B) versus SSC. A região 2 (R2) separa os eventos CD14+ (A) ou CD66b+ (B). Durante a aquisição foram armazenados 5000 eventos combinando as regiões R1 e R2 para monócitos e 50000 eventos combinando as regiões R1 e R2 para neutrófilos.

Durante a análise dos dados, de forma semelhante à aquisição, foi utilizado gráfico de FSC versus SSC definindo-se uma região de morfologia de monócitos ou neutrófilos (R1), dependendo do tubo. Em outro gráfico mostrando expressão do marcador (CD66b ou CD14, quando o tubo era de CMSP ou PMN, respectivamente) versus SSC, desenhou-se a região R2 nas células de interesse. Combinando os eventos contidos nas janelas R1 e R2 foi possível identificar os monócitos ou neutrófilos, excluindo a contaminação de outras células ou restos celulares. Para análise da expressão dos receptores CD11b, CD14 e CD66b na superfície celular obtiveram-se as MGIFs através de histogramas.

## 4.2 Estimulação *in vitro* de sangue total para estudo da produção intracelular de espécies reativas de oxigênio

Para a mensuração do metabolismo oxidativo, foi avaliada a produção de EROs utilizando o fluorocromo 2',7'-diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA). O DCFH-DA tem a propriedade de penetrar rapidamente nas células por meio de difusão. Uma vez no espaço intracelular, é hidrolisado por esterases intracelulares transformando-se em 2',7'-diclorofluoresceína (DCFH), um composto não fluorescente e impermeável à membrana celular. Este, por sua vez, reage com as EROs, em particular com o peróxido de hidrogênio, sofrendo oxidação, resultando em compostos altamente fluorescentes, diclorofluoresceína (DCF), cuja luz é captada no canal FL-1 do citômetro de fluxo (figura 4.6).



**Figura 4.6:** Esquema representativo da reação do DCFH-DA.

Antes da realização dos ensaios abaixo descritos, foram realizados testes em sistema de sangue não diluído (Anexo 1) e padronização do método diluído (Anexo 2).

### 4.2.1 Coleta de sangue

Para cada indivíduo foram coletados 10 mL de sangue em tubo contendo heparina a vácuo.

### 4.2.2 Dose-resposta

Cem microlitros de sangue heparinizado foram distribuídos em tubos de polipropileno de 5 mL e posteriormente receberam um estímulo cada (rLPS ou sLPS nas doses de 0; 100; 250; 500 e 1000 ng/mL, ou *Staphilococcus aureus*  $2 \times 10^8$  células/mL). Foram acrescentados 200 uL de

DCFH-DA 0,3 mM por tubo e os volumes acertados com PBS para 1 mL. Os tubos então foram incubados em banho-maria a 37°C sob agitação por 30 min.

Dado o tempo de incubação, foram adicionados 2 mL de EDTA 3 mM. Os tubos foram centrifugados a 250 x g por 5 min a 4°C e os sobrenadantes desprezados. As hemácias foram lisadas com adição de 2 mL de NaCl 0,2% por 20 s, seguido de adição de 2 mL de NaCl 1,6% por 20 s. Após centrifugação, os sobrenadantes foram descartados e adicionaram-se 2 mL de tampão de lavagem A. Os tubos foram centrifugados e os sobrenadantes descartados. Os botões celulares foram incubados com 6 uL de CD14 PerCP e deixados por 15 min no escuro. Posteriormente, foram acrescentados aos tubos 2 mL de tampão de lavagem, sendo novamente centrifugados. Após descarte dos sobrenadantes, as amostras foram suspensas em 0,25 mL de EDTA 3 mM por tubo e estas foram mantidas em gelo até a leitura em citômetro de fluxo, como descrito no item 4.2.4.

### 4.2.3 Cinética

Cem microlitros de sangue heparinizado foram distribuídos em tubos de polipropileno de 5 mL e posteriormente receberam um estímulo cada (meio, rLPS 500 ng/mL, sLPS 500 ng/mL ou *S. aureus*  $2 \times 10^8$  células/mL). Foram acrescentados 200 uL de DCFH-DA 0,3 mM por tubo e os volumes acertados com PBS para 1 mL. Os tubos então foram incubados em banho-maria a 37°C sob agitação por 5, 15, 30, 60, 180 e 360 min. O restante do protocolo foi o mesmo utilizado no item de dose-resposta descrito acima (item 4.2.2).

### 4.2.4 Citometria de fluxo

Foi utilizado um citômetro BD FACSCalibur de quatro cores como já descrito no item 4.1.5.

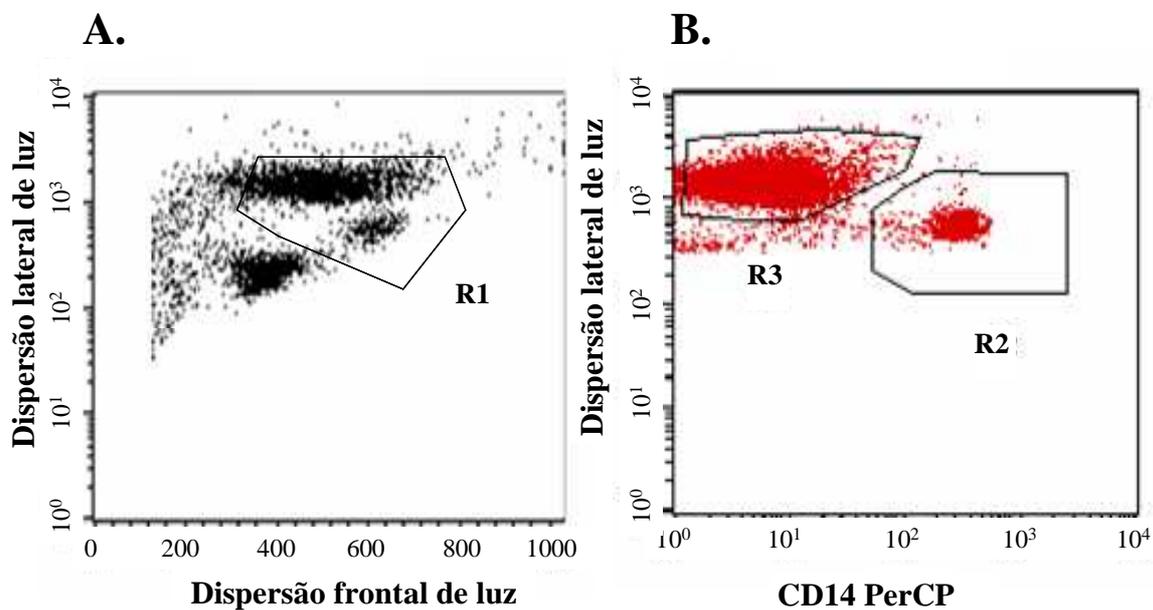
#### 4.2.4.1 Aquisição

A estratégia de aquisição foi a mesma do item 4.1.5.1, excetuando-se que o parâmetro de dispersão lateral de luz estava em escala logarítmica.

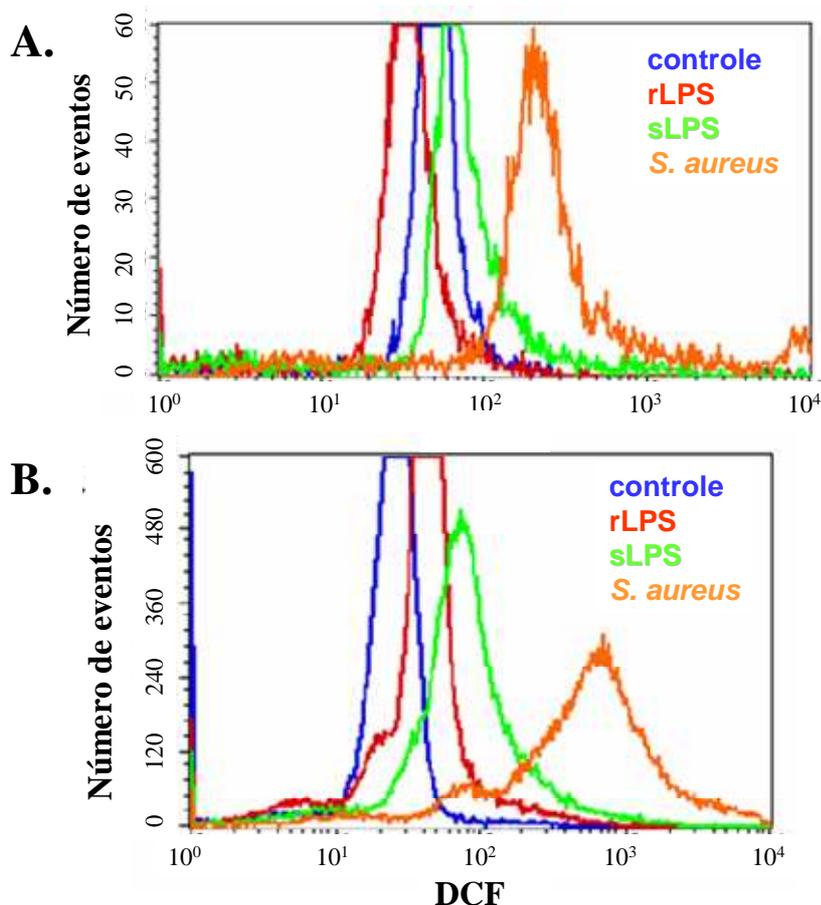
#### 4.2.4.2 Análise

Para a análise, utilizamos o gráfico de FSC versus SSC para identificação das populações leucocitárias, estabelecendo-se assim a região R1 de neutrófilos e monócitos. Em outro gráfico, foram criadas as regiões R2 e R3, baseadas na positividade e negatividade para CD14, respectivamente (figura 4.7). Os eventos contidos nas duas combinações, isto é, R1xR2

(monócitos) e R1xR3 (neutrófilos) foram analisados em gráficos do tipo histograma, sendo a intensidade de expressão relacionada à detecção de DCF, ou seja, à produção de EROs que foi expressa em MGIF em FL-1 (figura 4.8).



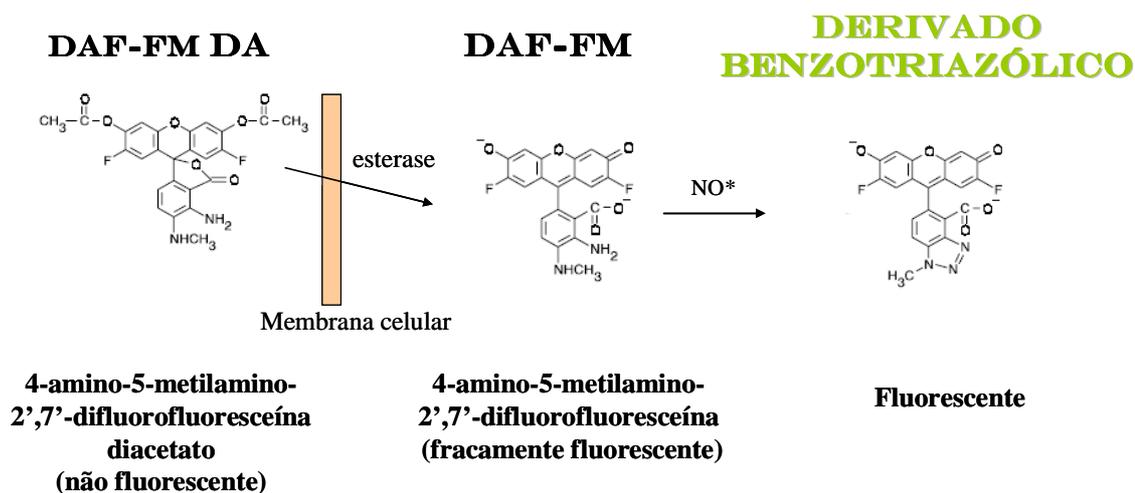
**Figura 4.7:** Estratégia de análise da produção de EROs em sangue total. O gráfico A mostra FSC versus SSC. A região 1 (R1) separa as populações de monócitos e neutrófilos. O gráfico B mostra expressão de CD14 e SSC. A combinação R1xR3 corresponde aos neutrófilos, enquanto a combinação R1xR2 evidencia os monócitos.



**Figura 4.8:** Histogramas de DCF de monócitos (A) e de neutrófilos (B), mostrando a análise da intensidade de fluorescência de DCF nestas células em diferentes condições de estímulo.

#### 4.3 Estimulação *in vitro* de sangue total para estudo da produção de óxido nítrico

Para mensuração da produção de NO foi utilizado 4-amino-5-metilamino- 2',7'-difluorofluoresceína diacetato (DAF-FM DA). Este composto atravessa passivamente as membranas celulares. Uma vez no interior das células, ele é deacetilado pelas esterases intracelulares, que o transformam em DAF-FM. Na presença de NO, a fluorescência do DAF-FM aumenta cerca de 160 vezes, quando é formado o derivado benzotiazólico<sup>(75)</sup>, cuja luz é detectada no canal FL-1 de citômetro de fluxo.



**Figura 4.9:** Reação esquemática para detecção de óxido nítrico por DAF-FM diacetato.

Antes da realização dos ensaios descritos abaixo, utilizamos um protocolo da literatura como base<sup>(76)</sup> e a técnica foi padronizada (Anexo 3).

#### 4.3.1 Coleta de sangue

Foram coletados 10 mL de sangue em tubo contendo heparina sódica a vácuo de cada indivíduo sadio.

#### 4.3.2 Dose-resposta

Oitenta microlitros de sangue heparinizado foram distribuídos em tubos de poliestireno de 5 mL e posteriormente receberam um estímulo cada (meio, rLPS ou sLPS nas concentrações de 1; 10; 100 ou 1000 ng/mL, ou PMA 1,35 µg/mL). Foram acrescentados 24 µL de DAF-FM DA 0,05 mM por tubo e os volumes acertados com PBS para 120 µL. Os tubos então foram incubados em banho-maria a 37°C sob agitação por 30 min. Dado o tempo de incubação, foram adicionados 2 mL de PBS. Os tubos foram centrifugados a 250 x g por 5 min a 4°C e os sobrenadantes desprezados. As hemácias foram lisadas com adição de 2 mL de NaCl 0,2% por 20 segundos, seguido de adição de 2 mL de NaCl 1,6% por 20 s. Após centrifugação, os sobrenadantes foram descartados e adicionaram-se 2 mL de PBS. Os tubos foram centrifugados e os sobrenadantes descartados. Os botões celulares foram incubados com 5 µL de CD14 PE e 5µL de CD15 APC e deixados por 15 min no escuro. Posteriormente, foram acrescentados aos tubos 2 mL de PBS, sendo novamente centrifugados. Após descarte dos sobrenadantes, as amostras foram suspensas em 0,25 mL de PBS por tubo e estas foram mantidos em geladeira até a leitura em citômetro de fluxo, como descrito no item 4.3.4.

### 4.3.3 Cinética

Oitenta microlitros de sangue heparinizado foram distribuídos em tubos de poliestireno de 5 mL e posteriormente receberam um estímulo cada (meio, rLPS ou sLPS nas doses de 100 ng/mL, ou PMA 1,35 ug/mL). Foram acrescentados 24 uL de DAF-FM DA 0,05 mM por tubo e os volumes acertados com PBS para 120 uL. Os tubos então foram incubados em banho-maria a 37°C sob agitação por 15, 30, 60 ou 120 min. O restante do protocolo foi realizado de maneira idêntica a do item 4.3.2.

### 4.3.4 Citometria de fluxo

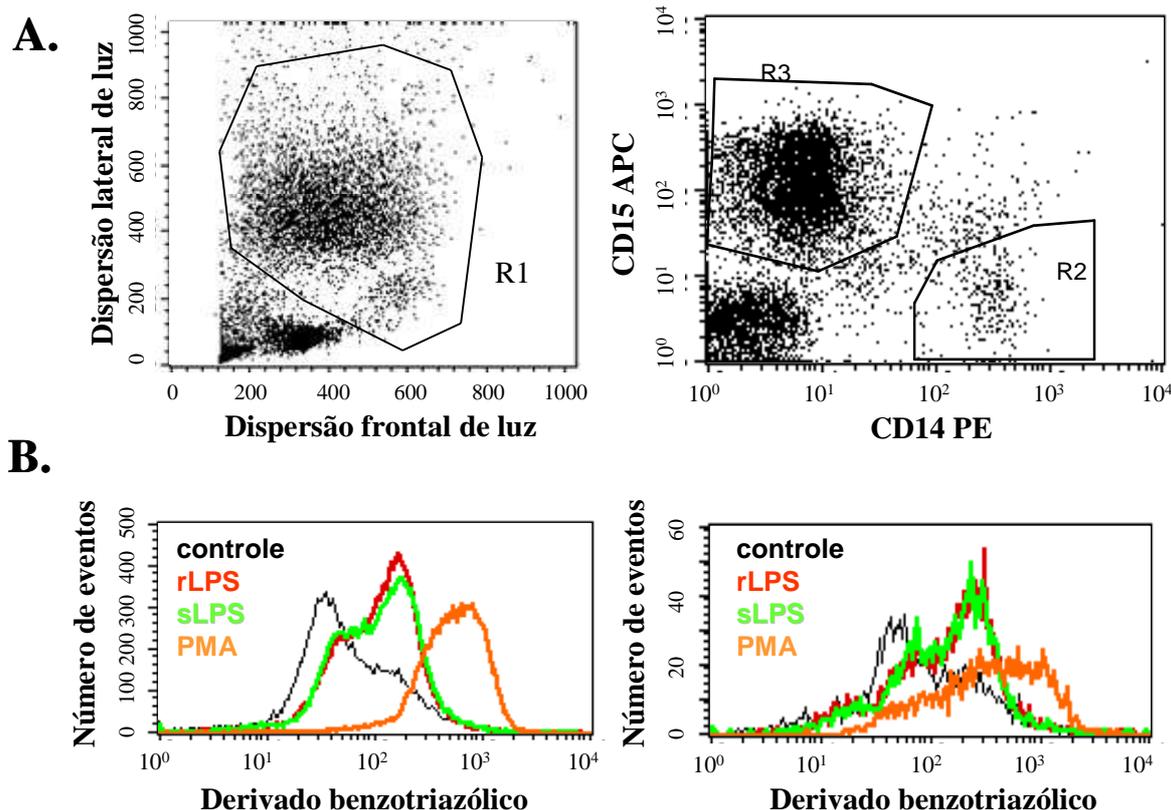
Foi utilizado um citômetro BD FACSCalibur de quatro cores como já descrito no item 4.1.5.

#### 4.3.4.1 Aquisição

A estratégia de aquisição foi a mesma do item 4.1.5.1.

#### 4.3.4.2 Análise

Para a análise, utilizamos o gráfico de FSC versus SSC para identificação das populações leucocitárias, estabelecendo-se assim a região R1 de neutrófilos e monócitos. Em outro gráfico, foram criadas as regiões R2 e R3, baseadas na positividade para CD14 (monócitos) e para CD15 (neutrófilos) (figura 4.10A). Os eventos contidos nas duas combinações, isto é, R1xR2 (monócitos) e R1xR3 (neutrófilos) foram analisados em gráficos do tipo histograma, sendo a intensidade de fluorescência relacionada à detecção de DAF-FM, ou seja, à produção de NO, que foi expressa em MGIF com FL-1 (figura 4.10B).



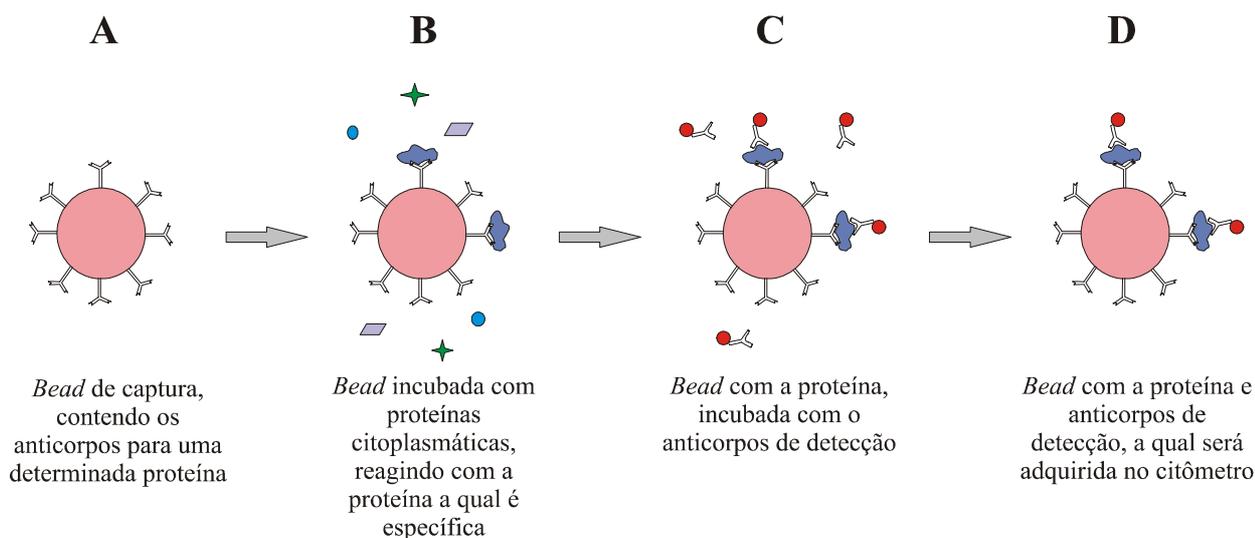
**Figura 4.10:** Análise da produção de NO por neutrófilos e monócitos. (A) O gráfico a esquerda mostra FSC versus SSC, para seleção da área correspondente a monócitos e neutrófilos (R1), e o da direita amostra a expressão de CD14 e CD15, sendo a região 3 (R3) correspondente aos neutrófilos, enquanto a região 2 (R2) evidencia os monócitos. (B) Histogramas de neutrófilos (esquerda) e de monócitos (direita), mostrando a análise da intensidade de fluorescência do derivado benzotriazólico nestas células em diferentes condições de estímulo.

#### 4.4 Detecção da ativação de ERK1/2, p38 e JNK por *Citometric Bead Array Flex Set* após estimulação de leucócitos com r e sLPS

O sistema *Citometric Bead Array* (CBA) usa a amplificação da detecção de fluorescência por citometria de fluxo para mensurar proteínas solúveis. Cada partícula no CBA proporciona uma superfície de captura para uma proteína específica, semelhante à placa de *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay* (ELISA), permitindo analisar um pequeno volume de amostra.

O sistema usa uma única população de partículas, de mesmo tamanho e complexidade, mas com intensidade de fluorescência distinta e revestidas com anticorpos de captura específicos para proteínas solúveis (Figura 4.11). A cada população de partícula é dada uma designada posição alfa-numérica, de acordo com a intensidade de fluorescência para os canais APC e APC-Cy7 no citômetro BD FACSCanto. Partículas com diferentes posições podem ser combinadas em ensaios para criar um ensaio *multiplex*. Para cada experimento foram utilizados três *Flex Sets*, ou

seja, partículas revestidas de anticorpos anti-fosfo-ERK, anti-fosfo-p38 e anti-fosfo-JNK, nas posições C4, B6 e B5, respectivamente (figura 4.12B).



**Figura 4.11:** Esquema representativo da reação existente no CBA. (A) Partículas (*beads*) de captura possuem anticorpos específicos para uma dada proteína solúvel, e possuem fluorescência para APC e APC-Cy7, podendo ser posicionadas diferentemente. (B) Partículas para diferentes proteínas podem ser incubadas juntas na presença do citoplasma das células em estudo. (C) Os anticorpos de detecção, que também são específicos para as proteínas capturadas pelas partículas do ensaio, são conjugados com o fluorocromo PE. (D) Após lavagem, o que é lido no citômetro de fluxo é o sanduíche formado pelo anticorpo acoplado na partícula, a proteína e o anticorpo de detecção e as partículas que não reagiram.

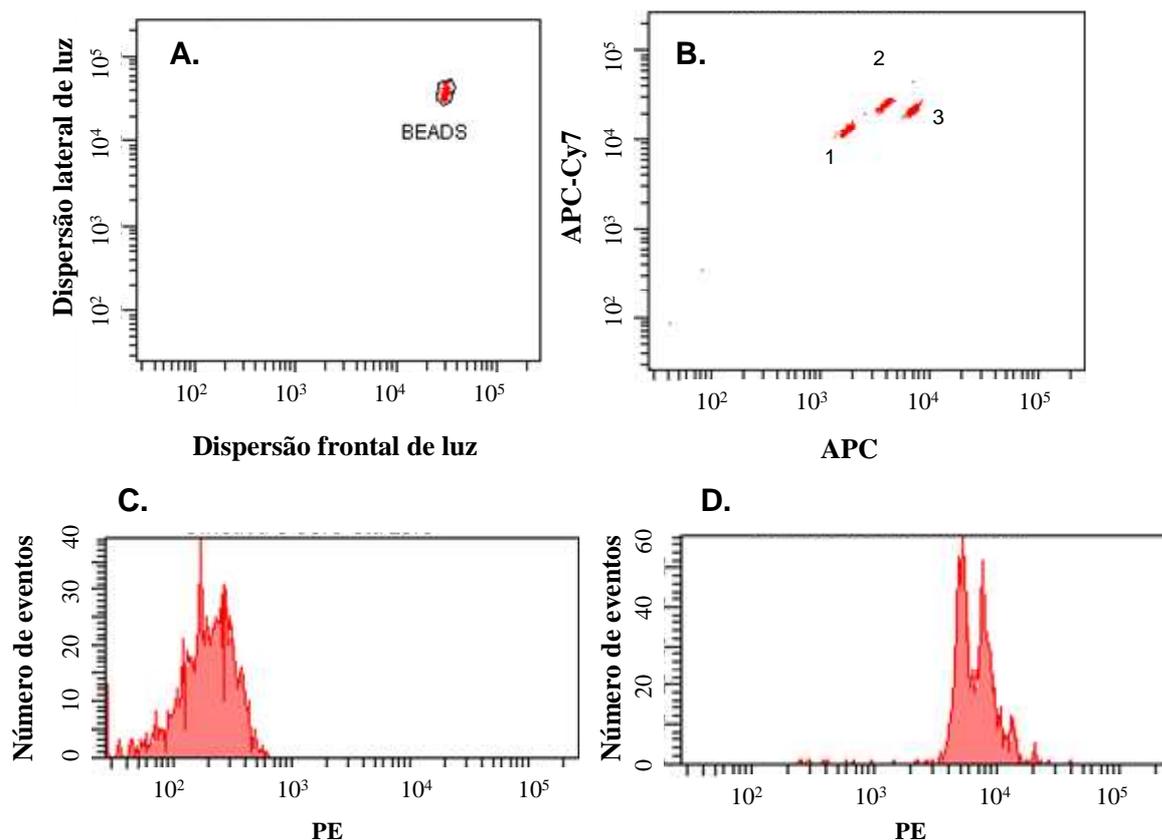
A detecção é feita com anticorpos também específicos conjugados com PE (Figura 4.12C e D, sendo C contendo amostra menos positiva e D amostra mais positiva), possibilitando a identificação de complexos sanduíches (figura 4.11D). Depois da aquisição das amostras, os resultados foram analisados em formato gráfico e tabular utilizando-se o programa FCAP Array.

#### 4.4.1 Coleta de sangue

Para cada indivíduo sadio foram coletados 70 mL de sangue para separação de células e estimulação dos leucócitos.

#### 4.4.2 Separação de CMSP e PMN

A separação foi feita como no item 4.1.4.1. Tanto CMSP quanto PMN foram ajustados para a concentração de  $5 \times 10^6$  células/mL, sendo distribuídos 1 mL para cada tubo de polipropileno de 5 mL.



**Figura 4.12:** Gráficos observados durante a aquisição das amostras do CBA. **(A)** Gráfico de pontos da FSC versus SSC, mostrando a população de partículas com um tamanho único (região denominada de BEADS). **(B)** Gráfico de pontos de APC versus APC-Cy7, mostrando as posições alfa-numéricas das partículas usadas no estudo (1-C4, 2-B5 e 3-B6 correspondem a fosfo-ERK, fosfo-JNK e fosfo-p38, respectivamente). **(C e D)** Histogramas de PE, mostrando a intensidade de fluorescência dos eventos contidos na região BEADS na amostra 0 unidades/mL **(C)** e amostra 1000 unidades/mL **(D)**.

#### 4.4.3 Estimulação das CMSP e PMN

Resultados de ensaios anteriores com *Western Blot* mostraram que o melhor modelo para ativação de MAPKs após estimulação de CMSP e PMN com r e sLPS seria com 30 min de incubação na ausência de soro bovino fetal (dados não mostrados).

Os PMNs e CMSP isolados foram estimulados com r e sLPS nas concentrações de 0; 25; 250 ou 2500 ng/mL por 30 min. Na tentativa de observar melhor ativação de JNK e ERK, tais células também foram estimuladas com r e sLPS nas concentrações de 0; 25 e 250 ng/mL por 60 min. As amostras foram processadas como nos itens de 4.4.4 a 4.4.6 para teste utilizando CBA.

#### 4.4.4 Lavagem e lise das CMSP e PMN

Dados os tempos de incubação, foram adicionados 2 mL de soro fisiológico gelado por tubo. Os tubos foram centrifugados a 1200 x g por 5 min a 4°C. Após desprezar os sobrenadantes, os botões celulares foram transferidos para microtubos, os quais foram centrifugados a 2300 x g por 5 min a 4°C.

A lise dos leucócitos foi feita adicionando-se 200 uL de tampão de lise A gelado, sendo os microtubos deixados durante toda a noite a -80°C. No dia seguinte, as amostras de CMSP permaneceram no gelo por 20 min e foram sonicadas por 10 s com 15% de potência; e as amostras de PMN sofreram três ciclos de 10 s de sonicação com intervalos de 30 s de repouso no gelo entre um ciclo e outro. As amostras foram centrifugadas a 2300 x g por 15 min a 4°C e os sobrenadantes (citoplasmas) foram transferidos para outros microtubos (separando uma alíquota para a dosagem protéica). Foi adicionada uma quantidade apropriada de tampão de denaturação 5 x (previamente aquecido a 37°C e agitado em vórtex) para que sua concentração ficasse 1 x, ou seja, uma parte de tampão para 4 partes de amostra. Após denaturação das amostras (colocando-as em água fervente por 5 min), foram feitas alíquotas que foram armazenadas a -80°C e utilizadas antes de 2 meses de estocagem.

#### 4.4.5 Determinação da concentração protéica

Para a realização do ensaio de CBA *Flex Set*, o fabricante indica que as amostras devem ter mais de 1 ug/mL de proteína. Assim, foi feita a dosagem protéica utilizando-se o Método de Bradford, a seguir brevemente descrito.

As alíquotas para dosagem protéica foram descongeladas e as amostras diluídas 1:50 em água destilada. Foi utilizada curva padrão de albumina bovina sérica, com as concentrações de 1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,2; 15,6; 7,8; 3,9 e 0 ug/mL. Após diluição do reagente de Bradford 1:5 em água, foram adicionados 200 uL do reagente por 40 uL de padrão ou amostra distribuídos em placa de 96 poços. A leitura foi feita em filtro de 595 nm. Foi utilizado o programa Excel para calcular a concentração protéica das amostras, através da equação da reta obtida no gráfico onde y=valores de densidade óptica e x=concentrações da curva padrão. O resultado foi dado em ug/mL.

#### **4.4.6 Realização do ensaio de CBA *Flex Set* para detecção de fosfo-ERK, fosfo-p38 e fosfo-JNK**

##### **4.4.6.1 Preparação das amostras**

As amostras de citoplasma foram descongeladas e diluídas v:v em diluente de ensaio. Antes de transferi-las para os tubos contendo os reagentes de captura e detecção, elas foram agitadas.

##### **4.4.6.2 Preparação dos padrões do ensaio**

Para cada ensaio realizado foi feita uma diluição de curva padrão. Após aquecimento a 37°C dos padrões de fosfo-ERK, fosfo-p38 e fosfo-JNK providos pelo kit, foram diluídos em diluente de ensaio para a obtenção da seguinte curva padrão: 1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,6; 7,8 e 3,9 unidades/mL. Um tubo contendo apenas o diluente foi mantido para obtenção do 0 unidades/mL.

##### **4.4.6.3 Preparação das partículas de captura**

Para cada ensaio foi determinado o número de testes a serem utilizados (amostras e padrões). Após agitar todas as partículas de captura, o volume necessário de cada uma delas (1 uL por teste) foi pipetado em um tubo de poliestireno de 15 mL contendo o volume adequado de diluente de partículas de captura para volume final de 50 uL por teste.

##### **4.4.6.4 Preparação dos reagentes de detecção**

Para cada ensaio foi determinado o número de testes a serem utilizados (amostras e padrões). O volume necessário de cada reagente de detecção (1 uL por teste) foi pipetado em um tubo de poliestireno de 15 mL contendo o volume adequado de diluente de reagente de detecção para volume final de 50 uL por teste.

##### **4.4.6.5 Procedimento para ensaio**

Foram adicionados 50 uL das partículas de captura diluídas (após agitação por pelo menos 5 s) e 50 uL dos reagentes de detecção diluídos por cada tubo do teste. Também foram acrescentados 50 uL do padrão ou amostra em seu respectivo tubo. Após agitar gentilmente os tubos, os mesmos foram deixados por 4 h em temperatura ambiente protegidos da luz. Dado o tempo, foi adicionado 1 mL de tampão de lavagem C a cada tubo, seguido de centrifugação a 200

x g por 5 min. Após descarte cuidadoso dos sobrenadantes, foram adicionados 300 uL de tampão de lavagem C a cada tubo, que foram então mantidos em geladeira até aquisição no citômetro.

#### 4.4.6.6 Aquisição das amostras

A leitura das amostras foi realizada em citômetro de fluxo FACSCanto equipado com dois lasers, com emissão de comprimentos de onda de 488nm e 633nm. O primeiro laser possibilita a excitação de quatro fluorocromos, FITC, PE, PerCP ou PerCP-Cy5.5 e PE-Cy7, e o segundo excita dois fluorocromos, APC e APC-Cy7. A detecção das fluorescências foi feita em escala logarítmica, assim como FSC e SSC. A detecção de cada parâmetro e compensação entre os canais de fluorescências foram acertados de acordo com o manual do kit para aperfeiçoar a aquisição de eventos. O citômetro é acoplado a unidade constituída por um microcomputador HP Workstation XW4200, que permite controle sobre o citômetro e armazenamento dos dados em arquivo. A aquisição foi feita utilizando-se o programa BD FACSDiva™.

Foram adquiridos 900 eventos na região criada para delimitar as partículas por tamanho e complexidade (BEADS da figura 4.12A), sendo somente os mesmos salvos.

#### 4.4.6.7 Análise de dados utilizando FCAP Array

A análise e obtenção dos valores de unidades/mL das proteínas fosforiladas por amostra foram feitas utilizando-se o programa FCAP Array (versão 1.0.1) seguindo as instruções do fabricante. Brevemente, o programa usa as médias geométricas de fluorescência obtidas na curva padrão e as concentrações conhecidas das proteínas da mesma curva, e com o auxílio de uma fórmula logística de quatro parâmetros (abaixo) calcula os valores das amostras em unidades/mL. Foi feita então uma razão entre os valores obtidos (em unidades/mL) e a concentração protéica (em ug/mL), sendo expressa em unidades/ug de proteína.

$$y = D + \frac{A - D}{1 + (X/C)^B}$$

Os resultados obtidos para fosfo-ERK e fosfo-JNK foram considerados inconsistentes (não reprodutíveis), assim não serão mostrados.

## **4.5 Detecção da translocação das subunidades de NFkB p65 e p50 para o núcleo de PMN após estimulação com r e sLPS**

### **4.5.1 Coleta de sangue**

Para cada indivíduo sadio foram coletados 40mL de sangue para separação de células e estimulação dos neutrófilos.

### **4.5.2 Separação de PMN**

A separação foi feita como no item 4.1.4.1. As PMN foram ajustadas para a concentração de  $1 \times 10^6$  células/mL, sendo distribuídos 1mL para cada tubo de polipropileno de 5 mL.

### **4.5.3 Estimulação das PMN**

O protocolo usado para fixação das células e isolamento dos núcleos foi uma adaptação do protocolo de Nakamori *et al.*<sup>(77)</sup> e de Garcia-Garcia & Rosales<sup>(78)</sup>.

- Cinética

Foi feita uma curva de cinética de resposta de PMN a r e sLPS nas concentrações de 100ng/2x10<sup>6</sup> células por 30, 60 e 120 min. As amostras foram então processadas como nos itens que se seguem.

### **4.5.4 Fixação das amostras**

Dado o tempo de incubação, foram adicionados 2 mL de PBS e as amostras foram centrifugadas a 600 x g por 5 min a 4 °C. Após descarte do sobrenadante, foram adicionados 2 mL de paraformaldeído 1%, e após 2 min acrescentados 2 mL de PBS. Após centrifugação, os sobrenadantes foram descartados. Foi realizada lavagem com 2 mL de PBS. Após descarte dos sobrenadantes, foram adicionados 3 mL de tampão citrato. Em seguida as amostras foram centrifugadas e os sobrenadantes descartados.

### **4.5.5 Lise das células**

Os botões celulares foram tratados com 100 uL de tampão de lise B por 10 min a 32°C. Foram então adicionados 80 uL de inibidor de tripsina 1X para parar a proteólise e 2 mL de

paraformaldeído 4%, e os tubos foram deixados na geladeira por 20 min para fixar o núcleo. As amostras foram centrifugadas a 800 x g por 10 min a 4°C e os sobrenadantes descartados. Para confirmação da obtenção dos núcleos foram feitas microscopia de fluorescência e coloração com hematoxilina/eosina (descrição no Anexo 5).

#### **4.5.6 Marcação de p65 e p50 nos núcleos isolados**

Depois de fixados, foram adicionados 100 uL de triton X-100 0,1% em paraformaldeído 4% e deixados por 10 min em geladeira, para permeabilizar os núcleos. Dado o tempo, foi adicionado 1 mL de PBS e as amostras foram centrifugadas. Foram adicionados 2 mL de tampão de lavagem aos botões. Estes foram distribuídos em tubos de citometria (1 mL em cada antes de centrifugar). As amostras foram centrifugadas a 800 x g por 10 min a 4°C e os sobrenadantes descartados. Foram adicionados 5 uL de 7-AAD (corante de DNA que é fluorescente no FL-3 do citômetro de fluxo) e 10 uL de anticorpo anti-p65 PE ou anti-p50 PE/1x10<sup>6</sup> células, e os tubos incubados por 30 min a temperatura ambiente. Dado o tempo, foram acrescentados 2 mL de tampão de lavagem. Após centrifugação, os sobrenadantes foram descartados e os botões suspensos em 0,3 mL de PBS 1% paraformaldeído.

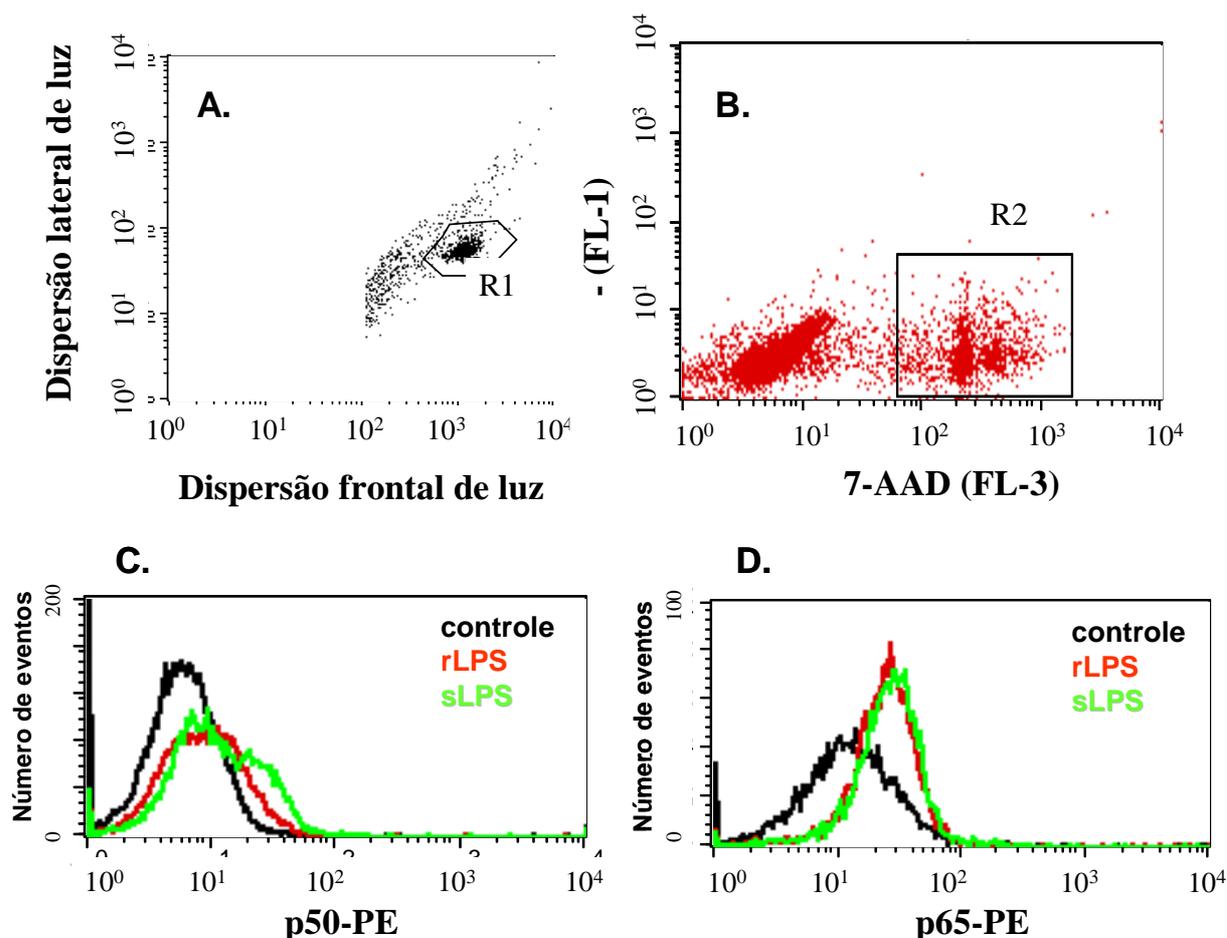
#### **4.5.7 Aquisição das amostras**

##### **4.5.7.1 Aquisição**

A aquisição foi feita em citômetro FACSCalibur. A estratégia de aquisição foi similar à do item 4.1.5.1, excetuando-se que os parâmetros SSC e FSC estavam em escala logarítmica, e a contagem dos eventos foi 10000 na combinação R1 e R2, sendo R1 a região que delimita a população de núcleos e R2 a população positiva para 7-AAD (figura 4.13).

##### **4.5.7.2 Análise**

Para a análise, utilizamos o gráfico de FSC versus SSC para identificação da população de núcleos, estabelecendo-se assim a região R1. Em outro gráfico, foi criada a região R2, baseadas na positividade para 7-AAD (figura 4.13). Os eventos contidos nas duas combinações, isto é, em R1 e R2, foram analisados em gráficos do tipo histograma, sendo a intensidade de expressão relacionada à detecção da translocação de p50 e p65 para o núcleo. Esta translocação foi expressa em razão em relação ao controle.



**Figura 4.13:** Aquisição e análise da translocação de p65 e p50 para o núcleo. (A) O gráfico mostra FSC versus SSC, onde R1 correspondente a área dos núcleos isolados de PMN, e (B) mostra a expressão de 7-AAD obtida da população R1. Histogramas das detecções de p50 (C) e p65 (D), mostram a análise da intensidade de fluorescência de p50 e p65 nos núcleos de neutrófilos em diferentes condições de estímulo.

#### 4.6 Análise Estatística

##### - Análise Descritiva

As variáveis do presente trabalho se encontram identificadas e descritas na tabela 4.6.

Para a idade dos indivíduos foram feitas média e desvio padrão, para descrição da população em estudo, não sendo aplicado nenhum teste estatístico.

Os dados de expressão dos receptores, de produção de EROs e de NO, de fosforilação protéica e de translocação de p50 e p65, obtidos para cada indivíduo em cada condição de estímulo e tempo, foram empregados para o cálculo de médias respectivas a cada condição experimental. Os valores utilizados nos gráficos foram as médias e a medida de dispersão utilizada foi o erro padrão. Portanto, os valores contidos nos gráficos que seguem correspondem à média e ao erro padrão.

**Tabela 4.6:** Identificação e classificação das variáveis.

Nome da variável	Descrição	Tipo de medida
IDADE	Idade do voluntário	Quantitativa contínua (em anos)
TEMPO	Tempo de estímulo	Categórica ordinal (em min)*
ESTÍMULO	Os estímulos utilizados foram meio, rLPS e sLPS	Categórica nominal
CD14	Expressão de CD14 na superfície de monócitos	Quantitativa contínua (em razão em relação ao controle ou MGIF)
CD11b	Expressão de CD11b na superfície de monócitos e neutrófilos	Quantitativa contínua (em MGIF)
TLR4	Expressão de TLR4 na superfície de monócitos e neutrófilos	Quantitativa contínua (em MGIF)
CD66b	Expressão de CD66b na superfície de neutrófilos	Quantitativa contínua (em MGIF)
CD11c	Expressão de CD11c na superfície de monócitos e neutrófilos	Quantitativa contínua (em MGIF)
TLR2	Expressão de TLR2 na superfície de monócitos e neutrófilos	Quantitativa contínua (em MGIF)
CXCR2	Expressão de CXCR2 na superfície de neutrófilos	Quantitativa contínua (em MGIF)
HLA-DR	Expressão de HLADR na superfície de monócitos	Quantitativa contínua (em MGIF)
EROs	Produção de EROs por monócitos e neutrófilos	Quantitativa contínua (em MGIF)
NO	Produção de NO por monócitos e neutrófilos	Quantitativa contínua (em MGIF)
Fosfo-ERK1/2	ERK1/2 fosforiladas em citoplasma de monócitos e neutrófilos	Quantitativa contínua (em unidades/ug de proteína)
Fosfo-p38	p38 fosforilada em citoplasma de monócitos e neutrófilos	Quantitativa contínua (em unidades/ug de proteína)
Fosfo-JNK	JNK fosforilada em citoplasma de monócitos e neutrófilos	Quantitativa contínua (em unidades/ug de proteína)
p50	p50 presente no núcleo de neutrófilos	Quantitativa contínua (em razão em relação ao controle)
p65	p65 presente no núcleo de neutrófilos	Quantitativa contínua (em razão em relação ao controle)

\* foi considerada categórica ordinal porque os tempos foram reunidos em faixas.

#### - Testes estatísticos

Para os estudos de cinética, fixando o tempo, foi realizada a comparação entre as médias dos diferentes grupos (controle, rLPS e sLPS) em relação à expressão das diferentes variáveis analisadas naquele dado tempo, através de análise de variância (ANOVA). As comparações com valor de p menor ou igual a 0,05 foram consideradas significantes, e com p menor ou igual a 0,1 foram submetidas ao pós-teste de Tukey (*Tukey honestly significant difference (HSD) test*)<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> O software utilizado para fazer as análises estatísticas foi o *SPSS 13.0 for Windows*.

## *5. Resultados*

---

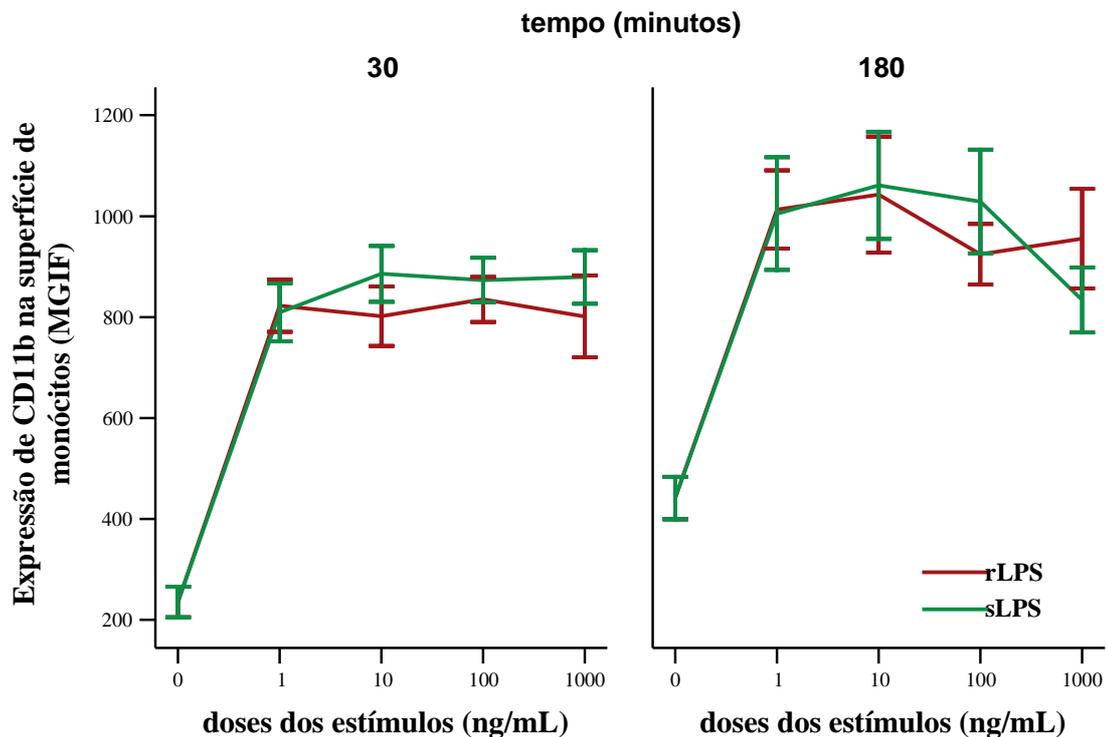
## 5.1. Análise da expressão de receptores na superfície de leucócitos com r e sLPS

### 5.1.1. Estimulação *in vitro* de sangue total para estudo da dinâmica de receptores na superfície de monócitos e neutrófilos

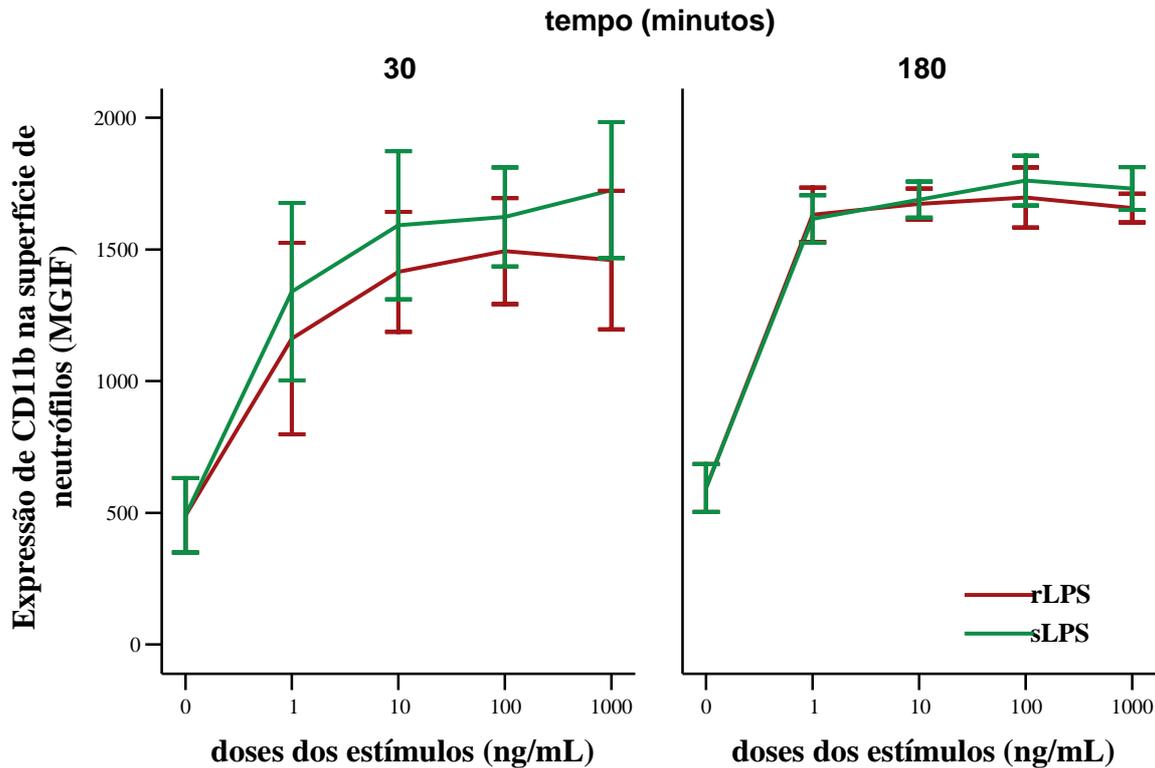
O estudo foi feito com 13 indivíduos saudáveis, com média de idade de 29,5 ( $\pm 8,3$ ) anos.

#### 5.1.1.1 Dose-Resposta:

A curva de dose-resposta de LPS para modulação da expressão de receptores na superfície de monócitos e neutrófilos foi realizada com concentrações crescentes de LPS em sangue total nos tempos de 30 min e 180 min. A expressão de CD11b na superfície de monócitos e de neutrófilos de quatro indivíduos saudáveis, representada como MGIF, é apresentada nas figuras 5.1 e 5.2. Analisando os resultados obtidos para os dois tempos de incubação utilizados, foi determinado que a dose de 100 ng/mL seria adequada para ser utilizada no ensaio de cinética, para ambas as formas de LPS.



**Figura 5.1:** Curva dose-resposta da expressão de CD11b na superfície de monócitos induzida por r e sLPS. O sangue periférico foi incubado com diferentes concentrações de r e sLPS (0; 1; 10; 100 e 1000 ng/mL) por 30 ou 180 min. Nos gráficos os valores são mostrados em MGIF. Estão representadas as médias e erros padrão de cada dose de estímulo obtidas de 4 voluntários saudáveis.



**Figura 5.2:** Curva dose-resposta da expressão de CD11b na superfície de neutrófilos induzida por r e sLPS. O sangue periférico foi incubado com diferentes concentrações de r e sLPS (0; 1; 10; 100 e 1000 ng/mL) por 30 ou por 180 min. Nos gráficos os valores são mostrados em MGIF. Estão representadas as médias e erros padrão de cada dose de estímulo obtidas de 4 voluntários saudáveis.

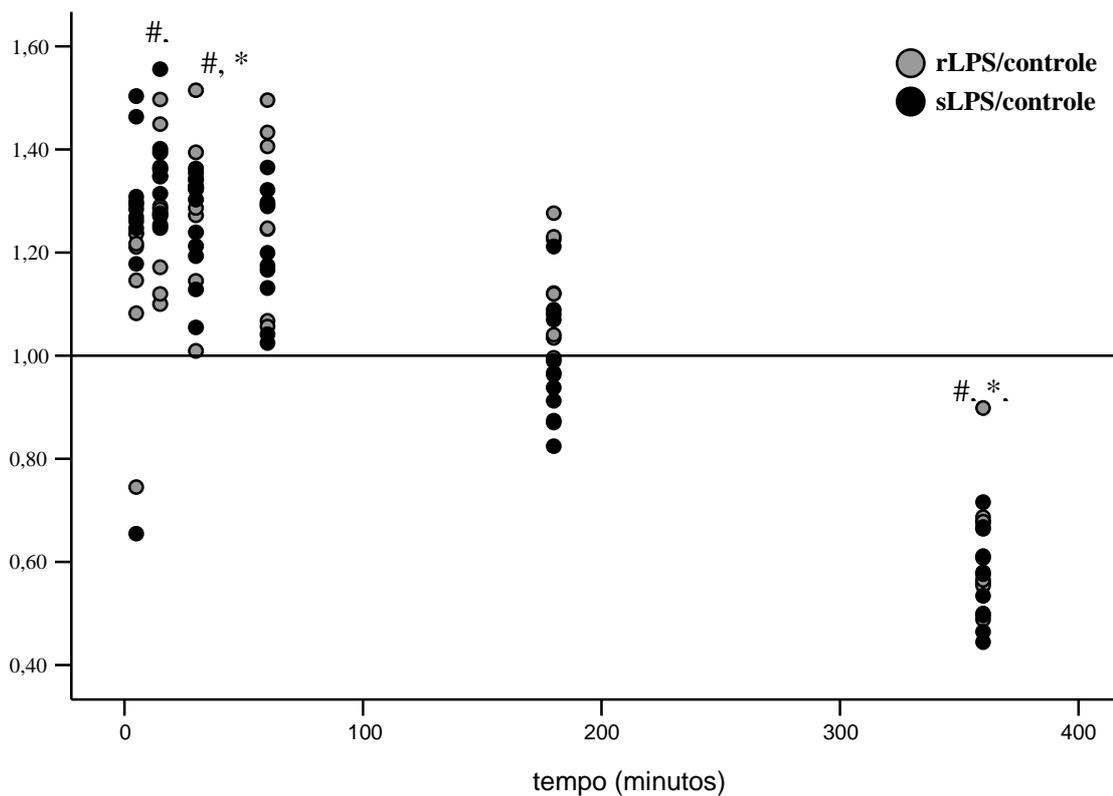
#### 5.1.1.2 Cinética:

O estudo de cinética da modulação da expressão de receptores na superfície de monócitos e neutrófilos foi realizada com concentrações de 100ng/mL de r e sLPS em sangue total nos tempos de 5, 15, 30, 60, 180 e 360 min. Alguns receptores também foram estudados em tempos mais tardios (10 e 24 h).

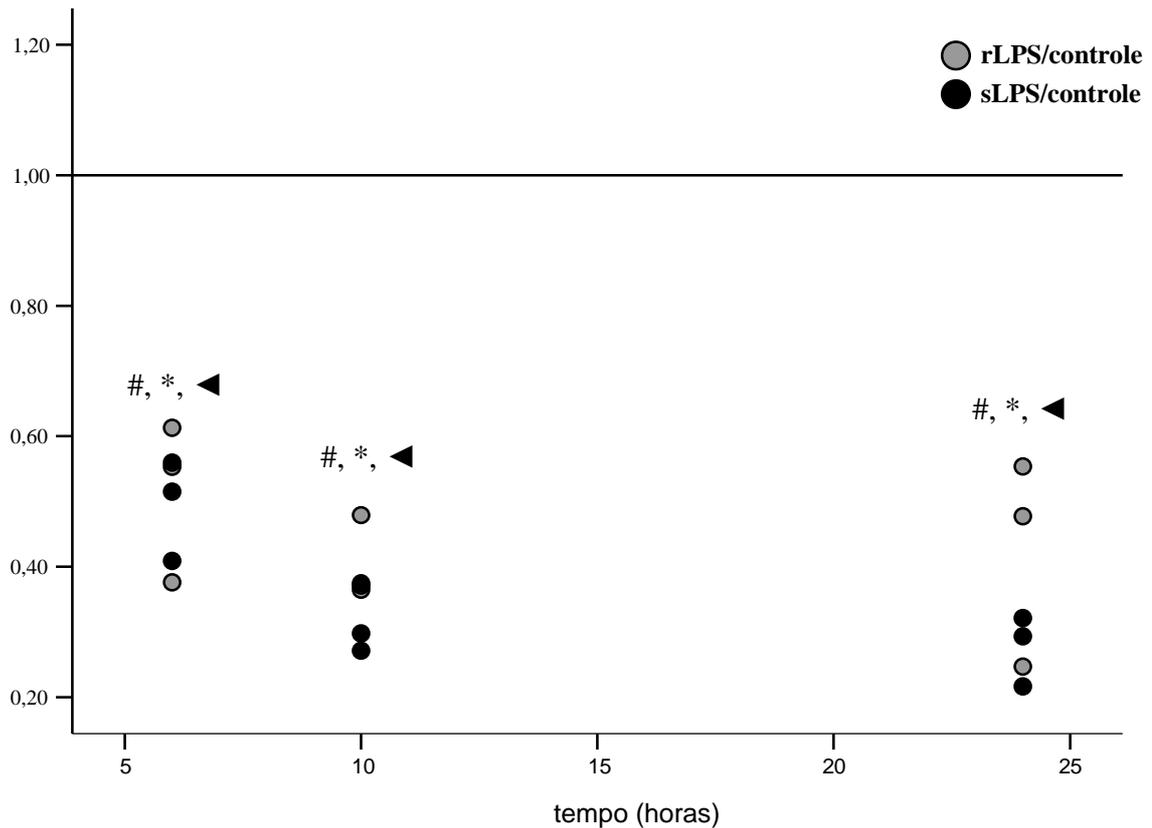
#### - CD14 na superfície de monócitos e neutrófilos

A modulação da expressão de CD14 na superfície de monócitos foi avaliada pela razão entre a expressão do receptor com cada estímulo e a expressão na situação controle, para cada indivíduo e tempo de incubação, como é mostrado na figura 5.3. Houve diferença entre os grupos estudados nos tempos de 15, 30 e 360 min ( $p=0,03$ ;  $p=0,05$  e  $p<0,01$ ; respectivamente). O pós-teste mostrou que a diferença vista em 15 min foi entre controle e sLPS ( $p=0,04$ ), de 30 min entre controle e rLPS ( $p=0,06$ ) e em 360 min tanto entre controle e rLPS ( $p<0,01$ ) como controle e sLPS ( $p<0,01$ ). Como pode ser observado, houve aumento na expressão de CD14 nos tempos

iniciais de incubação, chegando a incremento de 30%, seguido de queda da expressão de até 40% no tempo de 6 h, porém a modulação por r e sLPS não mostraram diferenças entre si, segundo o teste de Tukey. Foram feitas incubações por tempos mais longos para verificar se o comportamento de queda de expressão se mantinha. Obteve-se resultados mostrando tendência de queda até 60%, como mostra a figura 5.4 ( $p < 0,01$  quando comparados os grupos controle, r e sLPS nos tempos de 6, 10 e 24 h). Quando realizadas as comparações múltiplas, foram observadas diferenças entre os grupos controle e rLPS e controle e sLPS nos três tempos tardios ( $p < 0,01$  e em todos os casos citados).

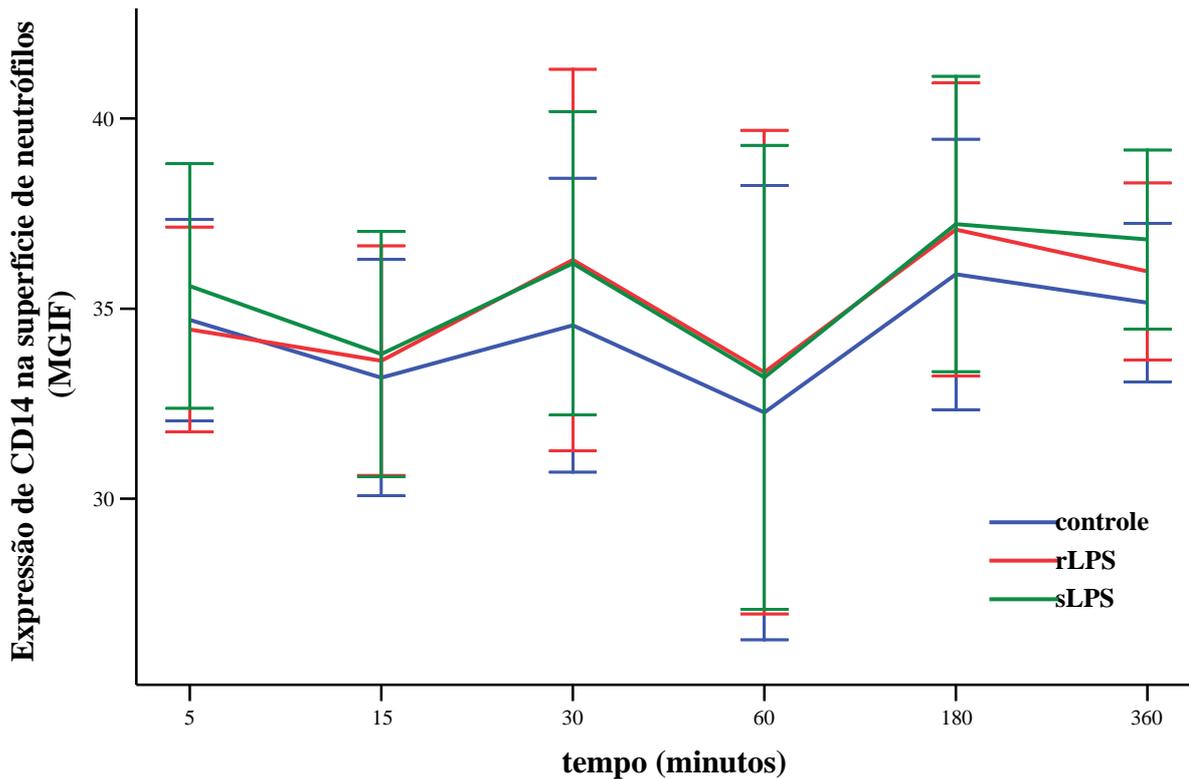


**Figura 5.3:** Razão da expressão de CD14 na superfície de monócitos estimulados com r ou sLPS (ambos em concentrações de 100ng/mL) em relação ao controle (sem estímulo), nos tempos de incubação de 5, 15, 30, 60, 180 ou 360 min. Ensaios realizados com 10 indivíduos. A linha no gráfico mostra os valores onde a expressão do receptor nas células estimuladas seria igual à expressão no controle respectivo. #  $p \leq 0,05$  comparando os grupos controle, r e sLPS num mesmo tempo (ANOVA),  $p \leq 0,05$  quando feitas as comparações múltiplas entre controle e rLPS (\*) e controle e sLPS (◄), por pós-teste de Tukey.



**Figura 5.4:** Razão da expressão de CD14 na superfície de monócitos estimulados com r ou sLPS (ambos em concentrações de 100ng/mL) em relação ao controle (sem estímulo), nos tempos de incubação de 6, 10 ou 24 h. Ensaios realizados com 3 indivíduos. A linha no gráfico mostra os valores onde a expressão do receptor nas células estimuladas seria igual à expressão no controle respectivo. # $p \leq 0,05$  quando comparados os grupos controle com r e sLPS (ANOVA),  $p \leq 0,05$  quando feitas as comparações múltiplas entre controle e rLPS (\*) e controle e sLPS ( $\blacktriangleleft$ ), por pós-teste de Tukey.

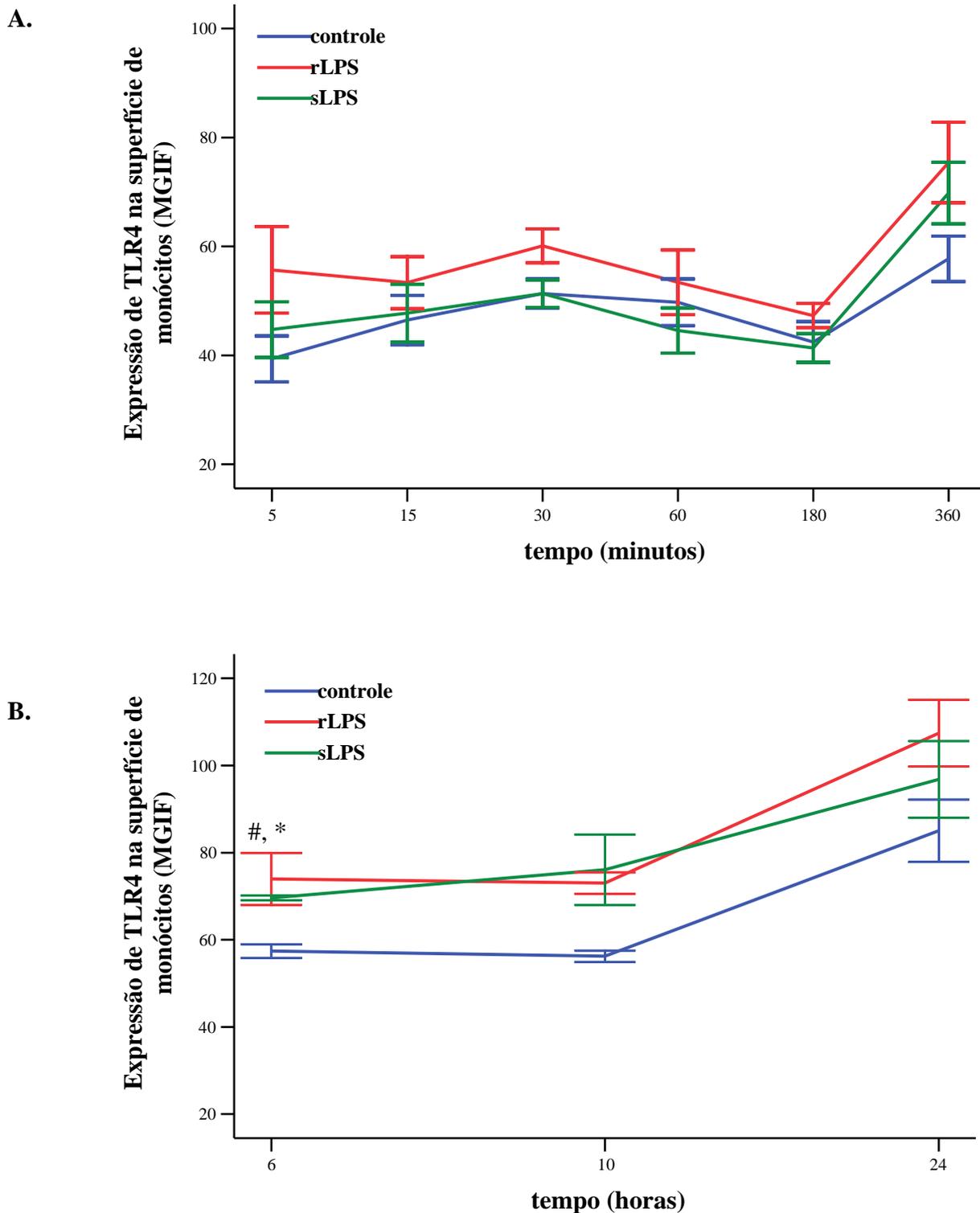
A expressão de CD14 na superfície de neutrófilos é bastante reduzida (com MGIF entre 30 e 40, figura 5.5), quando comparada com a expressão na superfície de monócitos (MGIF sempre superior a 120), confirmando que tais células expressam pouco ou não expressam CD14 em sua superfície. Também observamos que tal expressão não foi modulada pela presença de LPS.



**Figura 5.5:** Expressão de CD14 na superfície de neutrófilos após incubação com diferentes estímulos (meio, rLPS 100 ng/mL e sLPS 100 ng/mL) por 5, 15, 30, 60, 180 ou 360 min. Nos gráficos os valores são mostrados em MGIF. Estão representadas as médias e erros padrão de cada tempo de estímulo, obtidas de 4 indivíduos saudáveis.

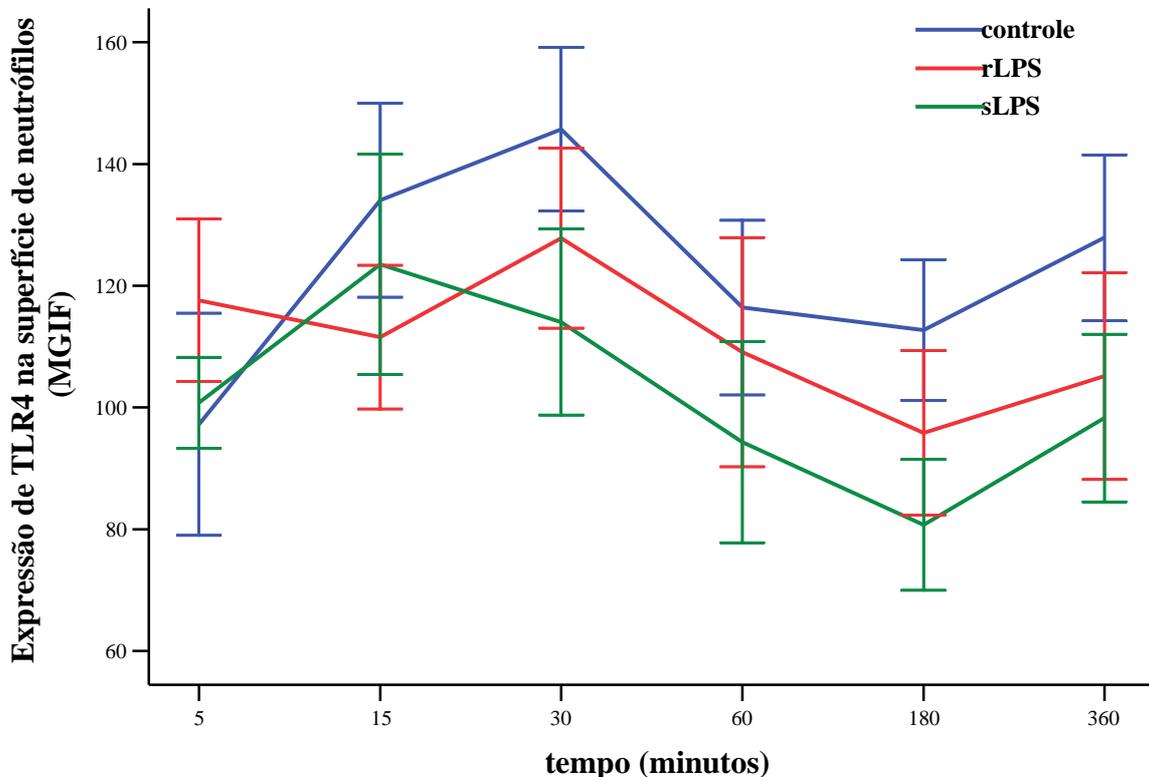
#### - Expressão de TLR4 e TLR2 na superfície de monócitos e de neutrófilos

A cinética de expressão de TLR4 em monócitos não mostrou significância estatística entre os grupos em nenhum dos períodos de incubação, apenas com tendência de aumento com 30 min de estímulo ( $p=0,06$ ) (figura 5.6). Foi feito um experimento com incubações mais longas (6, 10 e 24 h), onde foi possível observar diferença com 6 h ( $p=0,04$ ) e tendência com 10 h de incubação ( $p=0,06$ ), e aumento de expressão basal acompanhando o acréscimo em 24 h. A análise dos grupos dois a dois mostrou que a diferença com 6 h de incubação foi entre controle e rLPS ( $p=0,04$ ).



**Figura 5.6:** Cinética da expressão de TLR4 na superfície de monócitos induzida por r e sLPS. O sangue periférico foi incubado sem estímulo, com rLPS 100 ng/mL ou sLPS 100 ng/mL por (A) 5, 15, 30, 60, 180 ou 360 min ou (B) 6, 10 ou 24 h. Nos gráficos os valores são mostrados em MGIF. Estão representadas as médias e erros padrão de cada tempo de estímulo, obtidas de (A) 4 e (B) 3 indivíduos saudáveis. # $p \leq 0,05$  comparando os grupos controle, r e sLPS num mesmo tempo (ANOVA), \* $p \leq 0,05$  quando comparados os grupos controle e rLPS (pós-teste de Tukey).

Nos neutrófilos, é possível observar que a expressão de TLR4 nas células estimuladas se comporta similarmente ou ligeiramente menor em relação ao controle em todos os tempos de incubação utilizados (figura 5.7), incluindo os tempos tardios de 10 e 24 h (dado não mostrado).

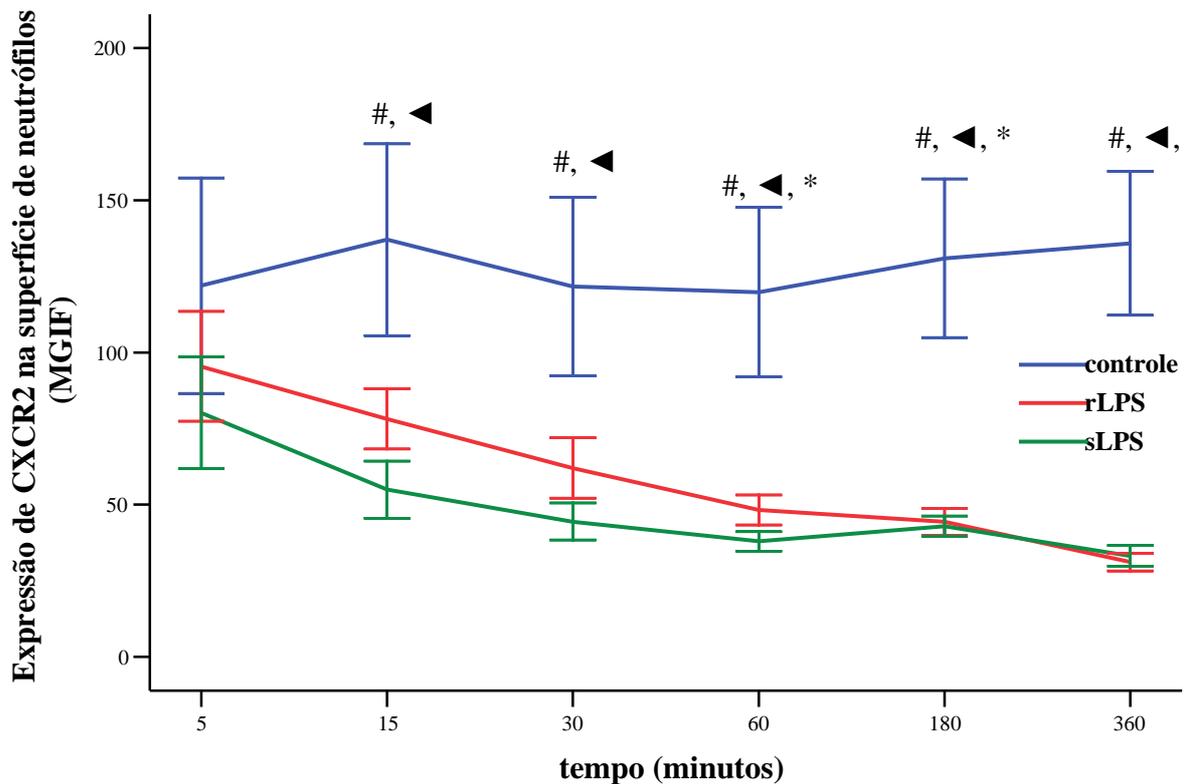


**Figura 5.7:** Cinética da expressão de TLR4 na superfície de neutrófilos induzida por r e sLPS. O sangue periférico foi incubado sem estímulo, com rLPS 100 ng/mL ou sLPS 100 ng/mL por 5, 15, 30, 60, 180 e 360 min. Nos gráficos os valores são mostrados em MGIF. Estão representadas as médias e erros padrão de cada tempo de estímulo, obtidas de 4 indivíduos saudáveis.

A expressão de TLR2 também não foi modulada nos tempos estudados na superfície de monócitos e neutrófilos (dado não mostrado).

#### - Expressão de CXCR2 na superfície de neutrófilos

As modulações de CXCR2 provocadas nos neutrófilos por r e sLPS se mostraram negativas (figura 5.8), chegando a reduzir mais de 50% no tempo de 360 min. Foi vista diferença estatística entre os grupos nos tempos de 15 a 360 min ( $p=0,03$ ;  $p=0,02$ ;  $p<0,01$ ;  $p<0,01$  e  $p<0,01$ , nos tempos de 15, 30, 60, 180 e 360 min, respectivamente). O sLPS tem ação um pouco mais precoce, o que foi confirmado pelo pós-teste onde a significância aparece com 15 min ( $p=0,03$ ;  $p=0,02$ ;  $p<0,01$ ;  $p<0,01$ ;  $p<0,01$ ; para os tempos de 15 a 360 min), mas entre controle e rLPS somente após 60 min ( $p=0,02$ ;  $p<0,01$ ;  $p<0,01$ , para os tempos de 60 a 360 min).



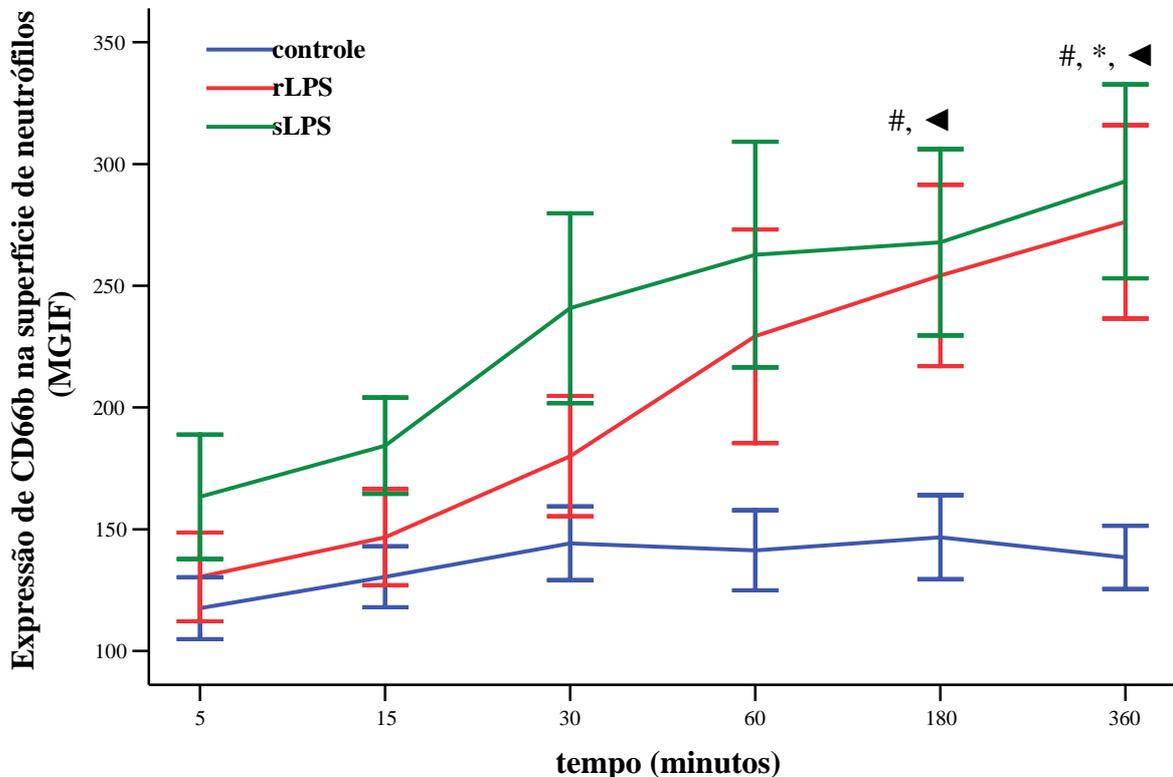
**Figura 5.8:** Cinética da expressão de CXCR2 na superfície de neutrófilos induzida por r e sLPS. O sangue periférico foi incubado sem estímulo, com rLPS 100 ng/mL ou sLPS 100 ng/mL por 5, 15, 30, 60, 180 e 360 min. Nos gráficos os valores são mostrados em MGIF. Estão representadas as médias e erros padrão de cada tempo de estímulo, obtidos de 6 indivíduos saudáveis. #  $p \leq 0,05$  comparando os grupos controle, r e sLPS num mesmo tempo (ANOVA),  $p \leq 0,05$  quando comparados os grupos controle e rLPS (\*) e controle e sLPS (◀) (teste de Tukey).

#### - CD66b na superfície de neutrófilos

O aumento de expressão de CD66b na superfície de neutrófilos ao longo do tempo de exposição a r e sLPS mostrou significância estatística quando comparados os grupos controle, r e sLPS nos tempos de 180 e 360 min ( $p=0,02$  e  $p<0,01$ , respectivamente, figura 5.6). Tal expressão foi aumentada em até 2 vezes no tempo de 180 min e 3 vezes em 360 min, em relação ao controle (figura 5.9). Durante as comparações múltiplas, foi observada que a resposta ao rLPS é mais tardia ( $p=0,02$  na comparação com o controle no tempo de 360 min), enquanto o sLPS mostrou significância ou tendência mais precocemente, desde os 30 min de incubação ( $p=0,06$ ;  $p=0,08$ ;  $p=0,04$  e  $p<0,01$ ; nos tempos de 30, 60, 180 e 360 min, respectivamente).

Quando realizada a estimulação por tempos mais longos (de 10 e 24 h), foi possível observar que a expressão de CD66b nas células estimuladas se manteve elevada em relação à

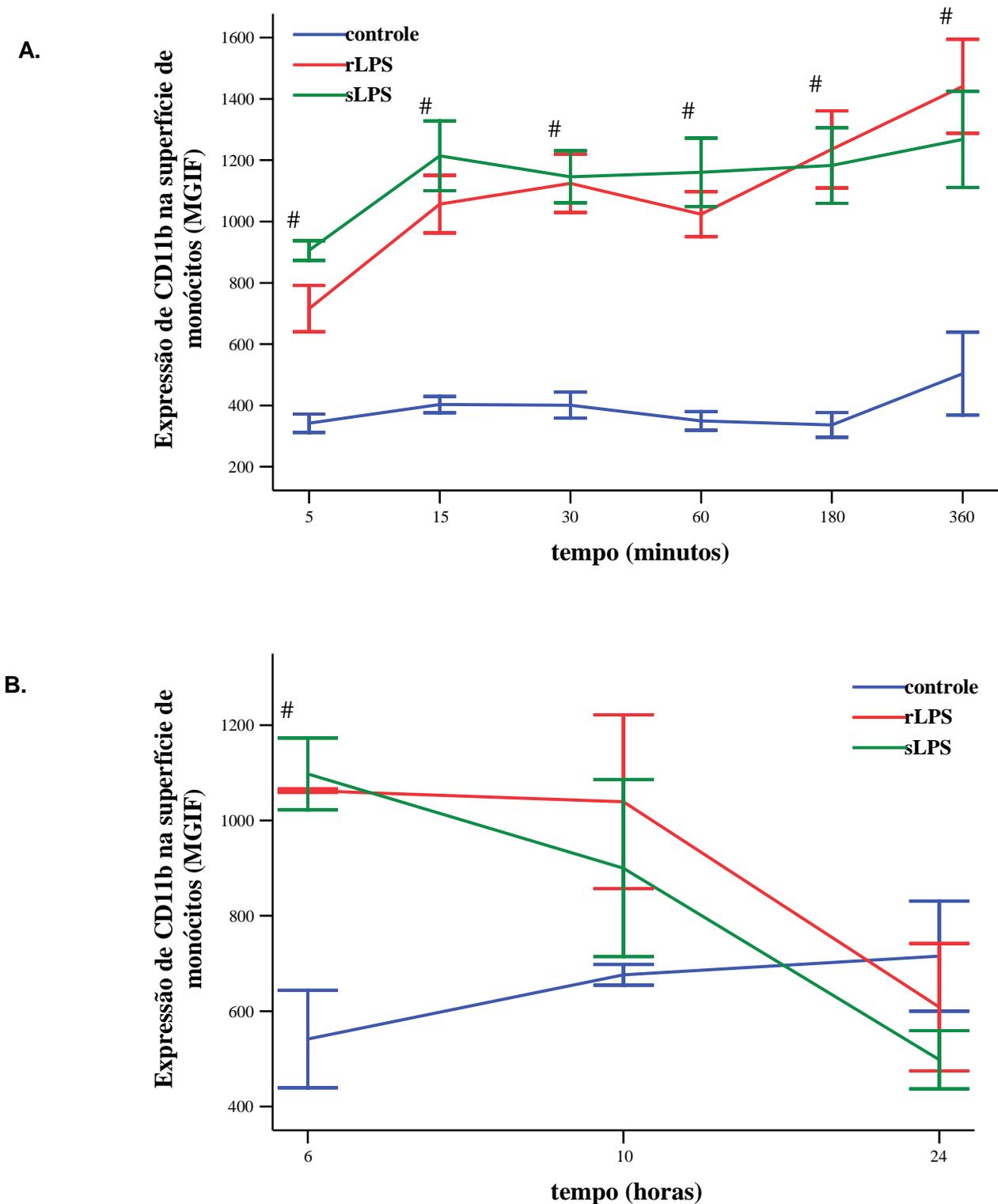
expressão nas células não estimuladas, como visto em 6 h de incubação, permanecendo significativa a diferença entre os três grupos comparados entre si e entre controle e rLPS e controle e sLPS (dado não mostrado).



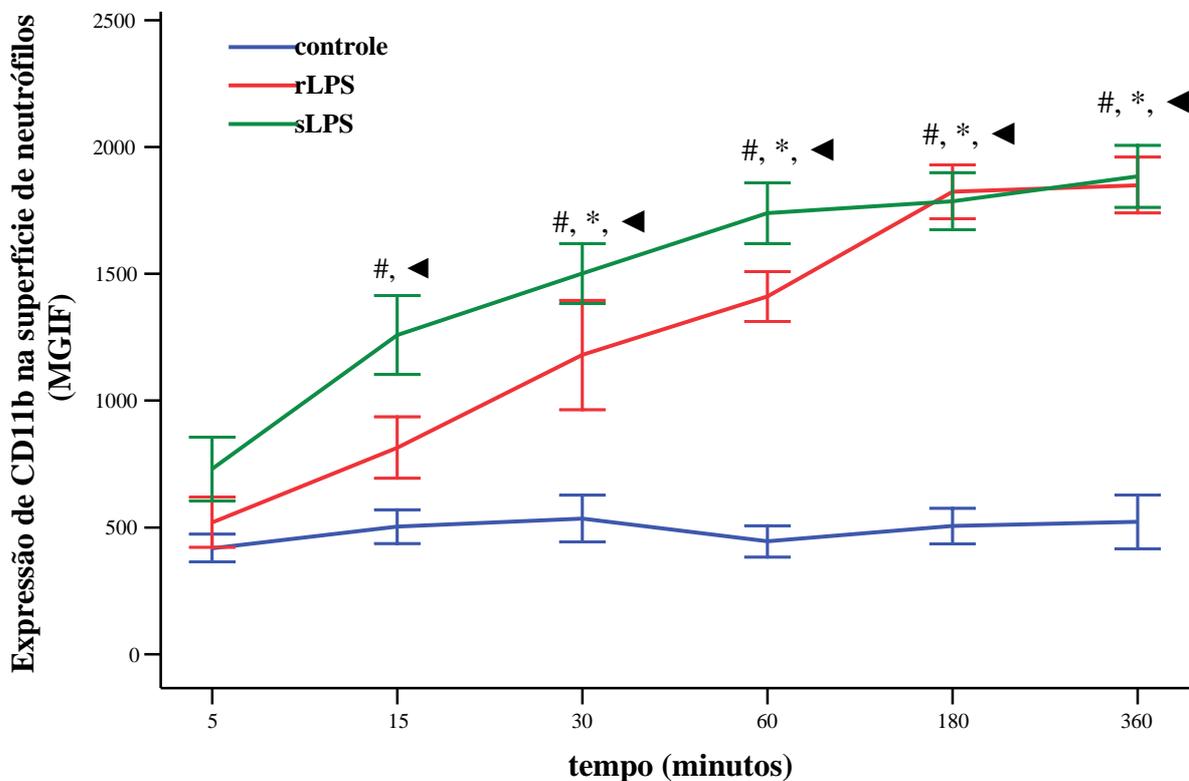
**Figura 5.9:** Expressão de CD66b na superfície de neutrófilos após incubação com diferentes estímulos (meio, rLPS 100 ng/mL e sLPS 100 ng/mL) por 5, 15, 30, 60, 180 ou 360 min. No gráfico os valores são mostrados em MGIF. Estão representadas as médias e erros padrão de cada tempo de estímulo, obtidas de 9 indivíduos saudáveis. #  $p \leq 0,05$  comparando os grupos controle, r e sLPS num mesmo tempo (ANOVA),  $p \leq 0,05$  quando comparados os grupos controle e rLPS (\*) e controle e sLPS (◀) separadamente (pós-teste de Tukey).

#### - Expressão de CD11b e CD11c na superfície de monócitos e de neutrófilos

Os estímulos de r e sLPS levaram a aumento da expressão de CD11b na superfície de monócitos em todas as incubações, até 6 h ( $p < 0,01$  na comparação entre controle, r e sLPS nos tempos de 5, 15, 30, 60, 180 e 360 min), com um aumento de 2 vezes em 5 min e próximo a quase 4 vezes em 6 h (figura 5.10A), ambos os antígenos atuando de maneira semelhante. Nos tempos de 10 e 24 h, não foi observado aumento da expressão de CD11b nas células estimuladas em comparação aos controles (figura 5.10B).



Já na superfície de neutrófilos, a expressão foi aumentada a partir de 15 min de estímulo, onde nas células estimuladas a expressão foi cerca de 2 vezes maior em relação ao controle (figura 5.11), e se manteve alta, chegando a quatro vezes nos tempos de 3 e 6 h ( $p < 0,01$  na comparação entre controle, r e sLPS nos tempos de 15, 30, 60, 180 e 360 min). A expressão nas células estimuladas se manteve nesta mesma magnitude e com diferença estatisticamente significativa nos tempos de 10 e 24 h (dado não mostrado). Nestas células, o sLPS levou a aumento da expressão do receptor mais precocemente do que o rLPS (quando comparados no pós-teste, os dados obtidos com estimulação com rLPS passaram a ter  $p \leq 0,05$  a partir de 30 min, enquanto que com sLPS a partir de 15 min), sendo que ambos estimularam em níveis semelhantes a partir de 180 min.

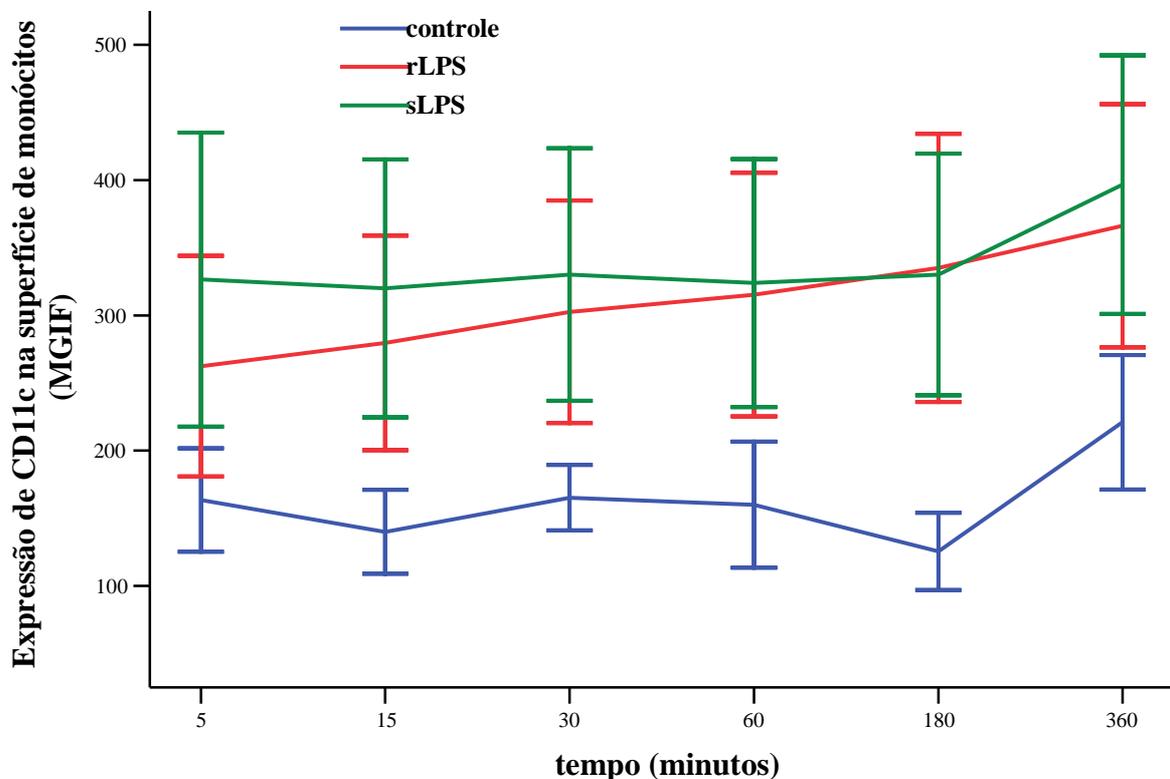


**Figura 5.11:** Cinética da expressão de CD11b na superfície de neutrófilos induzida por r e sLPS. O sangue periférico foi incubado sem estímulo, com rLPS 100 ng/mL ou sLPS 100 ng/mL por 5, 15, 30, 60, 180 ou 360 min. Nos gráficos os valores são mostrados em MGIF. Estão representadas as médias e erros padrão de cada tempo de estímulo, obtidas de 4 indivíduos sadios. #  $p \leq 0,05$  comparando os grupos controle, r e sLPS num mesmo tempo (ANOVA),  $p \leq 0,05$  quando comparados os grupos controle e rLPS (\*) e controle e sLPS (◀) (pós-teste de Tukey).

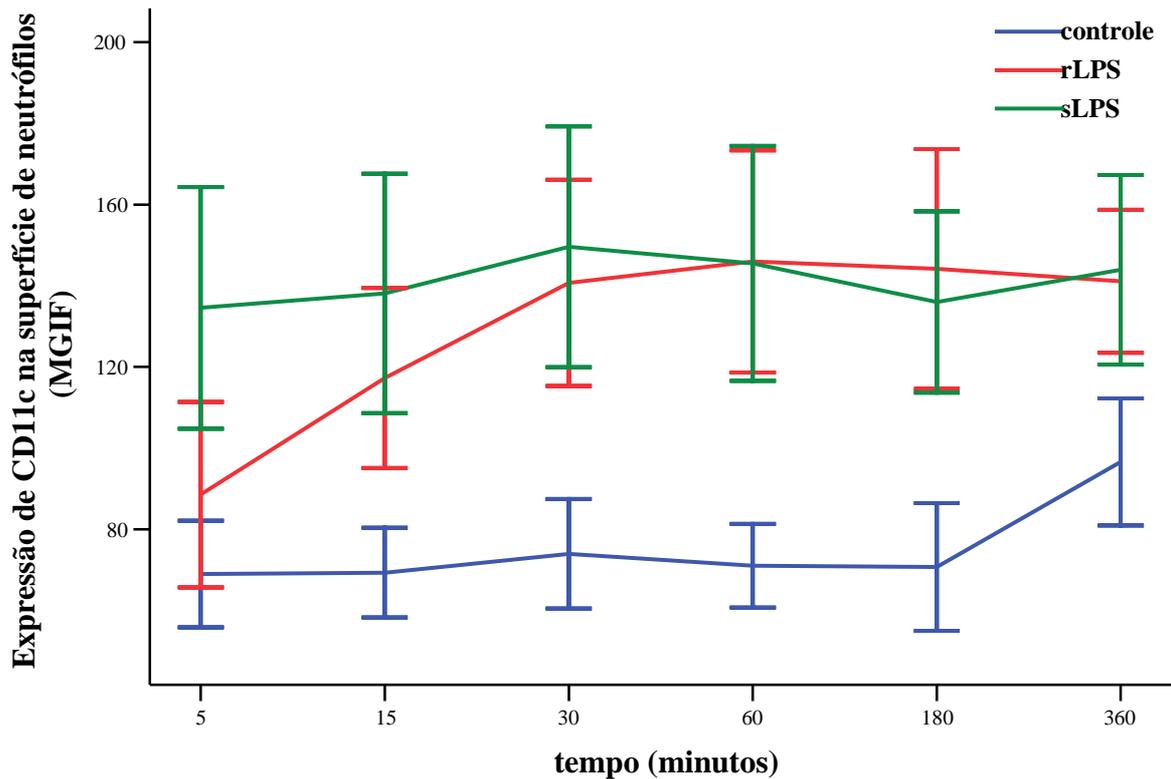
Na superfície de monócitos parece haver aumento de expressão de CD11c na presença de r e sLPS (figura 5.12), porém não significativa. Com 180 min de incubação é possível ver a

expressão dos estimulados 2 vezes maior que o controle. Porém, esta regulação positiva de CD11c, não se manteve ao longo do tempo e, além disso, é menos intensa que o aumento visto em CD11b, tendo mais expressão cerca de 2 vezes menor nos controles e 4 vezes menor nos estimulados. Já no tempo de 360 min, houve aumento de expressão basal, o que pode ser responsável pelo aumento de expressão visto.

Na superfície dos neutrófilos, como mostrado na figura 5.13, a intensidade de expressão de CD11c é bem menor que a de CD11b (cerca de 6 vezes menor nos controles e 10 vezes menor nos estimulados com maior expressão). Apesar de o aumento não ter sido significativo, ele foi visto nos tempos de 30, 60 e 180 min, estabilizado em 2 vezes a expressão do controle. No tempo de 360 min, como na superfície de monócitos, houve discreto aumento na expressão basal.



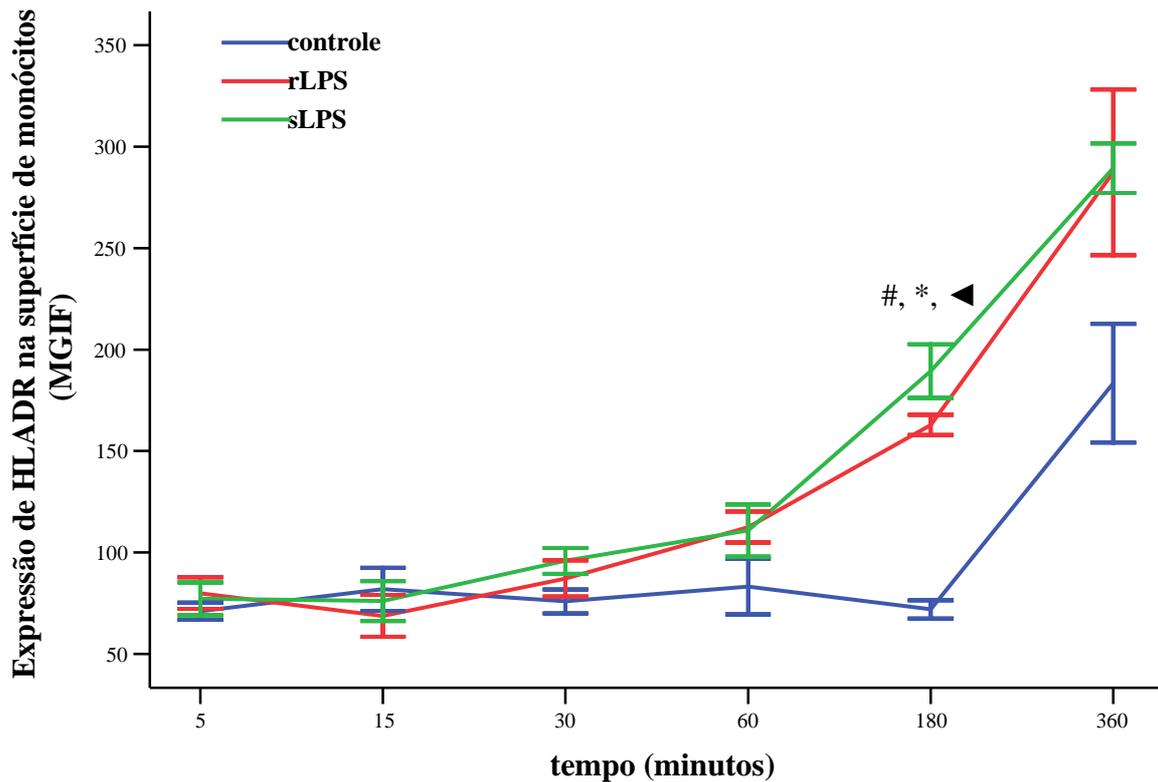
**Figura 5.12:** Cinética da expressão de CD11c na superfície de monócitos induzida por r e sLPS. O sangue periférico foi incubado sem estímulo, com rLPS 100 ng/mL ou sLPS 100 ng/mL por 5, 15, 30, 60, 180 ou 360 min. Nos gráficos os valores são mostrados em MGIF. Estão representadas as médias e erros padrão de cada tempo de estímulo, obtidas de 4 indivíduos saudáveis.



**Figura 5.13:** Cinética da expressão de CD11c na superfície de neutrófilos induzida por r e sLPS. O sangue periférico foi incubado sem estímulo, com rLPS 100 ng/mL ou sLPS 100 ng/mL por 5, 15, 30, 60, 180 ou 360 min. Nos gráficos os valores são mostrados em MGIF. Estão representadas as médias e erros padrão de cada tempo de estímulo, obtidas de 4 indivíduos saudáveis.

#### - Expressão de HLADR na superfície de monócitos

O aumento na expressão de HLADR na superfície de monócitos evidencia a ativação celular. No presente estudo, a comparação entre os grupos mostrou diferença estatisticamente significativa na incubação por 180 min ( $p < 0,01$ ), onde chegou a ser mais de 50% maior nos estimulados em relação ao controle. O pós-teste mostrou que a diferença vista foi entre controle e rLPS ( $p < 0,01$ ) e entre controle e sLPS ( $p < 0,01$ ), mas não foi vista diferença entre os estímulos de r e sLPS (figura 5.14).



**Figura 5.14:** Cinética da expressão de HLADR na superfície de monócitos induzida por r e sLPS. O sangue periférico foi incubado sem estímulo, com rLPS 100 ng/mL ou sLPS 100 ng/mL por 5, 15, 30, 60, 180 e 360 min. Nos gráficos os valores são mostrados em MGIF. Estão representadas as médias e erros padrão de cada tempo de estímulo, obtidos de 4 indivíduos saudáveis. #  $p \leq 0,05$  comparando os grupos controle, r e sLPS num mesmo tempo (ANOVA),  $p \leq 0,05$  quando comparados os grupos controle e rLPS (\*) e controle e sLPS (◀) (pós-teste de Tukey).

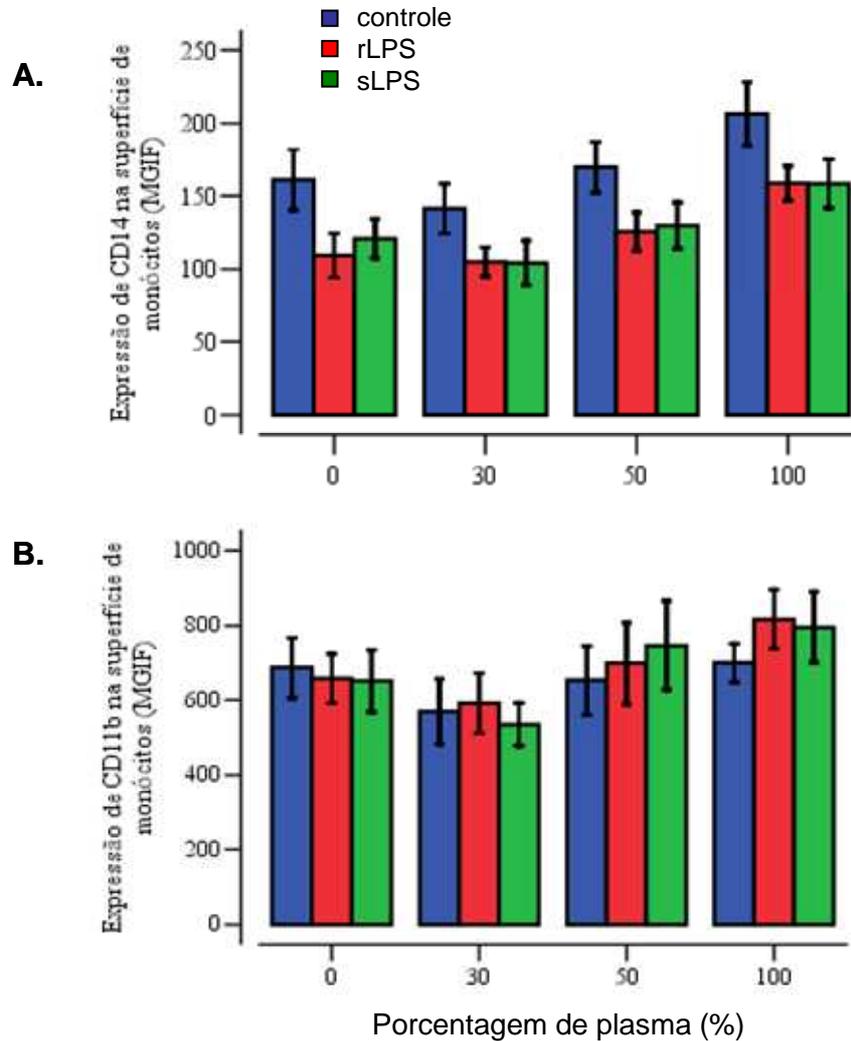
### 5.1.2 Estudo da influência da presença de plasma na expressão de receptores de superfície de neutrófilos e monócitos após estimulação com r e sLPS

Uma série de experimentos foi conduzida tentando observar a influência do plasma (e conseqüentemente da presença de sCD14 e outras proteínas que interagem com o LPS) no modelo de sangue total e da interação entre as células e expressão em modelo de células separadas.

O estudo de influência do plasma na expressão dos receptores em resposta aos estímulos de r e sLPS foi feito com estímulos controle, rLPS 100 ng/mL e sLPS 100 ng/mL por 3h de incubação, com o sangue de 4 indivíduos saudáveis, com média de idade de 32 ( $\pm 10,9$ ) anos.

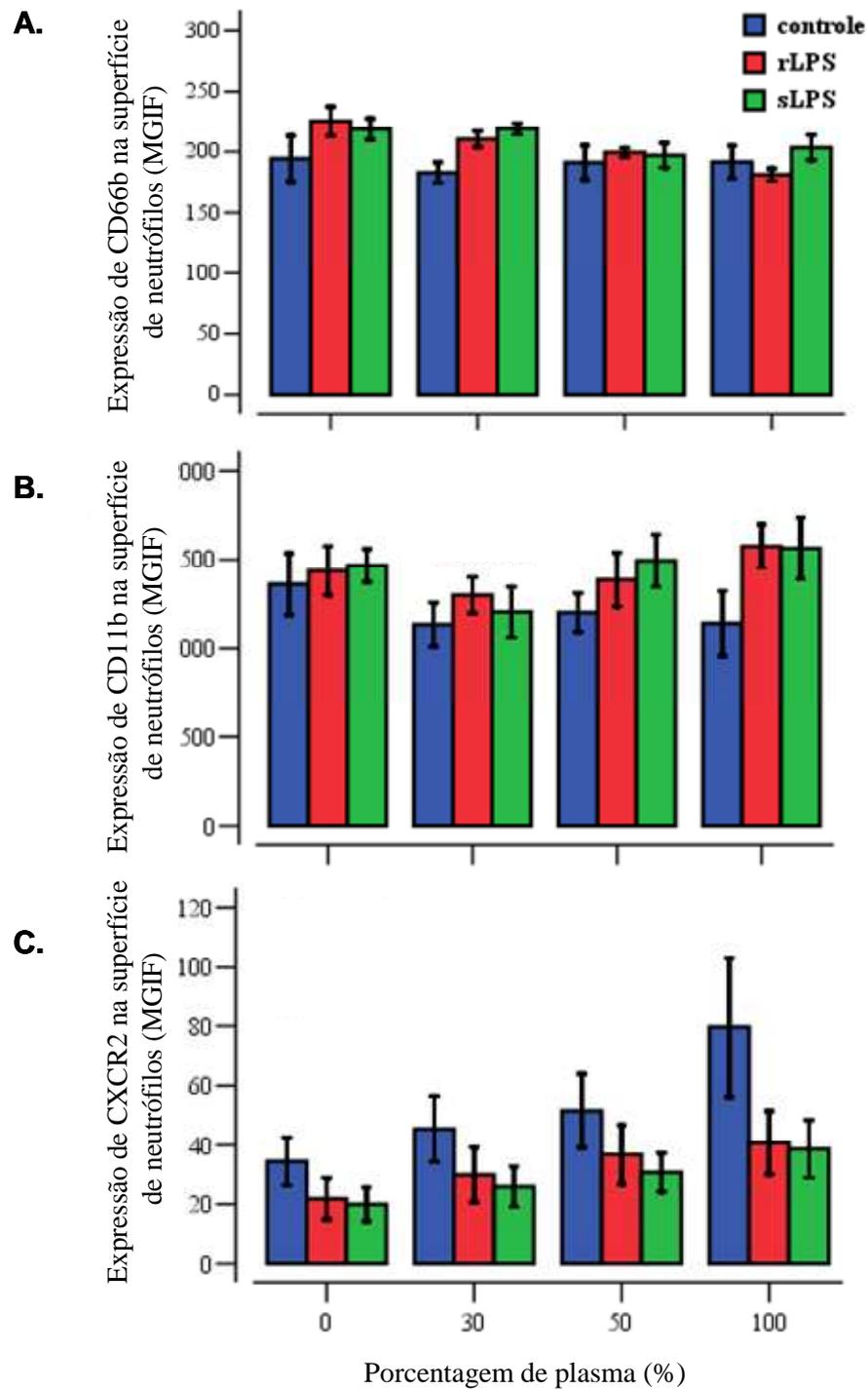
Foi possível observar que o aumento da porcentagem do plasma autógeno foi acompanhado de forma proporcional pelo aumento de expressão dos receptores CD14 e CD11b

na superfície de monócitos (figuras 5.15). A modulação da expressão de CD11b parece se apresentar melhor na condição com 100% de plasma.



**Figura 5.15:** Expressão de CD14 (A) e CD11b (B) na superfície de monócitos em modelo utilizando diferentes concentrações de plasma (0; 30; 50 e 100%). O sangue periférico com as concentrações de plasma mencionadas foi incubado sem estímulo, com rLPS 100 ng/mL ou sLPS 100 ng/mL por 3 h. Nos gráficos os valores são mostrados em MGIF. Estão representadas as médias e erros padrão de cada condição de estímulo, obtidos de 4 indivíduos saudáveis.

Similar influência do plasma foi observada também nos neutrófilos (figura 5.16), e a melhor condição para modulação dos receptores CD11b e CXCR2 foi a de 100% de plasma.



**Figura 5.16:** Expressão de CD66b (A), CD11b (B) e CXCR2 (C) na superfície de neutrófilos em modelo utilizando diferentes concentrações de plasma (0; 30; 50 e 100%). O sangue periférico com as concentrações de plasma mencionadas foi incubado sem estímulo, com rLPS 100 ng/mL ou sLPS 100 ng/mL por 3 h. Nos gráficos os valores são mostrados em MGIF. Estão representadas as médias e erros padrão de cada condição de estímulo, obtidos de 4 indivíduos saudáveis.

### 5.1.3 Estimulação *in vitro* de PMN e CMSP para estudo da dinâmica de receptores de superfície

O estudo de expressão de receptores na superfície de monócitos e neutrófilos em células separadas foi realizado com concentrações de 100 ng/1x10<sup>6</sup> células de r e sLPS, nos tempos de 1 e 6 h. Foram estudadas CMSP e PMN de 8 indivíduos saudáveis, com média de idade de 28,5 (±3,5) anos.

#### - Monócitos e neutrófilos isolados:

Os monócitos presentes nas CMSP separadas comportaram-se como os monócitos em sangue total nos dois tempos estudados para o receptor CD14. Não houve diferença na expressão do receptor com 1 h, mas com 6 h a mesma reduziu na presença dos antígenos (p=0,02), sem diferença entre as duas formas de LPS (p=0,89 e p=0,92 com 1 e 6 h de incubação, respectivamente) (figura 5.17A). Porém, os dados foram diversos dos anteriores para a expressão de CD11b, pois nas células separadas não vimos modulação (figura 5.17B).

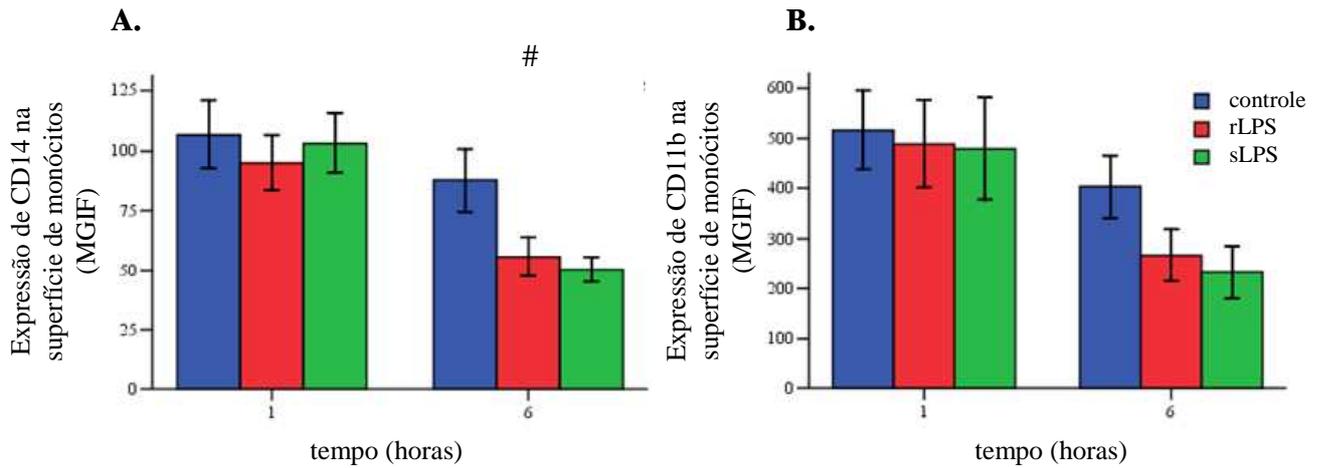
Os neutrófilos presentes nas PMN separadas comportaram-se de forma completamente diversa da anterior quando em sangue total. Os estímulos não levaram a indução de expressão nem de CD66b (figura 5.18A), nem de CD11b (figura 5.18B).

O comportamento não conclusivo visto na tentativa de modulação de receptores em células separadas nos levou a um novo experimento, onde as CMSP e PMN foram co-cultivadas.

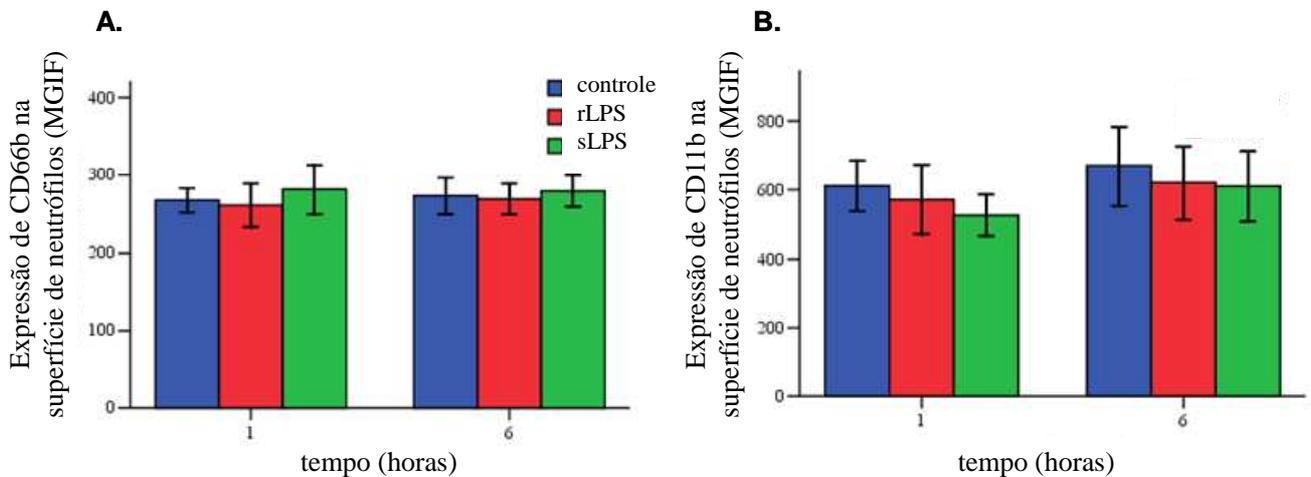
#### - Co-culturas:

O estudo de expressão de receptores na superfície de neutrófilos em células co-cultivadas foi realizado com concentrações de 100 ng/1x10<sup>6</sup> células de r e sLPS, nos tempos de 1 e 6 h. Foram estudadas PMN de 2 indivíduos saudáveis, com média de idade de 27 (±2) anos.

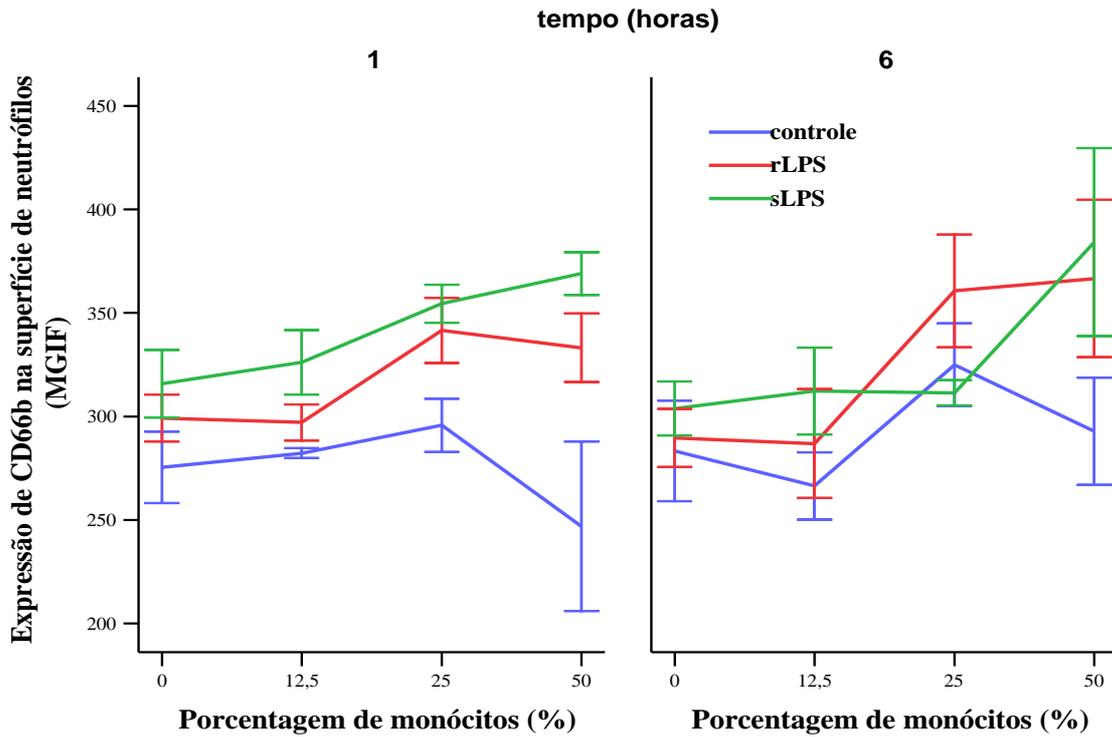
Quando foi realizada a co-cultura, em busca de investigar se a possível interação entre PMN e CMSP poderia alterar a resposta de neutrófilos, mostrou-se que as alterações na expressão de CD66b e CD11b na superfície de neutrófilos não foram significativas (figuras 5.19 e 5.20, respectivamente). Porém, observando os gráficos, nota-se que à medida que aumentamos a proporção de CMSP, pode-se diferenciar melhor a modulação na expressão de CD66b causada pelos estímulos.



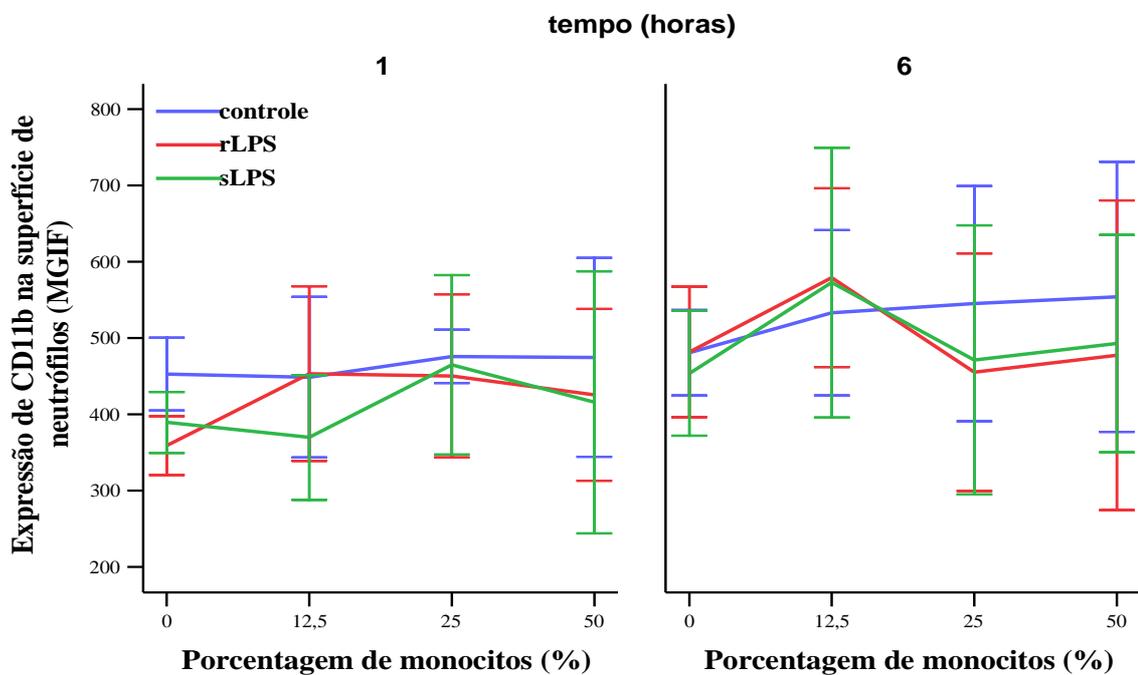
**Figura 5.17:** Expressão de CD14 (A) e CD11b (B) na superfície de monócitos de CMSP. As CMSP foram incubadas sem estímulo, com rLPS 100 ng/1x10<sup>6</sup> células ou sLPS 100 ng/1x10<sup>6</sup> células por 1 ou 6 h. Nos gráficos os valores são mostrados em MGIF. Estão representadas as médias e erros padrão de cada condição de estímulo, obtidos de 8 indivíduos saudáveis. # p≤0,05 comparando os grupos controle, r e sLPS num mesmo tempo (ANOVA).



**Figura 5.18:** Expressão de CD66b (A) e CD11b (B) na superfície de neutrófilos de PMN. As PMN foram incubadas sem estímulo, com rLPS 100 ng/1x10<sup>6</sup> células ou sLPS 100 ng/1x10<sup>6</sup> células por 1 ou 6 h. Nos gráficos os valores são mostrados em MGIF. Estão representadas as médias e erros padrão de cada condição de estímulo, obtidos de 8 indivíduos saudáveis.



**Figura 5.19:** Expressão de CD66b na superfície de neutrófilos co-cultivados com CMSP, com as porcentagens de 0; 12,5; 25 e 50% de CMSP. As células foram incubadas sem estímulo, com rLPS ou sLPS a  $100 \text{ ng}/1 \times 10^6$  células por 1 ou 6 h. Estão representadas as médias e erros padrão de cada condição de estímulo, obtidos de 2 indivíduos saudáveis.



**Figura 5.20:** Expressão de CD11b na superfície de neutrófilos co-cultivados com CMSP, com as porcentagens de 0; 12,5; 25 e 50% de CMSP. As células foram incubadas sem estímulo, com rLPS ou sLPS a  $100 \text{ ng}/1 \times 10^6$  células por 1 ou 6 h. Estão representadas as médias e erros padrão de cada condição de estímulo, obtidos de 2 indivíduos saudáveis.

## 5.2 Estimulação *in vitro* de sangue total para estudo da produção intracelular de espécies reativas de oxigênio

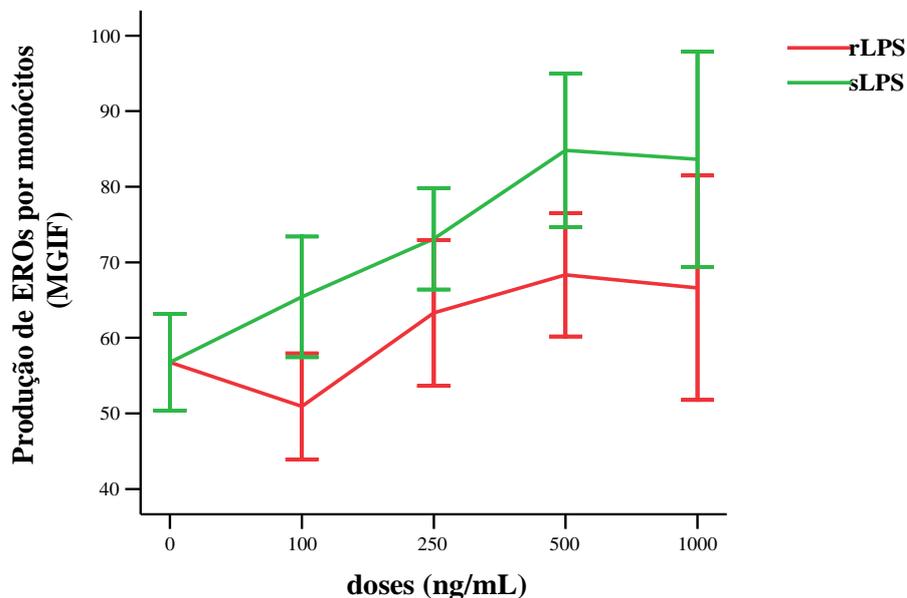
O estudo foi feito com o sangue total de 9 indivíduos, com média de idade de 29 ( $\pm 7,8$ ) anos.

### -Dose-resposta:

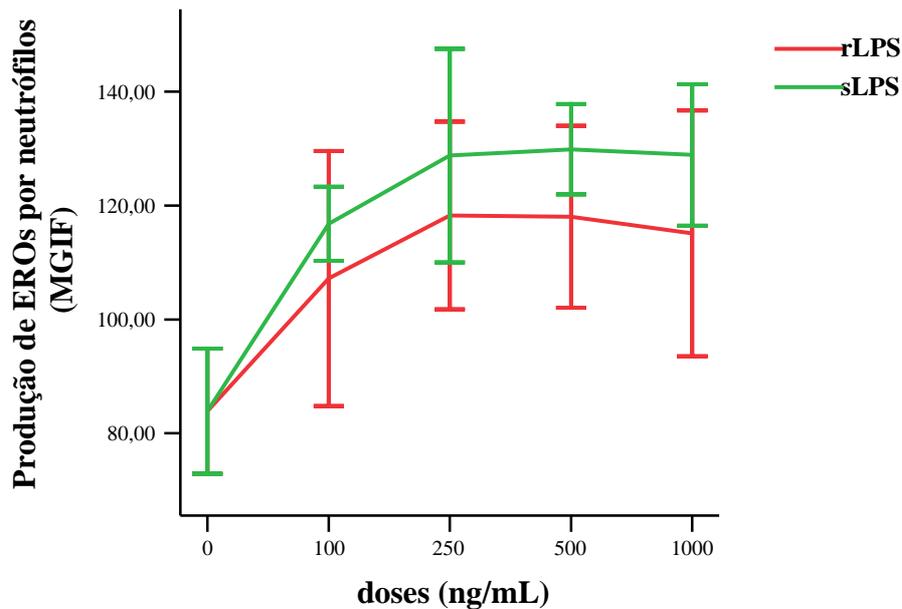
A curva de dose-resposta de LPS para produção de EROs por monócitos e neutrófilos foi realizada com concentrações crescentes de LPS em sangue total no tempo de 30 min.

A observação das respostas de monócitos de cada indivíduo mostra haver estimulação por ambas as formas de LPS (figura 5.21), de forma crescente em relação com a dose, chegando a maior resposta com a dose de 500 ng/mL.

Na curva dose-resposta de produção de EROs por neutrófilos (figura 5.22), os níveis de produção de cada indivíduo, assim como nos monócitos, são distintos, com valores de incremento de até 80% em relação ao controle (dado não mostrado). Porém, observando as médias podemos mostrar que houve incremento crescente acompanhando o aumento da dose, chegando a um platô com 250 ng/mL. É interessante destacar que em resposta ao estímulo com *S. aureus*, controle positivo do experimento, os monócitos produzem menor quantidade de EROs que os neutrófilos (dados não mostrados).



**Figura 5.21:** Curva da dose-resposta de produção EROs por monócitos induzida por r e sLPS. O sangue periférico foi incubado com diferentes concentrações de r e sLPS (0; 100; 250; 500 e 1000 ng/mL) por 30 min. São representadas as médias e erros padrão para cada dose, dados de 3 indivíduos saudáveis.

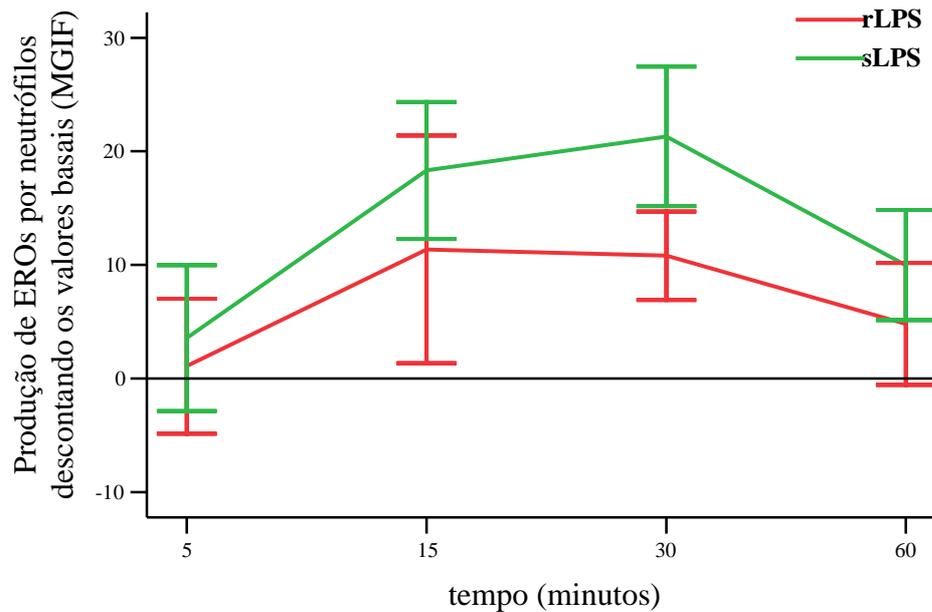


**Figura 5.22:** Curva da dose-resposta de produção de EROs por neutrófilos induzida por r e sLPS. O sangue periférico foi incubado diferentes concentrações de r e sLPS (0; 100; 250; 500 e 1000 ng/mL) por 30 min. Nos gráficos os valores são dados como MGIF de DCF. São representadas as médias e erros padrão para cada dose, dados de 3 indivíduos saudáveis.

O ponto de 500 ng/mL foi considerado mais apropriado para a realização do ensaio de cinética, para melhor compreensão da dinâmica de produção de EROs na presença de s e rLPS, apesar da ausência de padrão de estimulação entre os indivíduos e entre as diferentes formas de LPS em cada indivíduo.

#### - Cinética:

O estudo de cinética da produção de EROs por neutrófilos em resposta a r e sLPS foi feito com concentração de 500 ng/mL, incubados em sangue total. A produção individual foi muito variável (dado não mostrado), mas quando os dados foram agrupados pode ser vista indução da produção de EROs por neutrófilos nos tempos de 15 e 30 min (figura 5.23). Porém, não foi vista diferença quando foi feita a análise estatística.



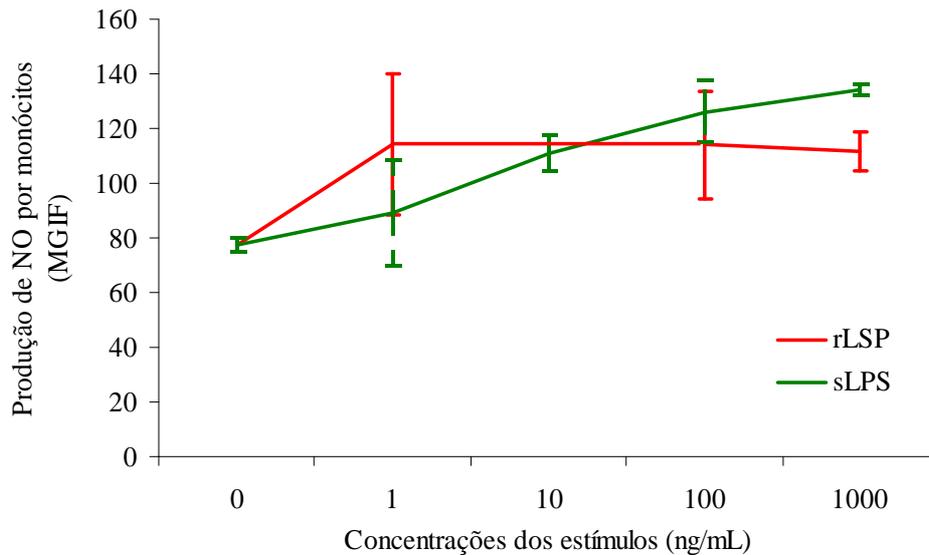
**Figura 5.23:** Cinética da produção de EROs por neutrófilos de voluntários saudáveis, após diferentes estímulos (meio, rLPS 500 ng/mL e sLPS 500 ng/mL). Os valores são dados em MGIF de DCF. São mostrados médias e erros padrão da diferença entre cada estímulo e a produção basal (do controle), dados de 6 indivíduos. A linha representa os valores onde a produção pelo estímulo foi igual a do controle.

### 5.3 Estimulação *in vitro* de sangue total para estudo da produção de óxido nítrico

O estudo de produção de NO em sangue total em resposta aos estímulos de r e sLPS foi feito com 8 indivíduos saudáveis, com média de idade de 29,1 ( $\pm 9,1$ ) anos.

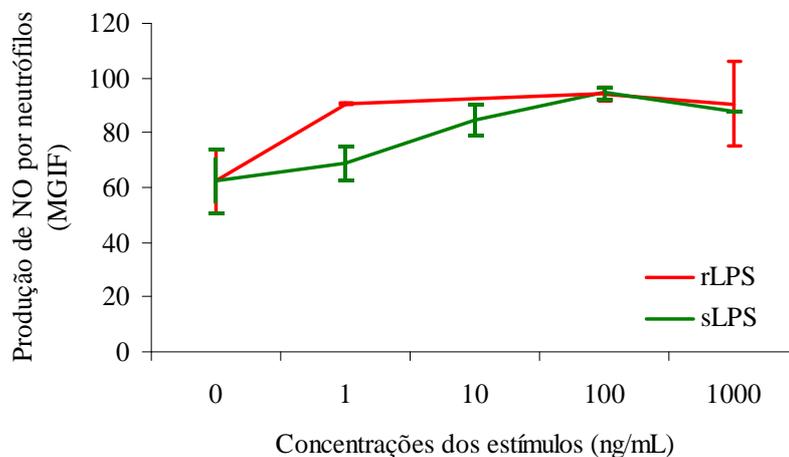
#### - Dose-resposta:

A curva de dose-resposta de LPS para produção de NO por monócitos e neutrófilos foi realizada com concentrações crescentes de LPS em sangue total no tempo de 30 min, com sangue de 2 indivíduos saudáveis. O gráfico de produção de NO por monócitos (figura 5.24) indica aumento de produção de NO por monócitos em resposta aos estímulos nas doses de 100 e 1000 ng/mL. A produção em resposta ao PMA foi bem maior que a do controle, de 4 a 5 vezes (dado não mostrado).



**Figura 5.24:** Curva da dose-resposta de produção de NO por monócitos induzida por r e sLPS. O sangue periférico foi incubado com diferentes concentrações de r e sLPS (0; 1; 10; 100 e 1000 ng/mL) por 30 min. Nos gráficos os valores são dados como MGIF de derivado benzotriazólico. São representadas as médias e erros padrão para cada dose, dados de 2 indivíduos saudáveis.

O aumento nas doses de estímulos levou a aumento na produção de NO por neutrófilos, como pode ser observado na figura 5.25. A produção obtida pelo PMA foi elevada em relação ao controle, de 8 e 9 vezes (dado não mostrado).

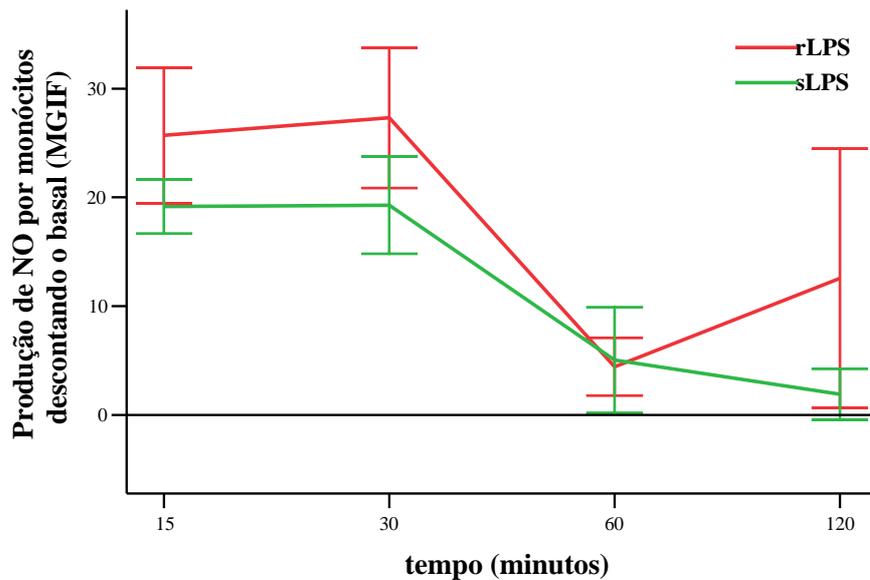


**Figura 5.25:** Curva da dose-resposta de produção de óxido nítrico (NO) por neutrófilos induzida por r e sLPS. O sangue periférico foi incubado com diferentes concentrações de r e sLPS (0; 1; 10; 100 e 1000 ng/mL) por 30 min. Nos gráficos os valores são dados como MGIF de derivado benzotriazólico. São representadas as médias e erros padrão para cada dose, dados de 2 indivíduos saudáveis.

Após realização da dose-resposta foi escolhida a dose de 100 ng/mL para o estudo da cinética da produção de NO por monócitos e neutrófilos em resposta a r e sLPS.

### - Cinética

O estudo de cinética da produção de NO por monócitos e neutrófilos em resposta a r e sLPS foi feito com concentração de 100 ng/mL, incubados em sangue total. Houve redução expressiva do controle, acompanhada dos estímulos r e sLPS, ao longo do tempo. Porém, é possível ver que nos tempos de 15 e 30 min, tanto o r quanto o sLPS foram capazes de induzir resposta em monócitos (figura 5.26) e neutrófilos (figura 5.27), embora seja bem reduzida em relação à produção em resposta ao PMA (dado não mostrado).

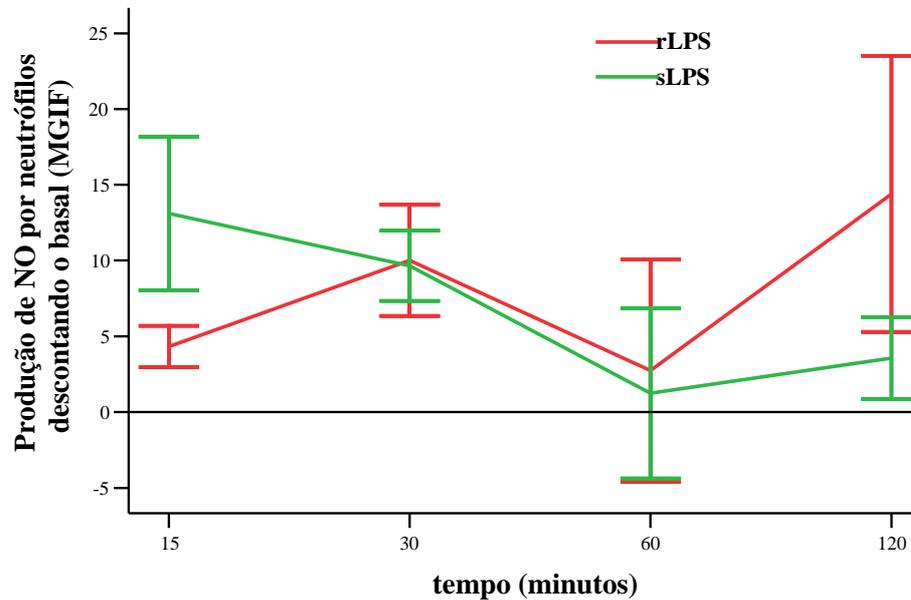


**Figura 5.26:** Cinética de produção de NO por monócitos induzida por r e sLPS. O sangue periférico foi incubado sem estímulo, com rLPS 100 ng/mL ou sLPS 100 ng/mL por 15, 30, 60 ou 120 min. No gráfico os valores são dados em diferença da produção em relação ao controle (a linha de referencia equivale à produção igual a do controle), em MGIF. São representadas as médias e erros padrão para cada dose, dados de 2 indivíduos saudáveis.

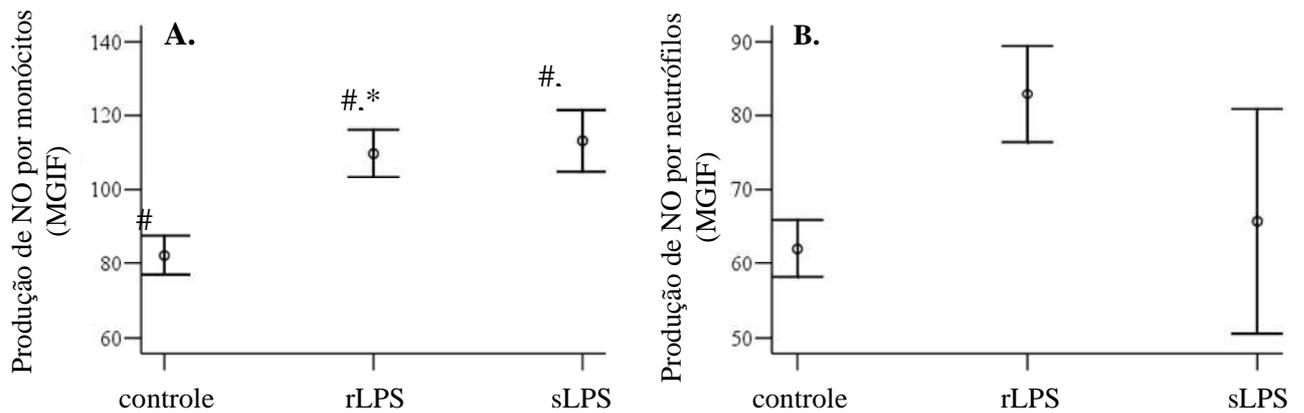
### - Produção de NO com 30 min e r e sLPS 100ng/mL

Para melhor compreensão do efeito de r e sLPS na produção de NO, foram feitos experimentos com 30 min de estimulação em diferentes condições de estímulo (sem estímulo, rLPS 100 ng/mL, sLPS 100 ng/mL ou PMA 1,35 ug/mL, figura 5.28). Foi possível observar diferença estatisticamente significativa quando os quatro grupos foram comparados entre si, tanto em monócitos ( $p < 0,01$ ) como em neutrófilos ( $p < 0,01$ ). A figura 5.28 mostra que a produção de NO foi estimulada por ambas as formas de LPS, havendo diferença na comparação entre os três grupos em monócitos ( $p = 0,02$ ), onde o pós-teste indicou diferença entre controle e rLPS ( $p = 0,024$ ) e entre controle e sLPS ( $p = 0,04$ ), porém não há diferença entre r e sLPS ( $p = 0,93$ ). Contudo, os estímulos r e sLPS não foram bons indutores desta resposta em neutrófilos, não

havendo diferença quando comparamos a produção de NO entre os grupos controle, r e sLPS ( $p=0,32$ ).



**Figura 5.27:** Cinética de produção de NO por neutrófilos induzida por r e sLPS. O sangue periférico foi incubado sem estímulo, com rLPS 100 ng/mL ou sLPS 100 ng/mL por 15, 30, 60 ou 120 min. No gráfico os valores são dados em diferença da produção em relação ao controle (a linha de referência equivale à produção igual a do controle), em MGIF. São representadas as médias e erros padrão para cada dose, dados de 2 indivíduos saudáveis.

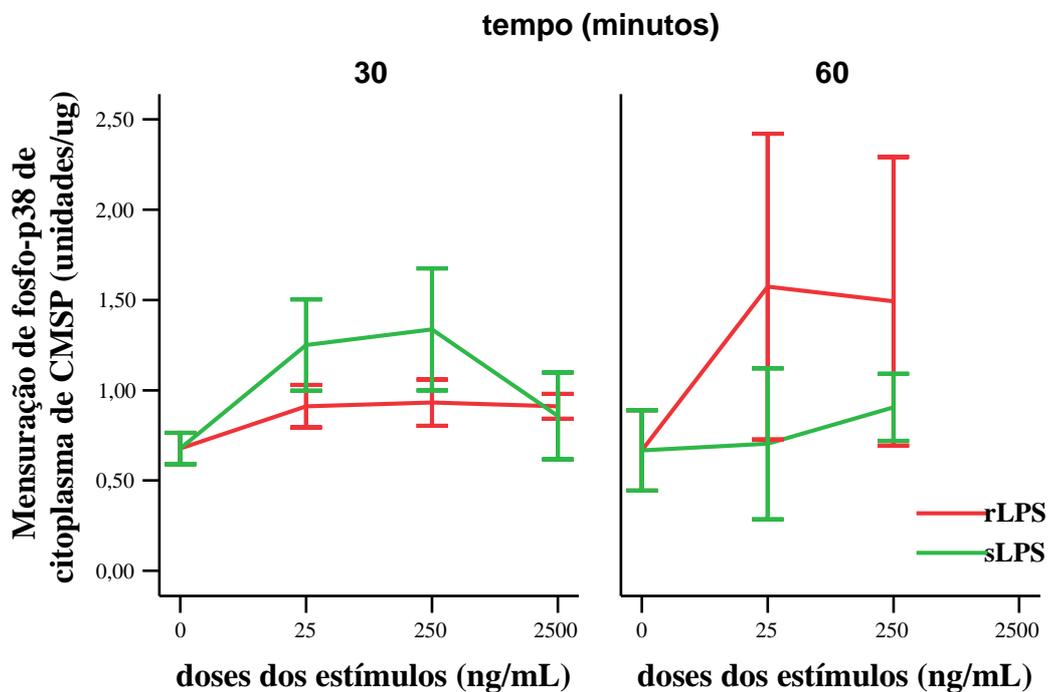


**Figura 5.28:** Produção de NO por monócitos (A) e neutrófilos (B) em diferentes condições de estímulo (sem estímulo (CT), rLPS 100 ng/mL ou sLPS 100 ng/mL) por 30 min. Nos gráficos os valores são dados como MGIF de derivado benzotriazólico. São representadas as médias e erros padrão para cada estímulo, dados de 4 indivíduos saudáveis. #  $p \leq 0,05$  comparando os grupos controle, r e sLPS (ANOVA),  $p \leq 0,05$  quando comparados os grupos controle e rLPS (\*) e controle e sLPS (▲) (teste de Tukey).

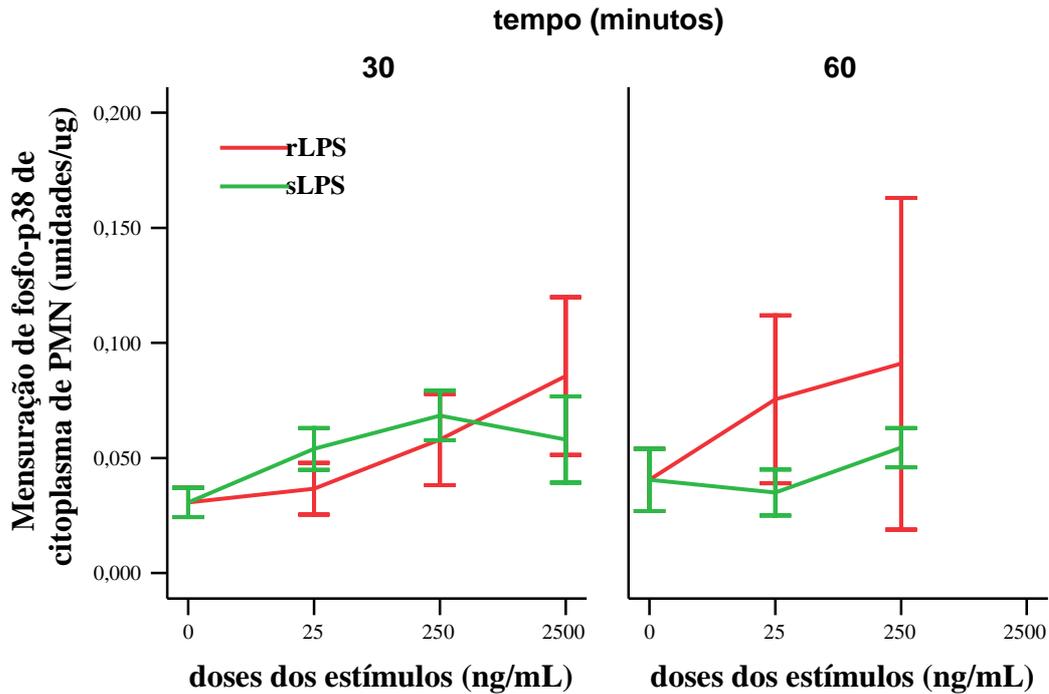
#### 5.4 Ativação de p38 detectada por *Citometric Bead Array (CBA) Flex Set* após estimulação de leucócitos com r e sLPS

O estudo de ativação de p38 em resposta aos estímulos de r e sLPS foi feito com 5 indivíduos saudáveis, com média de idade de 27 ( $\pm 6,2$ ) anos.

Foram feitas curvas de dose-resposta da produção de fosfo-p38 por CMSP e PMN com concentrações crescentes de LPS, com estímulos de 30 e 60 min (figuras 5.29 e 5.30, respectivamente). Pode ser observado aumento na fosforilação de p38 em ambas as células, nos dois tempos estudados, porém a dose-resposta nos neutrófilos com 30 min de incubação foi considerada melhor do que com 60 min.



**Figura 5.29:** Curva dose-resposta da mensuração de fosfo-p38 no citoplasma de CMSP induzida por r e sLPS. As CMSP foram incubadas com diferentes concentrações de r e sLPS (0; 25; 250; 2500 ng/mL) por 30 ou 60 min. Nos gráficos os valores são dados como unidades/ug de proteína. São representados médias e erros padrão para cada condição, obtidos de 4 indivíduos saudáveis.

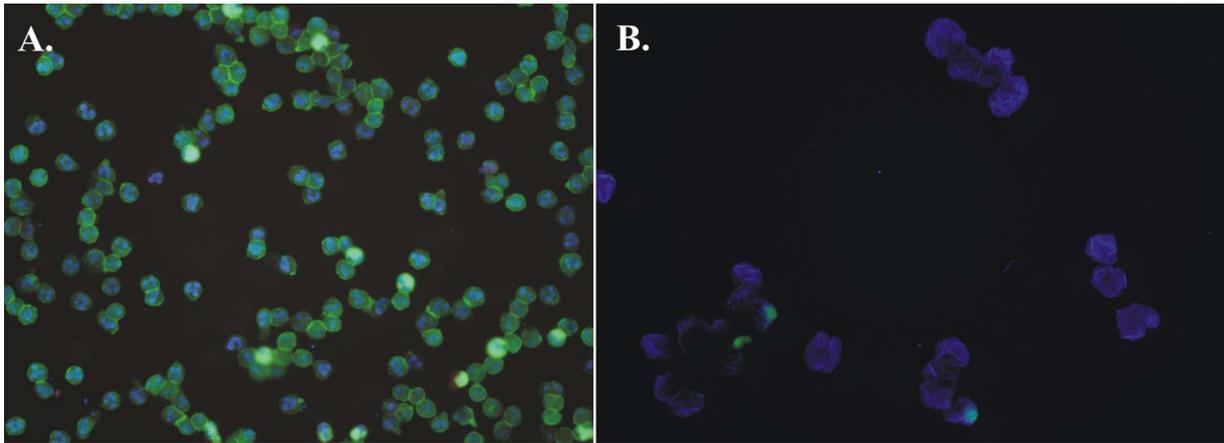


**Figura 5.30:** Curva dose-resposta da mensuração de fosfo-p38 no citoplasma de PMN induzida por r e sLPS. As PMN foram incubadas com diferentes concentrações de r e sLPS (0; 25; 250; 2500 ng/mL) por 30 e 60 min. Nos gráficos os valores são dados como unidades/ug de proteína. São representados médias e erros padrão para cada condição, obtidos de 4 indivíduos saudáveis.

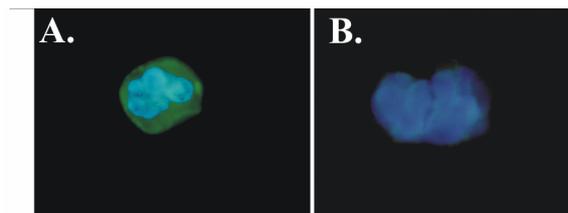
### 5.5 Translocação das subunidades de NFκB p50 e p65 para o núcleo após estimulação de PMN com r e sLPS

O estudo de ativação de NFκB em resposta aos estímulos de r e sLPS foi feito com 3 indivíduos saudáveis, com média de idade de 27 ( $\pm 4$ ) anos.

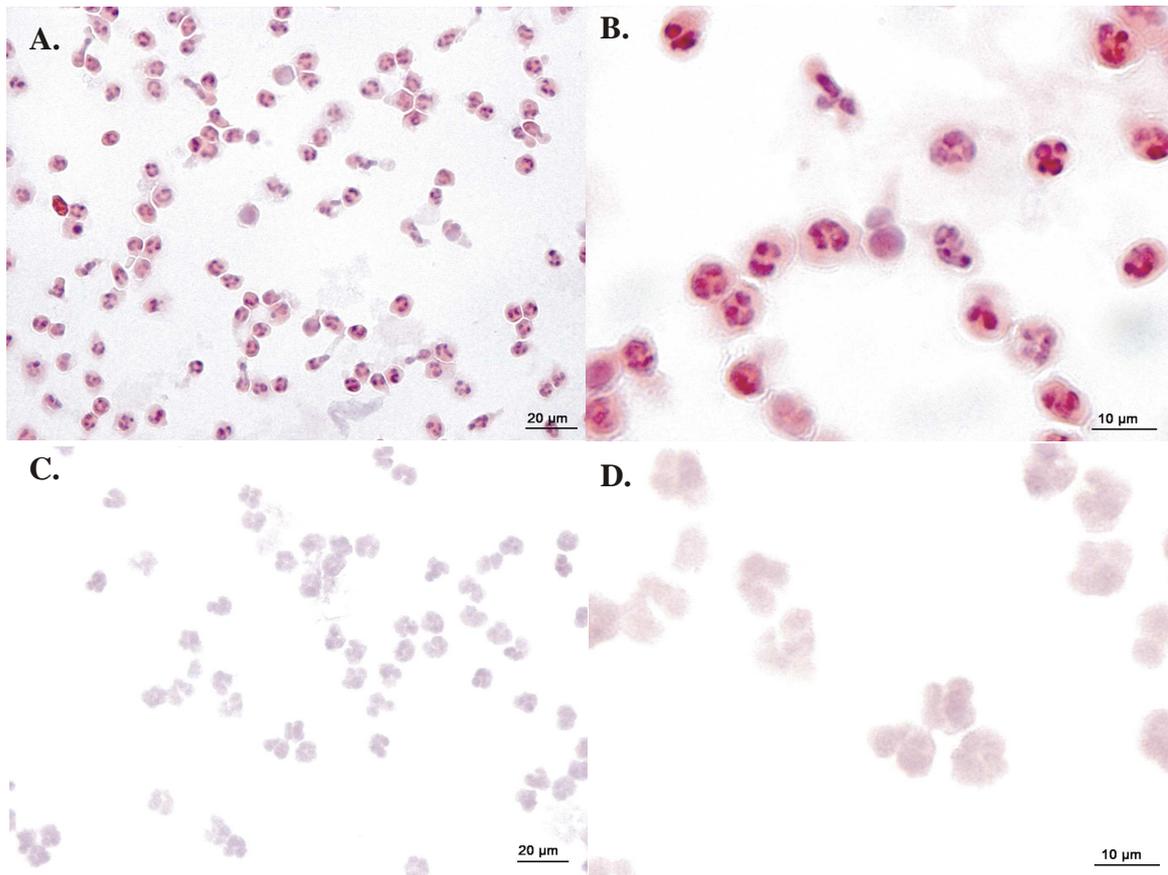
Foram feitos ensaios para a observação dos núcleos por microscopia de fluorescência (figura 5.31 e 5.32) e coloração por hematoxilina/eosina (HE) (figura 5.33). Para maiores detalhes das colorações ver o item 5 da seção Anexos.



**Figura 5.31:** Fotos de células íntegras (A) e núcleos separados (B) após marcação de actina em verde e DNA em azul. (A.) Após o cultivo, as PMN foram lavadas, permeabilizadas e marcadas com faloidina-FITC. Então, foram feitas lâminas através de centrifugação em centrífuga citológica e coloração com DAPI. (B.) Os núcleos foram isolados de acordo com o protocolo descrito na seção Métodos e incubados com faloidina-FITC. Depois, foram feitas lâminas e coloração com DAPI. É possível observar que a citocentrifugação parece prejudicar a integridade dos núcleos, porém, podemos notar que os mesmos foram isolados com sucesso. Fotos tiradas por Dr. Ricardo Bertolla, Laboratório de Reprodução Humana, UNIFESP.

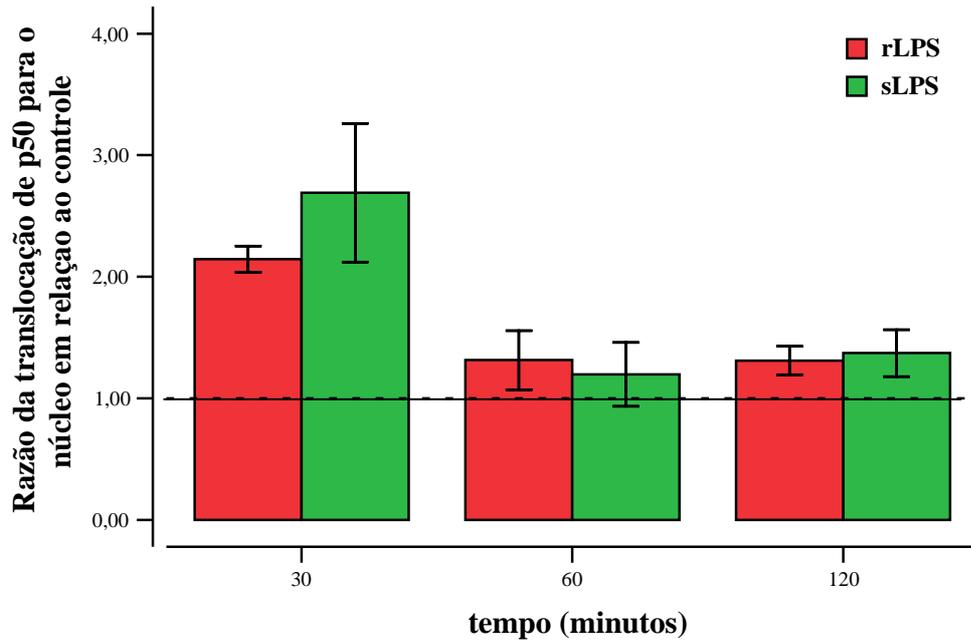


**Figura 5.32:** Fotos com maior aumento de célula íntegra (A) e núcleos separados (B) após marcação de actina em verde e DNA em azul. (A.) Após o cultivo, as PMN foram lavadas, permeabilizadas e marcadas com faloidina-FITC. Então, foram feitas lâminas através de gotejamento da suspensão de células e coloração com DAPI. (B.) Os núcleos foram isolados de acordo com o protocolo descrito na seção Métodos e incubados com faloidina-FITC. Depois, foram feitas lâminas e coloração com DAPI. É possível observar a integridade dos núcleos e seu isolamento com sucesso. Fotos tiradas por Dr. Ricardo Bertolla, Laboratório de Reprodução Humana, UNIFESP.

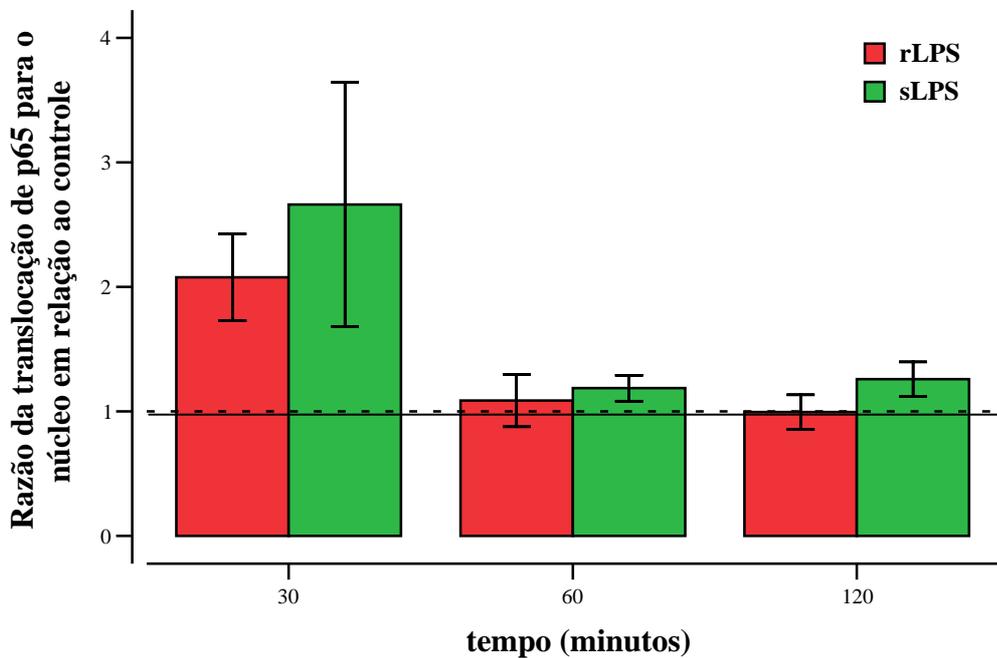


**Figura 5.33:** Fotos de células íntegras (A e B) e núcleos separados (C e D) após coloração com hematoxilina/eosina (HE). (A e B.) Após o cultivo, as PMNs foram lavadas e foram feitas lâminas através de centrifugação em centrífugas citológicas e coloração com HE. A primeira imagem é com objetiva de 40 e a segunda com objetiva de 100. (C e D.) Os núcleos foram isolados de acordo com o protocolo descrito na seção Métodos e foram feitas lâminas e coloração com HE. É possível observar seu isolamento com sucesso. Fotos tiradas por Pedro L. A. Scherholz, Disciplina de Histologia, UNIFESP.

Foram feitas curvas de cinética de translocação de p50 e p65 para o núcleo em PMNs com concentração de  $100 \text{ ng}/2 \times 10^6$  células de LPS, e incubações de 30, 60 e 120 min (figuras 5.34 e 5.35, respectivamente). A observação do gráfico mostra estimulação, tanto por r como sLPS, da translocação de p50 e p65 para o núcleo dos neutrófilos no tempo de 30 min, com decaimento do estímulo nos tempos posteriores.



**Figura 5.34:** Curva cinética de translocação de p50 para o núcleo de PMN induzida por r e sLPS. As PMN foram incubadas com  $100 \text{ ng}/2 \times 10^6$  células de r e sLPS por 30, 60 e 120 min. Nos gráficos os valores são dados em razão da expressão da proteína no núcleo em relação ao controle. São representados médias e erros padrão para cada condição, obtidos de 3 indivíduos saudáveis.



**Figura 5.35:** Curva cinética de translocação de p65 para o núcleo de PMN induzida por r e sLPS. As PMN foram incubadas com  $100 \text{ ng}/2 \times 10^6$  células de r e sLPS por 30, 60 e 120 min. Nos gráficos os valores são dados em razão da expressão da proteína no núcleo em relação ao controle. São representados médias e erros padrão para cada condição, obtidos de 3 indivíduos saudáveis.

## 6. *Discussão*

---

Trabalhos recentes<sup>(15, 70)</sup> mostraram que as formas R e S de LPS podem levar à sinalização via TLR4, dependente ou independente de CD14. Enquanto a sinalização a sLPS se restringe a TLR4 e CD14, foi demonstrado que a forma R pode sinalizar por via dependente ou independente da presença de CD14. Como muitas células do hospedeiro não possuem CD14 em sua superfície, o rLPS presente em bactérias mutantes ou na mistura de sLPS obtida de bactérias lisas, poderia representar um componente bacteriano com atividade biológica ampla.

Considerando a discrepância na expressão de CD14 na superfície de monócitos e neutrófilos, nós avaliamos se a bioatividade de LPS difere entre ambas as formas de LPS nestas células. Nossos resultados mostram que as formas R e S de LPS induzem respostas similares nos neutrófilos humanos.

Para isso, avaliamos a modulação induzida por LPS de um amplo espectro de receptores de superfície em monócitos e neutrófilos, envolvidos no reconhecimento bacteriano, quimiotaxia, e interações entre células, em sangue total, assim preservando o microambiente das interações *in vivo* entre LPS e células. Neste mesmo modelo de sangue total, vimos a produção de EROs e NO por neutrófilos. Também analisamos a expressão de alguns receptores e ativação de proteínas sinalizadoras em ambiente de células separadas.

A ativação das células em resposta a antígenos bacterianos depende de reconhecimento por diferentes receptores, como o TLR2 e TLR4, além do importante papel já mencionado do CD14.

A modulação de CD14, importante receptor na sinalização desencadeada pelo LPS, mostrou-se bifásica na superfície de monócitos, havendo aumento inicial até 30 min de incubação e tendência de equilíbrio aos 180 min, seguida de queda de até 60% nos tempos de 6 a 24 h. Outros autores observaram perfis diferentes de modulação, como Flo *et al.*<sup>(79)</sup>, onde a expressão de CD14 em monócitos humanos, obtidos de CMSP, após 120 min de estímulo com sLPS permaneceu inalterada. Diferente também de nossos dados, Moller *et al.*<sup>(80)</sup> mostraram que a expressão de CD14 foi modulada positivamente por LPS de *E. coli* de maneira dose dependente, sendo que com 4 h de incubação, com a dose de 10ng/mL (menor que a de nosso estudo), houve aumento da expressão deste receptor em monócitos de sangue total. Estas diferenças podem ser explicadas pelo modelo dos autores ou mesmo pela diferente origem de LPS. Em estudo de Landmann *et al.*<sup>(81)</sup>, feito com monócitos humanos isolados de CMSP, houve um padrão bifásico, com redução inicial (com tempos de 3 e 6 h de incubação, resultados similares ao do presente estudo) e um subsequente forte aumento (tempos de 24 e 44 h), na expressão de CD14 na superfície celular e mRNA de CD14. Em nosso estudo, ambas as formas

de LPS levam ao mesmo comportamento de modulação, sendo que o próprio LPS, ao levar a essas alterações, pode modular a resposta das células a ele mesmo e a outros produtos que usam o CD14 como padrão de reconhecimento.

Na superfície de neutrófilos a expressão de CD14 é quase inexistente, e não foi modulada pela presença de nenhuma das formas de LPS. Alguns autores afirmam que o CD14 está presente na membrana de 20 a 40% dos polimorfonucleares humanos<sup>(82, 83)</sup>, o que é contestado por nosso grupo, pois os valores de MGIF são muito baixos nestas células. Kurt-Jones *et al.*<sup>(84)</sup> relataram expressão de CD14 em PMN obtido de sangue total de humanos saudáveis, mas mencionam que em quantidade bem inferior que a vista em monócitos. Wagner *et al.*<sup>(85)</sup> mostram que a exposição de PMN humano em sangue total a baixas doses de LPS (0,1 a 1µg) resulta em aumento de expressão de CD14 na superfície de neutrófilos, em incubações de 20 min a 24 h. Outros autores mostraram modulação positiva de CD14 na superfície de neutrófilos por LPS<sup>(86-88)</sup>, porém nem todos os estudos mostram aumento de expressão<sup>(89)</sup>.

Dados anteriores na literatura são contraditórios a respeito da modulação da expressão de TLR4 por sLPS. Nossos dados mostram que a expressão de TLR4 foi modulada apenas no tempo de 6 h de incubação por rLPS, na superfície de monócitos, sendo que nos demais tempos estudados e nos neutrófilos a modulação não foi vista. Kurt-Jones *et al.*<sup>(84)</sup> observaram expressão diminuída de TLR4 na superfície de monócitos isolados de sangue total de indivíduos saudáveis após 2 h de estímulo com sLPS, e expressão menor ou indetectável em neutrófilos isolados antes e após o tratamento com sLPS. Estes dados contrastam em relação ao por nós obtidos em monócito, mas é condizente com os dados de neutrófilos. Husebye *et al.*<sup>(90)</sup> descreveram que na superfície de monócitos humanos separados de sangue de voluntários saudáveis, durante os períodos iniciais de incubação com sLPS, houve queda gradual da expressão de TLR4, acompanhada da formação de estruturas similares a endossomos contendo LPS marcado. Foi vista co-localização de sLPS e TLR4 em microdomínios nas membranas de endossomos após 1 h de estimulação. Porém, em nosso modelo de sangue total, a expressão de TLR4 se mantém inalterada em neutrófilos e só é estimulada com 6 h de incubação em monócitos. Estas diferenças vistas podem ser devido às técnicas de observação das células em sangue total versus separadas.

A expressão de TLR2 não foi modulada pela presença dos estímulos em monócitos ou neutrófilos em sangue total. Além disso, a expressão de TLR2 é menor que a de TLR4 em neutrófilos controles e estimulados (dado não mostrado), o que difere do relatado anteriormente em modelo de neutrófilos separados<sup>(91)</sup>. Neste mesmo estudo foi vista modulação negativa de TLR2 em resposta ao LPS após 1 h de estimulação, o que é diferente do visto por Flo *et al.*<sup>(79)</sup>,

em que a modulação ocorreu apenas em tempos mais longos (20 h). Muzio *et al.*<sup>(92)</sup> mostraram que LPS aumenta mRNA de TLR4, mas não de TLR2 em monócitos humanos.

A discreta modulação da expressão de TLR4 em monócitos e ausência de modulação de TLR2 em monócitos e neutrófilos por nós observadas em sangue total, além dos diferentes resultados relatados na literatura, ilustram que a modulação de TLR2 e TLR4 em monócitos e neutrófilos do sangue periférico por LPS não se dá de forma consistente. Diferentemente, a modulação na expressão de outros receptores como o CD14, CD66b, CD11 e CXCR2 é consistente.

Os receptores CXCR1 e CXCR2 têm um importante papel no recrutamento de granulócitos e monócitos para o sítio de infecção e ativação de mecanismos efetores antimicrobicidas destas células<sup>(93)</sup>. Nossos dados mostram queda de expressão estimulada por ambas as formas de LPS, com ação mais precoce do sLPS. Corroborando com nossos dados, estudos da literatura mostraram que sLPS leva a queda de expressão de CXCR1 e CXCR2 na superfície de neutrófilos separados. Khandaker *et al.*<sup>(94)</sup> mostram queda maior que 50% em 30 min em neutrófilos separados e queda menos acentuada após 1 h de estímulo, porém com redução não explicada pela presença de concentrações de IL-8, TNF- $\alpha$ , ou IL-1 $\beta$ . Juffermans *et al.*<sup>(95)</sup> relataram que administração *in vivo* de baixas doses de LPS induz a queda de ambos os receptores em granulócitos circulantes em sangue total de indivíduos saudáveis. Essa redução na expressão pode ser devido a uma tentativa de o hospedeiro limitar inflamação excessiva induzida por granulócitos no sítio de infecção. Porém, em estudo recente de Sabroe *et al.*<sup>(96)</sup>, embora o tratamento de neutrófilos com agonistas de TLR tenha reduzido a expressão de CXCR1 e CXCR2, os receptores que permaneceram ainda eram funcionalmente competentes.

Ambas as formas de LPS levaram à grande indução de CD66b na superfície de neutrófilos, sendo que a forma S foi um pouco mais precoce nesta indução. A modulação de CD66b, molécula de selectina, é muito importante no processo de adesão das células ao endotélio, para sua posterior migração para os tecidos. Não encontramos estudos na literatura que tenham feito modulação deste receptor na superfície de neutrófilos em resposta a LPS. A ação induzida pelo LPS de regulação positiva de CD66b mostra que as células estudadas ao serem ativadas por tal antígeno podem migrar para os tecidos, onde poderão desempenhar seu papel de defesa na imunidade inata. A forma S de LPS mostrou atividade mais precoce neste aumento de expressão de CD66b.

As  $\beta$ 2 integrinas medeiam a adesão firme à membrana celular do endotélio, possibilitando a passagem dos leucócitos através da parede vascular<sup>(97)</sup>, além de possuírem outras

funções como, por exemplo, de receptor (ligando fragmentos de fatores de complemento e de coagulação), aumento de atividade fagocítica e reconhecimento e ligação de certos antígenos<sup>(36, 98)</sup>. A expressão de CD11b foi regulada positivamente em monócitos e neutrófilos por ambas as formas de LPS, e novamente a forma S mostrou ação mais precoce em neutrófilos. A queda vista na superfície de monócitos nos tempos posteriores a 6 h de incubação pode ser devido a clivagem ou internalização do receptor. Estudo utilizando neutrófilos de camundongos TLR4<sup>-/-</sup> mostraram um papel crucial da ligação de LPS a TLR4 na mediação do aumento de CD11b e assim na regulação da atividade microbicida de neutrófilos<sup>(99)</sup>, e que este processo requer transcrição de CD11b. Os mesmos autores sugerem que TLR4 é capaz de amplificar a resposta ao LPS através de aumento de CD11b. Estudos anteriores mostraram que monócitos humanos expressam tanto CD11a quanto CD11b em resposta a sLPS, enquanto que PMNs aumentam CD11b, mas não CD11a, em resposta ao mesmo estímulo<sup>(100, 101)</sup>. Marsik *et al.*<sup>(102)</sup> também observaram aumento de expressão de CD11b em monócitos e neutrófilos até pelo menos 6 h após a injeção endovenosa de sLPS em voluntários saudáveis. Haugen *et al.*<sup>(103)</sup> estudaram a expressão de CD11a, CD11b e CD11c em resposta a LPS (100ng/mL) em monócitos e neutrófilos do sangue periférico, e viram que aumento inicial de CD11b próximo a 1 h de estímulo, seguido de decréscimo até 6 e 24 h de estímulo. Nossos dados diferem deste, pois vimos o maior aumento com 6 h, e então queda da expressão deste receptor.

As moléculas de CD11c são mais expressas em monócitos, e parecem importantes na mediação de vários tipos de interação adesiva destas células<sup>(104)</sup>, apesar de o receptor CD11b, em heterodímero com CD18, ser mais expresso nestas células. Tal molécula possui um papel bem menos expressivo neste tipo de função em neutrófilos. Nossos dados indicam aumento não significativo de expressão de CD11c na superfície de monócitos e neutrófilos em resposta a ambas as formas de LPS, mais evidenciado no tempo de 3h de incubação. Citando novamente o estudo de Haugen *et al.*<sup>(103)</sup>, a expressão de CD11c se mostrou máxima em resposta ao LPS com 6 h de incubação, com queda posteriormente. Haughen *et al.*<sup>(103)</sup> mostraram máxima expressão de CD11c depois de 6 h de incubação com sLPS, seguida de queda.

A modulação de CD11b, assim como a de CD66b e CD11c, tem papel central na adesão das células ao endotélio e migração. Assim, as células estudadas ao serem ativadas pelo LPS podem migrar para os tecidos, onde desempenham seu papel de defesa na imunidade inata. A ativação de moléculas utilizadas na adesão e migração de leucócitos por LPS evidencia que tal antígeno é muito importante no processo inflamatório causado pela infecção bacteriana. É interessante notar que a modulação positiva de CD14 acompanha a modulação positiva de

CD11b e CD11c até 60 min de incubação, e depois passa a ser negativa. No início da resposta o reconhecimento e adesão parecem ter a mesma importância, e após 60 min o foco da resposta celular parece estar na adesão.

As discrepâncias entre os dados encontrados pelos diferentes autores em relação à expressão de receptores de superfície podem ser devido a diferenças nas condições de incubação, seleção de anticorpo e metodologia de dosagem de expressão aplicada por cada grupo.

A presença de r e sLPS levaram à indução da expressão de HLADR na superfície de monócitos. Molécula pertencente à classe II do MHC humano está presente nas células profissionais de apresentação de antígenos aos linfócitos T auxiliares, desencadeando a resposta adaptativa e proliferação<sup>(105, 106)</sup>. McLeish *et al.*<sup>(107)</sup> mostraram que o nível de HLADR na superfície de monócitos reflete o status de ativação dos mesmos e aumenta com uma variedade de estímulos, incluindo o LPS. A ativação por ambas as formas de LPS mostra que as duas conseguem levar à ativação destas células de forma similar, no tempo de 180 min, e eliciar a resposta adaptativa.

Nossos dados de receptores em monócitos de sangue total se encontram similares a estudos anteriores de nosso laboratório desenvolvidos com sangue de pacientes sépticos. Brunialti *et al.*<sup>(108)</sup> mostraram que não foi observada diferença de expressão de TLR2, TLR4 e CD11c em monócitos entre os grupos de pacientes e sadios, sendo que também não observamos diferença estatística destes mesmos receptores entre os monócitos não estimulados e estimulados. Os mesmos autores viram redução de expressão de CD14 nos monócitos de indivíduos sépticos, e aumento de expressão de CD11b no grupo de sepse em relação aos voluntários sadios. Nossos dados indicam queda na expressão de CD14 por monócitos estimulados com r ou sLPS após 180 min de incubação, além de mostrarem clara indução da expressão de CD11b por estes estímulos. Assim, podemos considerar que o modelo de resposta de monócitos em sangue total a LPS reproduziu bem o que foi visto em respostas de indivíduos sépticos. Em neutrófilos, Martins *et al.*<sup>(109)</sup> não viram modulação de CD11c, mas mostraram aumento de CD66b no grupo de pacientes em relação aos sadios. Porém, mostraram que a expressão de TLR2 em neutrófilos de pacientes em choque séptico estava diminuída em relação aos sadios e não viram diferença entre os grupos para CD11b. Assim, nossos dados em neutrófilos diferiram parcialmente do que foi observado modulado em neutrófilos de sépticos, pois não vimos modulação de TLR2, e observamos aumento de CD11b. Esta discrepância pode ser resultado de interações mais complexas que ocorrem no indivíduo séptico, assim como de maior heterogeneidade do tempo que as células destes indivíduos estejam sendo estimuladas *in*

*vivo*, já que os critérios de inclusão de pacientes são baseados em repercussões clínicas, presentes por até 48h.

Outras respostas a LPS podem ser estudadas além de modulação de receptores de superfície, entre as quais a produção de citocinas, EROs e NO e estimulação de proteínas sinalizadoras. Fizemos tentativas de detecção de citocinas produzidas por neutrófilos, porém, não conseguimos detectá-las (observar Anexo 4).

Os monócitos e neutrófilos apresentaram ensaios de dose-resposta com boa produção de EROs em sangue total, sendo que a melhor produção foi vista em neutrófilos. Já nos ensaios de cinética, os resultados apresentaram pouca consistência. Na maioria dos tempos a ativação esperada não foi vista ou foi fraca em resposta às formas de LPS, porém vimos estímulo por *S. aureus* (dado não apresentado), indicando que o teste estava funcionando. Nos tempos de 15 e 30 min pudemos observar certo aumento de produção de EROs por neutrófilos, representando razoável reprodutividade em relação ao ensaio de dose-resposta, porém, sem diferença de ativação entre as formas de LPS. Myhre *et al.*<sup>(110)</sup> sugerem que o DCFH é sensível à oxidação por ONOO<sup>-</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (em combinação com peroxidases celulares), peroxidase e íon hidroxila, enquanto não é bom para a mensuração de NO, HOCl ou íon superóxido em sistemas biológicos. Também afirmam que o íon hidroxila e ONOO<sup>-</sup> podem ser os únicos a oxidar DCFH em segundos ou minutos, em pequenas quantidades, enquanto os outros oxidantes precisam de concentrações e tempos maiores, sugerindo que vários métodos precisam ser utilizados para identificação das EROs produzidas em sistemas biológicos. Liaudet *et al.*<sup>(111)</sup> mostraram que o LPS de *Salmonella enterica senovar* induziu pequeno estresse oxidativo, enquanto Munakata *et al.*<sup>(112)</sup> mostraram produção de superóxido por neutrófilos com LPS de *E. coli* na concentração de 1ng/mL. Kapp *et al.*<sup>(16)</sup> viram que o rLPS (e não o sLPS) foi capaz de ativar significativamente os neutrófilos, utilizando detecção de superóxido. Ruchaud-Sparagano *et al.*<sup>(113)</sup> observaram que tanto r quanto sLPS induziram a liberação de superóxido por neutrófilos com 15 e 30 min de incubação. Assim, a pequena resposta por nós observada pode ser devido ao método utilizado para mensuração indireta da produção de EROs, uma vez que o DCFH não detecta superóxido. O mesmo foi observado por Chandel *et al.*<sup>(114)</sup>, que não viram produção de EROs em resposta a LPS utilizando DCFH. Além disso, não observamos diferença entre a produção estimulada por r ou sLPS.

A produção de NO foi observada através de um reagente chamado DAF-FM, que é capaz de detectar NO e NO<sub>2</sub><sup>-</sup> (produzido por oxidação espontânea de NO). O que observamos foi uma curva dose-resposta bem razoável para neutrófilos e monócitos e cinética com produção em

resposta a sLPS com estimulações de 15 e 30 min, embora estas produções tenham sido bem menores que a em resposta ao PMA (dado não mostrado), tanto em monócitos quanto em neutrófilos. Quando foi feita a análise estatística, observamos indução na produção de NO por monócitos com 30 min de estimulação, enquanto que não foi vista diferença em neutrófilos em sangue total. Observamos que em alguns experimentos foi possível ver produção clara de NO por neutrófilos, enquanto outros não permitiam, mostrando que a variação de resposta foi responsável pela ausência de significância estatística. Kim & Kim<sup>(66)</sup> mostraram que 1 ug/mL de LPS levou à expressão de iNOS e produção de NO em linhagem de células fagocíticas com estimulação de 2, 5 ou 10 h. Gagnon *et al.*<sup>(115)</sup> mostraram produção de peroxinitrito em granulócitos e monócitos em tempos tardios (4 a 24 h) depois da adição de LPS a sangue total. Klink *et al.*<sup>(116)</sup> não viram estimulação da produção de NO por neutrófilos humanos em resposta a nenhuma das formas de LPS estudadas (S, Ra e Re), independente da dose ou tempo de cultura utilizados. Assim, nossos dados diferem parcialmente dos citados, pois vimos produção de NO apenas nos tempos inferiores a 30 min, e esta produção não foi em nível elevado como era esperado.

Quando observamos a fosforilação de p38 e translocação de p50 e p65 para o núcleo, vimos que as formas R e S de LPS levaram à ativação das células, porem sem diferença entre si. Foram vistas melhores ativações em tempos precoces de estimulação, até 30 min. Percebemos também que nos neutrófilos a translocação basal de p65 é mais alta, e conseqüentemente a estimulada também. A ativação de p38 leva a várias respostas, como a produção de citocinas<sup>(117)</sup>, redução da expressão de CXCR2<sup>(118)</sup>, ativação e translocação de NFκB para o núcleo<sup>(119)</sup>, produção de EROs<sup>(120)</sup>, entre outras importantes funções. Assim, esperávamos que a ativação de p38 ocorresse em resposta ao LPS. A translocação de NFκB para o núcleo não é menos importante, uma vez que a via de resposta do TLR4 depende em grande parte deste fator de transcrição. A ativação de NFκB leva à produção de citocinas<sup>(121)</sup>, de NO e EROs<sup>(122)</sup>, e basicamente todas as respostas apresentadas pelas células após estímulo do TLR4. Outros autores mostraram a ativação de NFκB por neutrófilos em resposta a sLPS, de forma bifásica, com ativação com picos em torno de 30 min<sup>(123-125)</sup> e 9h de incubação<sup>(124)</sup>, e ativação de p38 em resposta a sLPS com resposta máxima entre 20 e 25 min<sup>(126)</sup>, corroborando com a ativação após 30 min vista em nosso estudo. Nossos dados são os primeiros a demonstrar esta ativação em neutrófilos em resposta a r e sLPS.

Apesar de os neutrófilos serem células largamente responsáveis pela fagocitose, o que geraria uma grande produção de EROs, estudos atuais indicam que a função dos EROs

produzidas por tais células em resposta ao LPS podem ter função sinalizadora, não apenas efetora<sup>(127)</sup>, o que pode explicar também a pouca/falta de produção observada no presente estudo. Uma sugestão é a de que as EROs produzidas intracelularmente levam à ativação de quinases e então de NFκB<sup>(128, 129)</sup>. Chandel *et al.*<sup>(114)</sup>, porém, mostram que o LPS não aumentou a sinalização oxidativa em um período de 2h, que seria o suficiente para eliciar a resposta de NFκB, em um sistema que não permitia o acúmulo de citocinas. Os mesmos autores testaram então exposições mais prolongadas (12-18h) em um sistema estático, e observaram que houve aumento na produção de EROs, que foi considerada por eles como efeito autócrino ao TNF-α (a produção foi abolida por anticorpos neutralizantes anti-TNF-α). Tais autores afirmam que o LPS não induz EROs, mas a indução de TNF-α provocada por ele, ativa o complexo III da cadeia transportadora de elétrons presente nas mitocôndrias. Porém, é interessante ressaltar que o método de detecção de EROs por eles utilizado foi o mesmo que por nós, assim não detectavam superóxido. Ndengele *et al.*<sup>(130)</sup> mostraram que superóxido potencializa a ativação de NFκB e modula a produção de citocinas em resposta ao LPS por macrófagos alveolares. Assim, na verdade a ERO mais pronunciado em resposta a LPS seria o superóxido, este tendo funções mais ligadas à destruição direta dos patógenos. É bem estabelecido que a atividade de NADPH oxidase seja regulada por fosforilação em células fagocíticas<sup>(131)</sup>. Fosforilação de p47phox estimula a interação com p67phox, e o complexo formado se dirige à gp91phox (Nox2) localizada na membrana plasmática para levar à ativação de NADPH oxidase. Em estudo de Park *et al.*<sup>(131)</sup>, os autores demonstraram uma interação direta de TLR4 com Nox4 sendo essencial para a geração de ativação de NFκB em células HEK293T. Este mecanismo pode estar presente também nas células fagocíticas em estudo, sendo importante estudos mais detalhados sobre a formação e quais EROs estão presentes em resposta aos diferentes tipos de LPS, para maior entendimento da ação destes oxidantes na sinalização em resposta ao LPS. A baixa ou inconsistente produção de NO por neutrófilos pode ser por desvio de sua via para a produção de peroxinitrito, mas também, pode ser a um papel do NO sinalizador e não efetor nestas células diante do estímulo com LPS.

É importante ressaltar que além da transcrição induzida em resposta a LPS, existe também grande regulação pós-transcricional dos genes que pode ser induzida em resposta ao mesmo estímulo. Estudos mostram que esta regulação pós-transcricional pode envolver NFκB, assim como EROs e NO<sup>(121)</sup>.

Os resultados obtidos quanto a expressão de receptores na superfície celular em sangue total não apóiam nossa idéia inicial de que o rLPS poderia induzir maior resposta que o sLPS em

neutrófilos. Ao invés, foi vista ativação mais precoce de alguns receptores em neutrófilos em resposta a sLPS. Os experimentos foram feitos em sangue total, então proteínas do soro/plasma poderiam interagir com as células, além de poder haver interação entre as células. Na verdade, Hailman *et al.*<sup>(132)</sup> e Soler-Rodriguez *et al.*<sup>(133)</sup> mostraram que a ativação de neutrófilos e macrófagos requer a presença de soro como fonte de LBP. Troelstra *et al.*<sup>(134)</sup> mostraram que o efeito de sCD14 nas respostas de neutrófilos ao LPS é um equilíbrio entre ativação e inibição, dependendo da concentração de soro ou LBP. Além disso, foi mostrado que as respostas de neutrófilos ao LPS são dependentes da presença de monócitos<sup>(91)</sup>. Assim, encontramos que diferentes concentrações de plasma afetaram a resposta de monócitos e neutrófilos a r e sLPS, mostrando um papel das proteínas plasmáticas para ambos os tipos de LPS, mas vimos resposta das células em ausência de plasma, mesmo que em menor intensidade. Também observamos que os monócitos parecem afetar os neutrófilos. Quando vimos os receptores em modelos de células separadas, oferecendo soro AB para as células, não conseguimos observar ativação consistente na resposta de receptores a ambos os tipos de LPS. Porém, observamos a ativação de proteínas sinalizadoras neste modelo, mesmo na ausência de soro AB, mostrando que as células estavam respondendo aos estímulos, mesmo que de forma diferente da resposta de sangue total. Tais diferenças podem ocorrer pela manipulação das células, ou pela diferença em relação aos ambientes de estímulo. Ruchaud-Sparagano *et al.*<sup>(113)</sup> viram que r e sLPS levaram a ativação funcional similar de neutrófilos isolados com 30 min de ativação, implicando que tanto r quanto sLPS poderiam se ligar a neutrófilos e induzir sinalização intracelular, porém o sLPS pareceu ineficiente no tempo de 15 min.

Assim, sugerimos que outras proteínas de membrana possam ser a ponte entre sLPS e TLR4, podendo ser o próprio CD11b ou L-selectinas<sup>(113)</sup>. Segundo esta hipótese, podemos dizer que a resposta mais precoce a sLPS que a rLPS vista se deve ao próprio aumento de CD11b ou de selectinas, uma vez que são modulados positivamente e precocemente na superfície de neutrófilos. A falta de diferença na resposta de neutrófilos a ambas as formas de LPS vista por Ruchaud-Sparagano *et al.*<sup>(113)</sup> com 15 min de incubação levou tais autores à hipótese de que a glicosilação do LPS pode influenciar em sua interação com os neutrófilos, tendo receptores que não o CD14 envolvidos na ativação, como, por exemplo, a L-selectina<sup>(113, 135)</sup>. Embora diferenças na solubilidade possam contar para diferentes respostas dos neutrófilos aos LPS, foi demonstrado que a L-selectina se liga especificamente a carboidratos presentes no polissacarídeo O<sup>(135)</sup> e alterações neste polissacarídeo podem ter papel adicional na atividade da L-selectina como receptor de LPS. Vimos também possíveis interações de proteínas do soro/plasma com as células no experimento de diferentes porcentagens de plasma, porém quando fornecemos soro AB em

sistema de células separadas não observamos ativação de neutrófilos nem diferença de resposta entre r e sLPS. Ruchaud-Sparagano *et al.*<sup>(113)</sup> dizem que as diferenças de carboidratos entre as formas de LPS poderiam atenuar a transferência de LPS da LBP para os receptores na superfície dos neutrófilos.

Em resumo, os dados sobre receptores por nós obtidos mostram que as formas R e S de LPS ativam de forma semelhante os neutrófilos de sangue periférico de indivíduos saudáveis, apesar da expressão reduzida de CD14 em sua superfície. Em alguns casos o sLPS pareceu ter função mais precoce nos neutrófilos, o que pode ser devido à sua sinalização por outro receptor enquanto que o rLPS interagiria diretamente com o TLR4, ou por sua apresentação mais precoce à essa células pelas proteínas do soro/plasma. Este dado contradiz a expectativa de resposta diferenciada ao LPS, baseada na indução de ativação celular de forma CD14 dependente (formas R e S de LPS) e CD14 independente (forma R de LPS). Consideramos a hipótese da utilização de outro receptor de reconhecimento de LPS nestas células, igualmente ativado por rLPS e sLPS.

Nosso trabalho é completo do ponto de vista de observação de respostas celulares ao r e sLPS. Vimos que os neutrófilos, em linhas gerais, não responderam de forma mais acentuada ao rLPS como era esperado em nossa hipótese. Inclusive, em dados de receptores, em alguns casos, o sLPS teve ação mais precoce. Estudo recente publicado por Tamassia *et al.*<sup>(136)</sup>, os autores descreveram que os neutrófilos não são capazes de mobilizar a via independente de MyD88 quando estimulados via TLR4. Isto ajudaria a explicar os casos em que a resposta às duas formas de LPS foi a mesma, pois caso o sLPS consiga interagir com neutrófilos através de outro receptor que não o CD14 ou através de sua ligação com proteínas do plasma/soro e posteriormente com as células, ambos levariam à mesma resposta. No estudo de Ruchaud-Sparagano *et al.*<sup>(113)</sup>, os autores viram que embora as formas R e S de LPS tenham induzido a liberação de superóxido por neutrófilos depois de 15 min, um claro efeito diferente foi visto na polarização, adesão e produção intracelular de espécies oxidantes, porém com o sLPS não foi observado efeito com 15 min, o que difere de nossos dados. Não entendi. Ambas as formas causaram o mesmo grau de ativação com 30 min, implicando que tanto r quanto sLPS sejam capazes de se ligar à superfície de neutrófilos. Klink *et al.*<sup>(116)</sup> acharam que as formas S, Ra e Re de LPS de *Proteus mirabilis* induziram liberações similares de TNF- $\alpha$ , e, em contraste, não foram capazes de induzir a produção de NO, o que vem de acordo com os resultados por nós apresentados.

Triantafilou *et al.*<sup>(137)</sup> mostraram que tanto a forma R como a S de LPS marcadas com fluoresceína exibem ligações dependente e independentes de CD14/LBP, que são influenciadas

pela concentração de LPS. Desta forma não podemos descartar que uma possível interação entre as formas de LPS e células em um estudo *in vivo* venham a produzir resultados diferentes dos por nós aqui apresentados, mas podemos reafirmar que embora tenha sido descrito por Jiang *et al.*<sup>(70)</sup> e Huber *et al.*<sup>(15)</sup> que apenas o rLPS agiria de forma independente de CD14, o sLPS é capaz de interagir e produzir resposta em neutrófilos humanos, que são células com baixa expressão de CD14 na superfície.

## *7. Conclusões*

---

Nosso trabalho abordou de forma abrangente a modulação de receptores de superfície em células de sangue total em resposta a r e sLPS, e concluímos que ambos os estímulos levaram a padrões semelhantes de respostas por neutrófilos e monócitos. Os monócitos apresentaram modulação bifásica de CD14 aos antígenos estudados, enquanto houve aumento de expressão de CD11b tempo-dependente. Vimos certa modulação tardia de HLADR e pouca ou nenhuma modulação de TLR2 e TLR4. Assim, no início da resposta o reconhecimento e adesão parecem ter a mesma importância, e após 60 min o foco da resposta celular parece estar na adesão.

Nos neutrófilos observamos que os receptores apresentaram comportamento heterogêneo, sendo que CD66b e CD11b apresentaram elevação tempo-dependente, enquanto o CXCR2 teve decréscimo de sua expressão. Novamente, aparecem indícios de que quando o antígeno é reconhecido e a célula chega ao local de ação, a adesividade e ativação passam a ser mais importantes. Observamos também que o sLPS mostrou atividade mais precoce nos neutrófilos, o que ocorreu em parte pela presença de proteínas do soro/plasma e interação entre as células, mas mais provavelmente pela possibilidade de outro receptor ser responsável pelo reconhecimento do sLPS.

Observamos ativação de sinalização celular semelhante em resposta a ambos os LPS, com sugestão de precocidade, novamente, em resposta a sLPS por neutrófilos.

A produção de espécies reativas de oxigênio e de óxido nítrico foram observadas em pequena escala por neutrófilos em resposta a r e sLPS, o que sugere que estes produtos estejam sendo consumidos rapidamente ou que possuam papel sinalizador e não efetor.

Em sùmula, os monócitos, como esperado, responderam similarmente a ambos os tipos de LPS. Os neutrófilos também responderam a ambos os tipos, o que era rejeitado por nossa hipótese inicial, apesar da expressão reduzida de CD14 em sua superfície, sugerindo que outros receptores possam estar envolvidos na sinalização celular. Foi visto também que há interação entre monócitos e neutrófilos e proteínas presentes no plasma, o que parece suprir parcialmente a falta de CD14 na superfície dos neutrófilos.

## *8. Anexos*

---

## 1. Dosagem de EROs com sangue total sem diluição

### - Padronização do protocolo

Inicialmente foi realizado um teste com o protocolo pré-existente, alterando-se o volume final do sangue, que anteriormente era diluído, com intenção de ser mais similar ao protocolo de mensuração de expressão de receptores. Foram feitas marcação com CD14 para identificação de monócitos, lise hipotônica e os estímulos eram *S. aureus*, rLPS, sLPS e PMA. No entanto, ao final do experimento, a visualização dos resultados não foi satisfatória, uma vez que as populações celulares não podiam ser claramente diferenciadas. Assim, foi feito um teste com diferentes soluções de lise.

As lises testadas foram: a lise hipotônica, a solução de lise comercializada pela Becton Dickinson (BD™) e a lise com cloreto de amônio, utilizando o mesmo protocolo do passo anterior. Os resultados obtidos revelaram que a lise da BD™ era a mais satisfatória. Em seguida, foi feito um teste para determinar o tempo necessário de exposição das células ao DCFH-DA, bem como sua influência estando diluído (0,3 mM) ou concentrado (12 mM), lembrando que nos dois casos a concentração final no tubo era 0,6 mM. Foi observado que a melhor detecção de DCF ocorria quando o DCFH-DA a 0,3 mM era adicionado nos últimos 5 min de incubação. Ainda nesse experimento, o método dos resultados foi discutido no que diz respeito à média geométrica da intensidade de fluorescência e percentual de células migradas.

Em seguida, foi realizado um teste de marcação de superfície em ambiente gelado, já que o uso do gelo seria melhor para a confiabilidade do experimento. A marcação de células positivas para CD14 foi satisfatória.

Após estas alterações, foi feito um teste com as mudanças feitas na técnica, ou seja, com a lise da BD™, com o DCFH-DA diluído (0,3 mM) nos últimos 5 min de estímulo e com a marcação de CD14 no gelo. Os resultados acerca da técnica foram satisfatórios. Assim, os testes de dose-resposta e cinética foram efetuados.

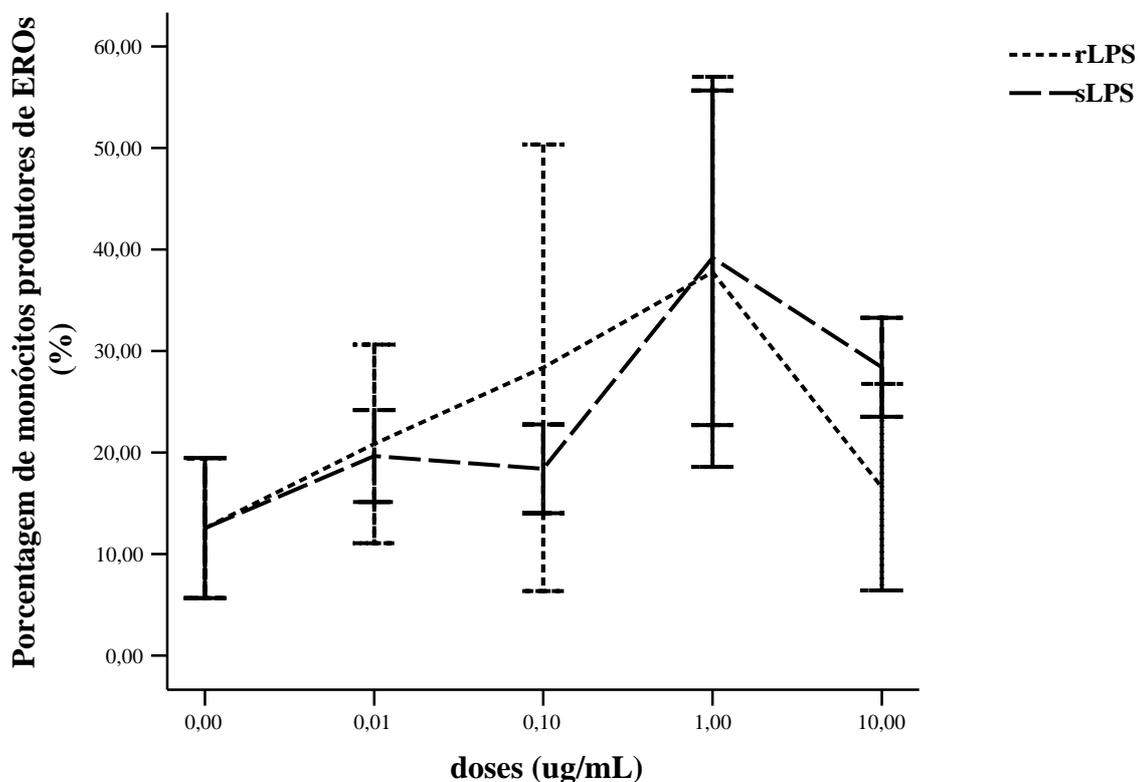
### - Dose-resposta

Cem microlitros de sangue heparinizado foram distribuídos em tubos de polipropileno de 5mL que posteriormente receberam um estímulo cada (rLPS ou sLPS nas concentrações de 0; 0,01; 0,1; 1 e 10 ug/mL, ou *S. aureus*  $2 \times 10^9$  células/mL). Os tubos foram incubados em banho-maria a 37°C sob agitação por 15 min. Foram acrescentados, cinco minutos antes do término da incubação, 200 uL de DCFH-DA 0,3 mM por tubo.

Dado o tempo de incubação, os tubos foram retirados e colocados no gelo. Feito isso, adicionou-se 2 mL de EDTA 3 mM por tubo para parar a reação. Os tubos foram centrifugados a

250 x g por 5 min a 4°C. Os sobrenadantes foram descartados, em seguida foram acrescentados 2 mL de solução de lise BD<sup>TM</sup> e os tubos incubados durante 10 min em temperatura ambiente para lise das hemácias. Após isso, os tubos foram centrifugados novamente e os sobrenadantes desprezados.

Foram acrescentados 2 mL de PBS por tubo, e o conteúdo dos tubos transferidos para tubos de citometria. Após centrifugação, os sobrenadantes foram descartados. Os botões celulares foram incubados com 8 uL de CD14 PE e deixados por 30 min no escuro e no gelo. Posteriormente, foram acrescentados 2 mL de PBS e feita nova centrifugação. Após descarte dos sobrenadantes, as amostras foram suspensas em 0,3 mL de EDTA 3 mM em cada tubo e estas foram mantidas em gelo até a leitura em citômetro de fluxo, como descrito no item 4.1.5.1.

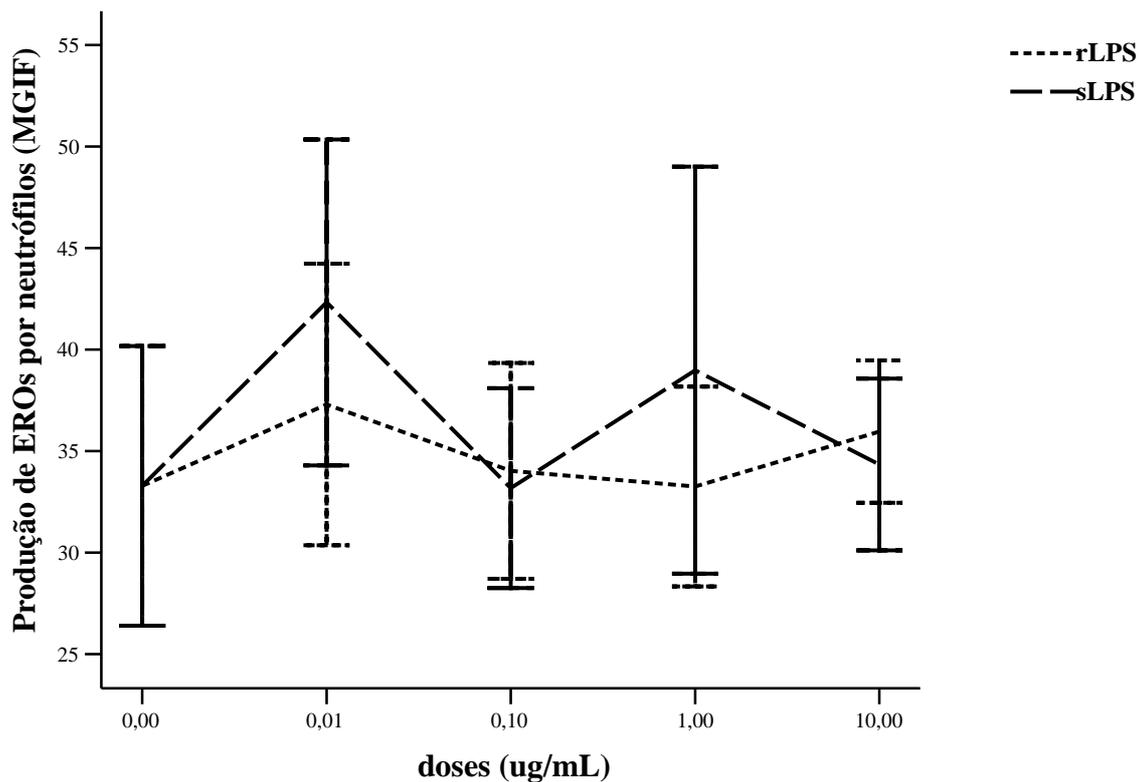


**Figura A.1:** Curva da dose-resposta da produção de EROs em monócitos induzida por r e sLPS. O sangue periférico foi incubado com diferentes concentrações de r e sLPS (0; 0,01; 0,1; 1 e 10 ug/mL) por 15 min. No gráfico os valores são dados como porcentagem de monócitos produtores de EROs, dados de 3 indivíduos.

A produção de EROs por monócitos na curva de dose-resposta não se mostrou alterada ao longo do aumento de doses de estímulos (figura A.1). Quando analisados os indivíduos separadamente (dado não mostrado), pode ser observado que ambas as formas de LPS foram capazes de estimular estas células, porém não em todos os indivíduos. No entanto, quando

comparamos as médias de produção por r e sLPS não houve diferença estatisticamente significativa. O controle positivo, o *S. aureus*, apresentou produção como esperado (dado não mostrado).

Os neutrófilos também não apresentaram curva dose-resposta adequada aos estímulos (figura A.2), sendo a resposta, assim como nos monócitos, muito variável de indivíduo para indivíduo. Em resposta ao estímulo com *S. aureus*, controle positivo do experimento, os neutrófilos responderam fortemente (dado não mostrado).



**Figura A.2:** Curva da dose-resposta da produção de EROs em neutrófilos induzida por r e sLPS. O sangue periférico foi incubado com diferentes concentrações de r e sLPS (0; 0,01; 0,1; 1 e 10 ug/mL) por 15 min. Nos gráficos os valores são dados como porcentagem de neutrófilos produtores de EROs, dados de 4 indivíduos.

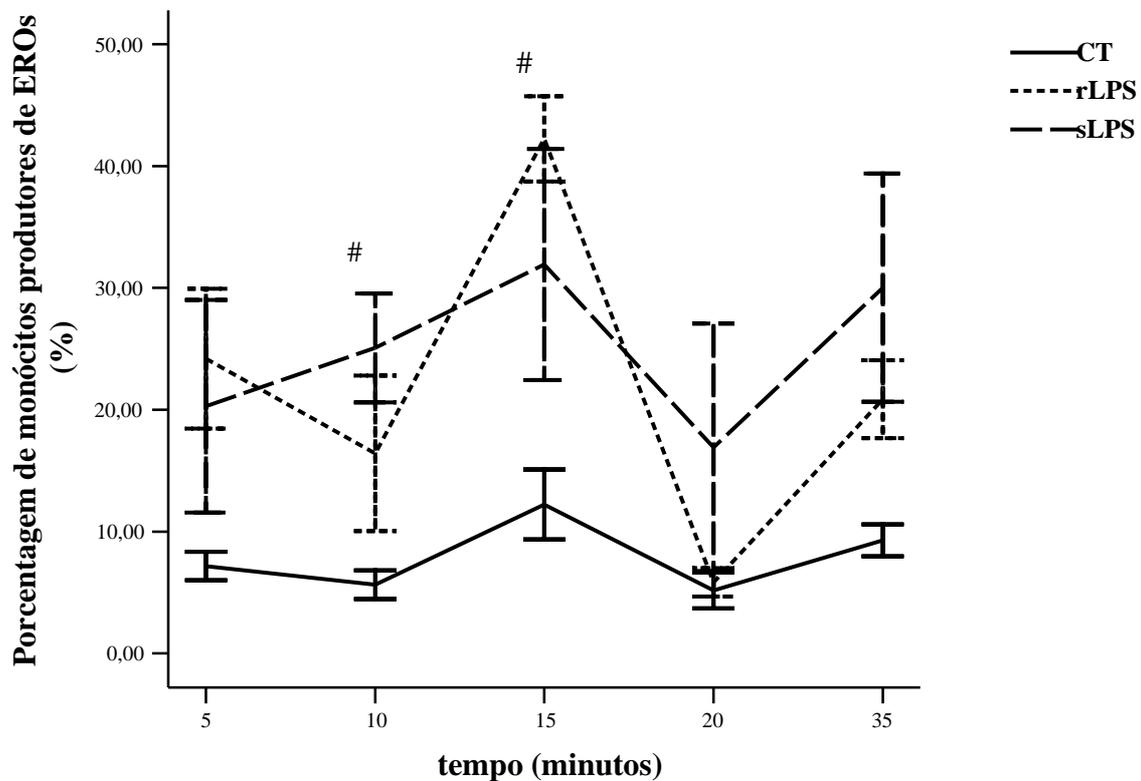
Apesar de não ter sido observada uma dose que fosse responsável por uma produção maior de EROs, foi escolhida a dose de 1ug/mL para realização dos testes de cinética.

#### - Cinética

Cem microlitros de sangue heparinizado foram distribuídos em tubos de polipropileno de 5mL e posteriormente receberam um estímulo cada (sem estímulo, rLPS 1 ug/mL, sLPS 1 ug/mL

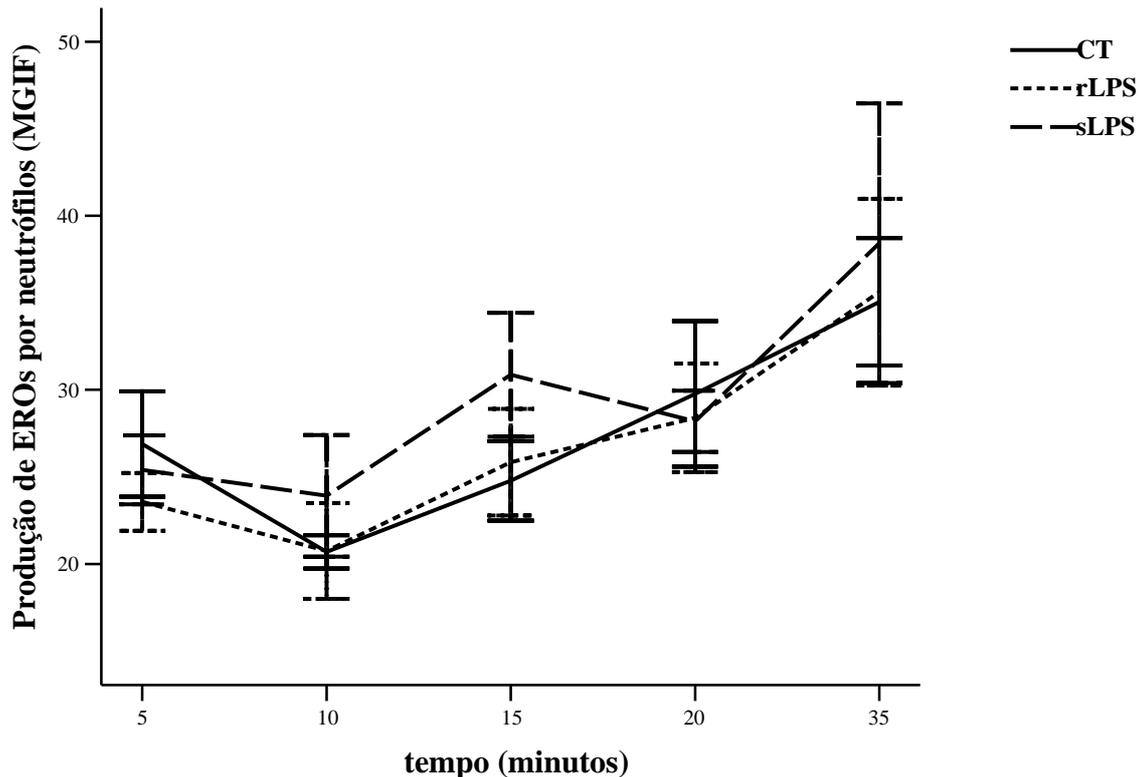
ou *S. aureus*  $2 \times 10^9$  células/mL). Os tubos foram incubados em banho-maria a  $37^\circ\text{C}$  sob agitação por 5, 10, 15, 20 e 35 min. Foram acrescentados, cinco minutos antes do término da incubação, 200  $\mu\text{L}$  de DCFH 0,3 mM por tubo. O restante do protocolo foi o mesmo utilizado no item de dose-resposta descrito acima.

A curva cinética dos monócitos em resposta aos estímulos pode ser observada na figura A.3. A análise mostrou que, quando comparados os três grupos (controle, r e sLPS), há diferença significativa na produção nos tempos de 10 e 15 min ( $p=0,04$  e  $p=0,02$ ). O controle positivo se mostrou estatisticamente diferente em relação ao controle em todos os tempos (dado não mostrado).



**Figura A.3:** Cinética da produção de EROs induzida por r e sLPS em monócitos. O sangue periférico foi incubado com diferentes estímulos (controle negativo, rLPS 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  e sLPS 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) por 5, 10, 15, 20 ou 35 min. No gráfico os valores são dados como porcentagem de monócitos produtores de espécies reativas de oxigênio, em médias e erros padrão, dados de 4 indivíduos. #  $p \leq 0,05$  comparando os grupos controle, r e sLPS num mesmo tempo (ANOVA).

A cinética da produção de EROs por neutrófilos pode ser vista na figura A.4. Não foi detectada produção estatisticamente significativa em nenhum dos tempos por ambos os estímulos estudados, porém o controle positivo se mostrou estatisticamente diferente em relação ao controle em todos os tempos (dado não mostrado).



**Figura A.4:** Cinética da produção de EROs induzida por r e sLPS em neutrófilos. O sangue periférico foi incubado com diferentes estímulos (controle negativo, rLPS 1 ug/mL e sLPS 1 ug/mL) por 5, 10, 15, 20 ou 35 min. No gráfico os valores são dados como MGIF de DCF, em médias e erros padrão, dados de 4 indivíduos.

Os experimentos realizados em sangue total não diluído mostraram que os neutrófilos não sofreram ativação satisfatória pelo LPS, fato não esperado, pois tais células são largamente responsáveis pela fagocitose, o que geraria uma grande produção de EROs. Ainda, dados da literatura mostram que o rLPS é capaz de ativar significativamente os neutrófilos<sup>16</sup>. Frente a isso, foi decidido partir para a detecção de EROs utilizando DCFH-DA em um sistema onde o sangue era diluído, protocolo anteriormente utilizado em nosso laboratório. Apesar de já ter sido usado, resolvemos fazer alguns testes e algumas alterações que estão descritas abaixo.

## 2. Dosagem de EROs em sangue total diluído em PBS

### - Padronização do protocolo

Inicialmente foi realizado um teste com o protocolo pré-existente, onde ao sangue eram adicionados os estímulos, acertando o volume final com PBS para 1 mL. Foi realizada lise hipotônica das hemácias. Apesar de ter sido comprovado seu funcionamento, foi realizado um teste adicional utilizando solução de lise da BD<sup>TM</sup> versus lise hipotônica, além de lavagens com

PBS acrescido de soro bovino fetal. Após tais testes, foi padronizado o protocolo, utilizando a lise hipotônica, aquisição das células com o parâmetro de dispersão lateral de luz em escala logarítmica e lavagem com PBS acrescido de soro bovino fetal. Tal protocolo encontra-se descrito em detalhes no item 4.2 dos Métodos, assim como a dose resposta e cinética feitas. Os resultados são apresentados na seção Resultados.

### **3. Padronização do protocolo de dosagem do NO utilizando DAF-FM DA**

Através de adaptação do protocolo de Zelnickova *et al.* <sup>(76)</sup>, inicialmente foi feito um teste utilizando diferentes soluções de lise e diferentes concentrações de DAF-FM DA. Foram feitas lise hipotônica e lise da BD<sup>TM</sup>, testes com DAF-FM DA nas concentrações finais de 1 uM, 5 uM ou 10 uM, e o estímulo utilizado foi PMA. Ao final do experimento foi decidido a utilização de lise hipotônica e concentração de DAF-FM DA de 10 uM. O protocolo utilizado está descrito no item 4.3 dos Métodos. Os resultados estão descritos na seção Resultados.

### **4. Estimulação *in vitro* de sangue total para estudo da produção intracelular de citocinas**

A relação de anticorpos monoclonais e volumes utilizados para detecção de citocinas estão contidos na seção Materiais.

#### **- Padronização da condição de estímulo**

Foi feito um teste inicial onde o sangue total foi utilizado sem diluição e diluído 1:2 e 1:3. Nas diferentes condições, o sangue foi incubado sem estímulo ou com rLPS 100 ng/mL ou sLPS 100 ng/mL por 6 ou 15 h. Só foi possível detectar produção de citocina intracelular em monócitos e não em neutrófilos. Ainda assim, foi determinado que a melhor condição para a curva de dose-resposta seria em sangue puro por 6 h de estímulo.

#### **- Dose-resposta**

O sangue heparinizado foi distribuído em tubos de polipropileno de 5 mL e receberam um estímulo (sem estímulo, rLPS ou sLPS nas doses de 10; 100; 1000 ng/mL). As amostras foram incubadas por 30 min em estufa de 5% CO<sub>2</sub> a 37°C. Após a adição de 2 uL de monensina, que bloqueia a secreção de citocinas, os tubos foram homogeneizados e incubados por mais 5 h e 30 min. Dado o tempo de incubação, 100 uL foram transferidos para tubos de citometria. Foi feita a lavagem com 2 mL de PBS e centrifugação a 2500 x g por 5 min a 4°C. Em seguida

foram acrescentados 2 mL de solução de lise da BD<sup>TM</sup> e incubados durante 10 min em temperatura ambiente para lise das hemácias. Após a incubação, os tubos foram centrifugados, os sobrenadantes descartados e os botões celulares novamente lavados com 2 mL de PBS.

Para marcação de superfície, adicionaram-se 5 uL de CD66b FITC e 6uL CD14 PerCP e os tubos foram incubados por 15 min no escuro em temperatura ambiente. Os botões celulares foram lavados com 2 mL de PBS. As células foram incubadas com 1 mL de tampão de fixação por 20 min a 4°C, no escuro, e posteriormente lavadas. Em seguida as amostras receberam tampão de permeabilização e ao mesmo tempo os anticorpos conjugados com PE e APC da tabela A.1, incubando-as por 30 min no escuro a 4°C.

**Tabela A.1:** Painel de anticorpos utilizados em cada tubo para ensaio de citocinas intracelulares.

Tubo	FITC	PE	PerCP	APC
1	CD66b	IL8	CD14	TNF- $\alpha$
2	CD66b	IL6	CD14	IL10

\* os volumes de cada anticorpo encontram-se na seção Materiais.

Posteriormente, foram acrescentados aos tubos 2 mL de tampão de marcação. As suspensões foram centrifugadas e os sobrenadantes descartados. As amostras foram suspensas em 0,3 mL de tampão de marcação.

A detecção de citocinas foi realizada em citômetro de fluxo como descrito no item 4.1.5.1.

Como esperado, durante as curvas de dose-resposta de produção de citocinas por monócitos foram vistos níveis variáveis (dado não mostrado), que puderam ser detectadas pela técnica empregada. Já a produção de citocinas por neutrófilos estimulados por s ou rLPS não foi vista. Em outro estudo concomitante em nosso laboratório, empregando como estímulos LPS, MALP-2 e flagelina, assim como tais estímulos em adição (dois a dois em um mesmo tubo) não foi possível também detectar a produção de citocina por neutrófilos. Assim, com nossa experiência e por nossa técnica de detecção, não foi possível detectar produção de citocinas por neutrófilos, empregando diferentes estímulos.

## 5. Separação de núcleos para leitura em citômetro de fluxo

Para realização da separação de núcleos e posterior detecção de p65 e p50 nos mesmos, foram feitos alguns testes. Utilizamos inicialmente o protocolo de Nakamori *et al.* <sup>(77)</sup>, porém, como o artigo citado não fazia referências sobre como realizar a aquisição no citômetro, nem

utilizava o anticorpo que adquirimos, tivemos que fazer algumas adaptações. As principais foram guiadas pelo trabalho de Garcia-Garcia & Rosales<sup>(78)</sup>.

- Separação do citoplasma e isolamento dos núcleos:

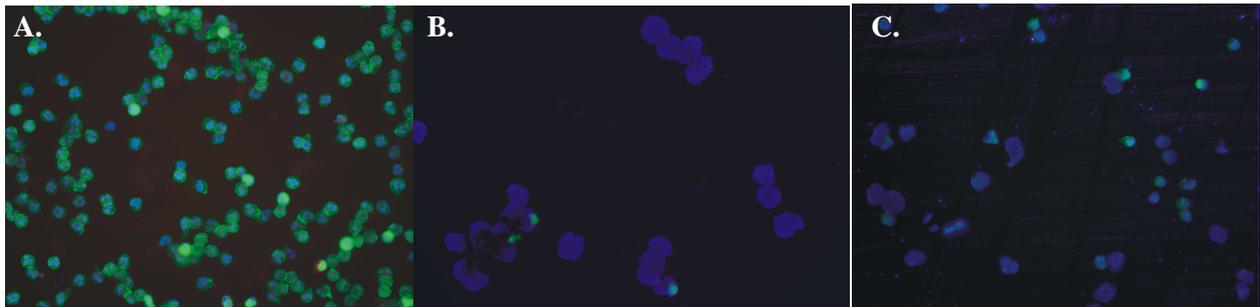
Os testes aqui descritos foram realizados para CMSP e PMN.

Foram feitos testes com protocolos similares ao de Nakamori *et al.*<sup>(77)</sup>, com tempo maior de fixação e diferentes formas de guardar as células antes da separação do núcleo. Porém, estes ensaios não foram conclusivos.

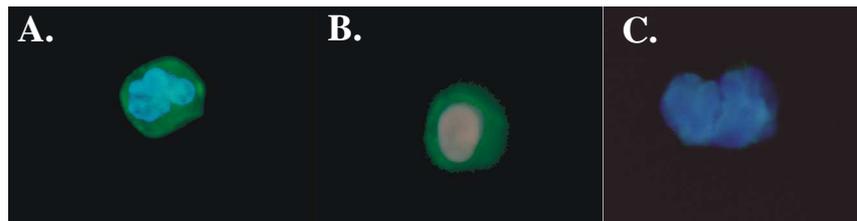
Até que em um ensaio, onde o protocolo de Nakamori *et al.*<sup>(77)</sup> foi seguido rigorosamente, adicionando-se algumas amostras de células íntegras, foi possível observar a obtenção de núcleos através de coloração com faloidina-FITC (marcador de actina, que mostra a presença de citoplasma) e 4',6-diamidino-2-fenilindole (DAPI, marcador de núcleo). As células íntegras separadas foram permeabilizadas e coradas com 50 uL de faloidina-FITC diluída 1:250 em tampão de permeabilização, por 1 h, seguida de centrifugação a 600 x g por 5 min a 4°C. Depois, a suspensão foi centrifugada em citocentrífuga para a confecção de lâmina. Os núcleos, após separação, foram corados com 50 uL de faloidina-FITC diluída 1:250 em tampão de marcação, e após centrifugação foram feitas lâminas da suspensão. Quando prontas as lâminas, foram adicionados 10 uL de DAPI diluído (1 uL de DAPI, 3 uL de anti-*fade* e 6 uL de água) por amostra. As lâminas foram então observadas em microscópio de fluorescência e imagens foram captadas. Foi possível observar que para os PMN a obtenção de núcleos isolados foi possível, porém, para CMSP a lise não pareceu adequada e os núcleos não se encontravam isolados. A figura 5.31 mostra fotos obtidas neste dia. A tentativa de aquisição no citômetro, de núcleos não marcados, gerou dúvida.

Na tentativa de isolar os núcleos de CMSP, foram feitos novos ensaios com CMSP e PMN variando o tempo de fixação das células (2min, 30 min ou por toda a noite) e de concentração de nonidet P-40 (0,1% ou 0,2%) no tampão de lise utilizado. Através de observação de lâminas coradas com faloidina e DAPI diluído foi possível concluir que 2min de fixação e 0,1% de nonidet P-40, como descrito no protocolo original, eram os melhores para PMN, mas 30 min de fixação com 0,1% de nonidet P-40 eram melhores para CMSP. É possível observar estes dados na figura A.5. Apesar de esta conclusão ter sido tirada, fizemos outros testes onde não eram feitas as lâminas por citocentrifugação, pois a mesma parecia prejudicar a integridade dos núcleos, mas sim por gotejamento da suspensão em lâmina. Estas amostras foram coradas com faloidina e 7-AAD (corante de DNA que cora apenas as células mortas ou núcleos, pois não consegue atravessar a membrana plasmática íntegra), e posteriormente, quando

nas lâminas, com DAPI. Assim foi possível contar a eficiência das lises, sendo que a com 0,1% de detergente foi de 32% nos PMN com 30 min de fixação e 94% com 2 min de fixação. Em um novo teste, utilizando maior contagem de eventos, foi vista que a eficiência de 2min de fixação foi de 93%. A figura A.6 mostra neutrófilos vivos (A, marcadas apenas com DAPI e faloidina) e mortas (B, marcadas com DAPI, faloidina e 7-AAD), além de núcleos isolados (C, apenas marcados com DAPI).



**Figura A.5:** Fotos tiradas de células íntegras (A) e núcleos isolados (B e C) após marcação de actina em verde e DNA em azul. (A.) Após o cultivo, as PMN foram lavadas, permeabilizadas e marcadas com faloidina-FITC. Então, foram feitas lâminas através de centrifugação em citocentrífuga e coloração com DAPI. (B.) Os núcleos foram isolados de acordo com o protocolo descrito na seção Métodos (com fixação das células por 2 min) e incubados com faloidina-FITC. Depois, foram feitas lâminas e coloração com DAPI. (C.) Os núcleos foram isolados de acordo com o protocolo descrito na seção Métodos, porém com fixação das células por 30 min, e incubados com faloidina-FITC. Depois, foram feitas lâminas e coloração com DAPI. Fotos tiradas por Dr. Ricardo Bertolla, Laboratório de Reprodução Humana, UNIFESP.



**Figura A.6:** Fotos com maior aumento de célula íntegra (A e B) e núcleos isolados (C) após marcação de actina em verde, DNA em azul (DAPI) e vermelho (7-AAD). (A e B.) Após o cultivo, as PMN foram lavadas, permeabilizadas e marcadas com faloidina-FITC e 7-AAD. Lâminas foram feitas através de gotejamento da suspensão de células e coloração com DAPI. Em A, pode-se observar um neutrófilo que estava vivo no momento da coloração por 7-AAD, pois seu núcleo encontra-se corado apenas de azul (DAPI). Em B, pode-se observar que o neutrófilo estava morto no momento da incubação com 7-AAD, pois o núcleo encontra-se corado em vermelho e azul. (C.) Os núcleos foram isolados de acordo com o protocolo descrito na seção Métodos e incubados com faloidina-FITC. Foram feitas lâminas e coloração com DAPI. Fotos tiradas pelo Dr. Ricardo Bertolla, Laboratório de Reprodução Humana, UNIFESP.

Para melhor visualização do isolamento dos núcleos, foram feitas algumas lâminas para coloração por hematoxilina/eosina (figura 5.33).

Foram feitos novos testes para o isolamento de núcleos de CMSP, porém não foi possível mantê-los íntegros. Então, como tais células não foram o foco do presente trabalho, foi dado seguimento utilizando apenas os PMN.

- Marcação de p65 e p50 intranuclear

Iniciou-se então a estimulação dos PMN. Em novos ensaios, foram feitas estimulações com r e sLPS na concentração de  $100 \text{ ng}/2 \times 10^6$  células, PMA  $2 \text{ ng}/2 \times 10^6$  células ou *S. aureus*  $1,8 \times 10^8$  bactéria/ $2 \times 10^6$  células, por 2 h. Porém, não foi observado grande estímulo em relação ao controle negativo. Então, em nova revisão da literatura foi encontrado o trabalho de Garcia-Garcia & Rosales<sup>(78)</sup>, que descrevia uma lise diferente para neutrófilos, e mostrava os gráficos de aquisição, além de permeabilizar o núcleo antes de realizar a marcação. O protocolo a partir de então utilizado encontra-se descrito no item 4.5 dos Métodos.

## *9. Referências*

---

1. Bone RC, Sibbald WJ, Sprung CL. The ACCP-SCCM consensus conference on sepsis and organ failure. *Chest*. 1992;101(6):1481-3.
2. Salomao R, Rigato O, Pignatari AC, Freudenberg MA, Galanos C. Bloodstream infections: epidemiology, pathophysiology and therapeutic perspectives. *Infection*. 1999;27(1):1-11.
3. 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.
4. 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.
5. Jaimes F. A literature review of the epidemiology of sepsis in Latin America. *Rev Panam Salud Publica*. 2005;18(3):163-71.
6. Beutler B. Innate immunity: an overview. *Mol Immunol*. 2004;40(12):845-59.
7. Rietschel ET, Schade U, Jensen M, Wollenweber HW, Luderitz O, Greisman SG. Bacterial endotoxins: chemical structure, biological activity and role in septicemia. *Scand J Infect Dis Suppl*. 1982;31(8-21).
8. Beutler B, Rietschel ET. Innate immune sensing and its roots: the story of endotoxin. *Nat Rev Immunol*. 2003;3(2):169-76.
9. Galanos C, Freudenberg MA, Luderitz O, Rietschel ET, Westphal O. Chemical, physicochemical and biological properties of bacterial lipopolysaccharides. *Prog Clin Biol Res*. 1979;29(321-32).
10. 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.
11. Galanos C, Luderitz O, Westphal O. Preparation and properties of a standardized lipopolysaccharide from salmonella abortus equi (Novo-Pyrexal). *Zentralbl Bakteriol [Orig A]*. 1979;243(2-3):226-44.
12. Alexander C, Rietschel ET. Bacterial lipopolysaccharides and innate immunity. *J Endotoxin Res*. 2001;7(3):167-202.
13. Caroff M, Karibian D. Structure of bacterial lipopolysaccharides. *Carbohydr Res*. 2003;338(23):2431-47.
14. Lüderitz O FM, Galanos C, Lehmann V, Rietschel ET, Shaw DH. Lipopolysaccharides of gram-negative bacteria. In: A BFaK (Eds). *Current Topics in Membranes & Transport: Membrane Lipids of Prokaryotes*. New York: Academic Press; 1982. p.79-150.
15. Huber M, Kalis C, Keck S, Jiang Z, Georgel P, Du X, *et al*. R-form LPS, the master key to the activation of TLR4/MD-2-positive cells. *Eur J Immunol*. 2006;36(3):701-11.
16. Kapp A, Freudenberg M, Galanos C. Induction of human granulocyte chemiluminescence by bacterial lipopolysaccharides. *Infect Immun*. 1987;55(3):758-61.
17. Freudenberg MA GC. Metabolism of LPS in vivo. In: Ryan JL MD (Eds). *Bacterial Endotoxic Lipopolysaccharides, Immunopharmacology and Pathophysiology*. Boca Raton: CRC Press; 1992. p.275-294.
18. Rittig MG, Kaufmann A, Robins A, Shaw B, Sprenger H, Gemsa D, *et al*. Smooth and rough lipopolysaccharide phenotypes of *Brucella* induce different intracellular trafficking and cytokine/chemokine release in human monocytes. *J Leukoc Biol*. 2003;74(6):1045-55.
19. 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.

20. 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.
21. Jerala R. Structural biology of the LPS recognition. *Int J Med Microbiol*. 2007;297(5):353-63.
22. 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.
23. 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.
24. Ziegler-Heitbrock HW, Ulevitch RJ. CD14: cell surface receptor and differentiation marker. *Immunol Today*. 1993;14(3):121-5.
25. 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.
26. Schumann RR. Host cell-pathogen interface: molecular mechanisms and genetics. *Vaccine*. 2004;22 Suppl 1(S21-4).
27. 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.
28. 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.
29. Haziot A, Katz I, Rong GW, Lin XY, Silver J, Goyert SM. Evidence that the receptor for soluble CD14:LPS complexes may not be the putative signal-transducing molecule associated with membrane-bound CD14. *Scand J Immunol*. 1997;46(3):242-5.
30. Ley K. Molecular mechanisms of leukocyte recruitment in the inflammatory process. *Cardiovasc Res*. 1996;32(4):733-42.
31. Baggiolini M. Chemokines and leukocyte traffic. *Nature*. 1998;392(6676):565-8.
32. Wang JM, Su S, Gong W, Oppenheim JJ. Chemokines, receptors, and their role in cardiovascular pathology. *Int J Clin Lab Res*. 1998;28(2):83-90.
33. Ahuja SK, Shetty A, Tiffany HL, Murphy PM. Comparison of the genomic organization and promoter function for human interleukin-8 receptors A and B. *J Biol Chem*. 1994;269(42):26381-9.
34. Janeway CA TP, Walport M, Shlomchik M. An Introduction to Immunobiology and Innate Immunity. In: Janeway CA TP, Walport M, Shlomchik M (Eds). *Immunobiology: the Immune System in health and disease*. 5th. London: Garland Science; 2001. p.55-111.
35. Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik M. *Imunobiologia*. In: Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik M (Eds). *Introdução à imunobiologia e à imunidade inata*. Porto Alegre: Artmed Editora S.A.; 2001. p.55-111.
36. Wright SD, Jong MT. Adhesion-promoting receptors on human macrophages recognize *Escherichia coli* by binding to lipopolysaccharide. *J Exp Med*. 1986;164(6):1876-88.
37. 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.
38. Zarewych DM, Kindzelskii AL, Todd RF, 3rd, Petty HR. LPS induces CD14 association with complement receptor type 3, which is reversed by neutrophil adhesion. *J Immunol*. 1996;156(2):430-3.
39. Skubitz KM, Campbell KD, Skubitz AP. CD66a, CD66b, CD66c, and CD66d each independently stimulate neutrophils. *J Leukoc Biol*. 1996;60(1):106-17.

40. Schroder AK, Uciechowski P, Fleischer D, Rink L. Crosslinking of CD66B on peripheral blood neutrophils mediates the release of interleukin-8 from intracellular storage. *Hum Immunol.* 2006;67(9):676-82.
41. Nair KS, Zingde SM. Adhesion of neutrophils to fibronectin: role of the cd66 antigens. *Cell Immunol.* 2001;208(2):96-106.
42. Carreras MC, Poderoso JJ, Cadenas E, Boveris A. Measurement of nitric oxide and hydrogen peroxide production from human neutrophils. *Methods Enzymol.* 1996;269(65-75).
43. Follin P, Dahlgren C. Phagocytosis by lipopolysaccharide-primed human neutrophils is associated with increased extracellular release of reactive oxygen metabolites. *Inflammation.* 1992;16(2):83-91.
44. Moraes TJ, Zurawska JH, Downey GP. Neutrophil granule contents in the pathogenesis of lung injury. *Curr Opin Hematol.* 2006;13(1):21-7.
45. Fialkow L, Wang Y, Downey GP. Reactive oxygen and nitrogen species as signaling molecules regulating neutrophil function. *Free Radic Biol Med.* 2007;42(2):153-64.
46. Magder S. Reactive oxygen species: toxic molecules or spark of life? *Crit Care.* 2006;10(1):208.
47. Tracey WR, Tse J, Carter G. Lipopolysaccharide-induced changes in plasma nitrite and nitrate concentrations in rats and mice: pharmacological evaluation of nitric oxide synthase inhibitors. *J Pharmacol Exp Ther.* 1995;272(3):1011-5.
48. Kilbourn RG, Griffith OW. Overproduction of nitric oxide in cytokine-mediated and septic shock. *J Natl Cancer Inst.* 1992;84(11):827-31.
49. Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev.* 1991;43(2):109-42.
50. Nathan C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *Faseb J.* 1992;6(12):3051-64.
51. Wheeler MA, Smith SD, Garcia-Cardena G, Nathan CF, Weiss RM, Sessa WC. Bacterial infection induces nitric oxide synthase in human neutrophils. *J Clin Invest.* 1997;99(1):110-6.
52. Cunha FQ, Assreuy J, Xu D, Charles I, Liew FY, Moncada S. Repeated induction of nitric oxide synthase and leishmanicidal activity in murine macrophages. *Eur J Immunol.* 1993;23(6):1385-8.
53. Kaplan SS, Lancaster JR, Jr., Basford RE, Simmons RL. Effect of nitric oxide on staphylococcal killing and interactive effect with superoxide. *Infect Immun.* 1996;64(1):69-76.
54. Dal Secco D, Paron JA, de Oliveira SH, Ferreira SH, Silva JS, Cunha Fde Q. Neutrophil migration in inflammation: nitric oxide inhibits rolling, adhesion and induces apoptosis. *Nitric Oxide.* 2003;9(3):153-64.
55. Falcão RS PR, Zago MA. Produção, Dinâmica e Função das Células Sangüíneas. In: Falcão RS PR, Zago MA (Eds). *Hematologia – Fundamentos e Prática.* Rio de Janeiro: Atheneu; 2004. p.33-43.
56. Abbas AK LA, Pober JS. Innate Immunity. In: Abbas AK LA, Pober JS (Eds). *Cellular and Molecular Immunology.* 4th. Boston: Elsevier; 2003. p.270-290.
57. Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, Van Huffel C, Du X, *et al.* Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10 scCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science.* 1998;282(5396):2085-8.
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.

59. 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.
60. Ingalls RR, Golenbock DT. CD11c/CD18, a transmembrane signaling receptor for lipopolysaccharide. *J Exp Med.* 1995;181(4):1473-9.
61. 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.
62. Medzhitov R, Janeway CA, Jr. Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr Opin Immunol.* 1997;9(1):4-9.
63. Gay NJ, Keith FJ. Drosophila Toll and IL-1 receptor. *Nature.* 1991;351(6325):355-6.
64. 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.
65. Takeda K, Akira S. Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol.* 2005;17(1):1-14.
66. Kim JW, Kim C. Inhibition of LPS-induced NO production by taurine chloramine in macrophages is mediated through Ras-ERK-NF-kappaB. *Biochem Pharmacol.* 2005;70(9):1352-60.
67. Hayden MS, Ghosh S. Signaling to NF-kappaB. *Genes Dev.* 2004;18(18):2195-224.
68. Gloire G, Legrand-Poels S, Piette J. NF-kappaB activation by reactive oxygen species: fifteen years later. *Biochem Pharmacol.* 2006;72(11):1493-505.
69. 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.
70. Jiang Z, Georgel P, Du X, Shamel L, Sovath S, Mudd S, *et al.* CD14 is required for MyD88-independent LPS signaling. *Nat Immunol.* 2005;6(6):565-70.
71. Godowski PJ. A smooth operator for LPS responses. *Nat Immunol.* 2005;6(6):544-6.
72. Gangloff SC, Zahringer U, Blondin C, Guenounou M, Silver J, Goyert SM. Influence of CD14 on Ligand Interactions between Lipopolysaccharide and Its Receptor Complex. *J Immunol.* 2005;175(6):3940-5.
73. Kuijpers TW, Hoogerwerf M, van der Laan LJ, Nagel G, van der Schoot CE, Grunert F, *et al.* CD66 nonspecific cross-reacting antigens are involved in neutrophil adherence to cytokine-activated endothelial cells. *J Cell Biol.* 1992;118(2):457-66.
74. Meerschaert J, Furie MB. The adhesion molecules used by monocytes for migration across endothelium include CD11a/CD18, CD11b/CD18, and VLA-4 on monocytes and ICAM-1, VCAM-1, and other ligands on endothelium. *J Immunol.* 1995;154(8):4099-112.
75. Kojima H, Urano Y, Kikuchi K, Higuchi T, Hirata Y, Nagano T. Fluorescent Indicators for Imaging Nitric Oxide Production. *Angew Chem Int Ed Engl.* 1999;38(21):3209-3212.
76. Zelnickova P, Faldyna M, Ondracek J, Kovaru H, Kovaru F. Ontogeny of reactive nitrogen species production by blood phagocytes in pigs. *Physiol Res.* 2007;
77. Nakamori Y, Ogura H, Koh T, Fujita K, Tanaka H, Sumi Y, *et al.* The balance between expression of intranuclear NF-kappaB and glucocorticoid receptor in polymorphonuclear leukocytes in SIRS patients. *J Trauma.* 2005;59(2):308-14; discussion 314-5.
78. Garcia-Garcia E, Rosales C. Nuclear factor activation by FcgammaR in human peripheral blood neutrophils detected by a novel flow cytometry-based method. *J Immunol Methods.* 2007;320(1-2):104-18.
79. Flo TH, Halaas O, Torp S, Ryan L, Lien E, Dybdahl B, *et al.* Differential expression of Toll-like receptor 2 in human cells. *J Leukoc Biol.* 2001;69(3):474-81.

80. Moller AS, Ovstebo R, Haug KB, Joo GB, Westvik AB, Kierulf P. Chemokine production and pattern recognition receptor (PRR) expression in whole blood stimulated with pathogen-associated molecular patterns (PAMPs). *Cytokine*. 2005;32(6):304-15.
81. Landmann R, Reber AM, Sansano S, Zimmerli W. Function of soluble CD14 in serum from patients with septic shock. *J Infect Dis*. 1996;173(3):661-8.
82. Ball ED, Graziano RF, Shen L, Fanger MW. Monoclonal antibodies to novel myeloid antigens reveal human neutrophil heterogeneity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1982;79(17):5374-8.
83. Jayaram Y, Buckle AM, Hogg N. The Fc receptor, FcRI, and other activation molecules on human mononuclear phagocytes after treatment with interferon-gamma. *Clin Exp Immunol*. 1989;75(3):414-20.
84. Kurt-Jones EA, Mandell L, Whitney C, Padgett A, Gosselin K, Newburger PE, *et al*. Role of toll-like receptor 2 (TLR2) in neutrophil activation: GM-CSF enhances TLR2 expression and TLR2-mediated interleukin 8 responses in neutrophils. *Blood*. 2002;100(5):1860-8.
85. Wagner C, Deppisch R, Deneffle B, Hug F, Andrassy K, Hansch GM. Expression patterns of the lipopolysaccharide receptor CD14, and the FCgamma receptors CD16 and CD64 on polymorphonuclear neutrophils: data from patients with severe bacterial infections and lipopolysaccharide-exposed cells. *Shock*. 2003;19(1):5-12.
86. Rodeberg DA, Morris RE, Babcock GF. Azurophilic granules of human neutrophils contain CD14. *Infect Immun*. 1997;65(11):4747-53.
87. Allen RC, Pruitt BA, Jr. Humoral-phagocyte axis of immune defense in burn patients. Chemoluminigenic probing. *Arch Surg*. 1982;117(2):133-40.
88. Weingarten R, Sklar LA, Mathison JC, Omid S, Ainsworth T, Simon S, *et al*. Interactions of lipopolysaccharide with neutrophils in blood via CD14. *J Leukoc Biol*. 1993;53(5):518-24.
89. Wright SD, Ramos RA, Hermanowski-Vosatka A, Rockwell P, Detmers PA. Activation of the adhesive capacity of CR3 on neutrophils by endotoxin: dependence on lipopolysaccharide binding protein and CD14. *J Exp Med*. 1991;173(5):1281-6.
90. Husebye H, Halaas O, Stenmark H, Tunheim G, Sandanger O, Bogen B, *et al*. Endocytic pathways regulate Toll-like receptor 4 signaling and link innate and adaptive immunity. *Embo J*. 2006;25(4):683-92.
91. Sabroe I, Jones EC, Usher LR, Whyte MK, Dower SK. Toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 in human peripheral blood granulocytes: a critical role for monocytes in leukocyte lipopolysaccharide responses. *J Immunol*. 2002;168(9):4701-10.
92. Muzio M, Bosisio D, Polentarutti N, D'Amico G, Stoppacciaro A, Mancinelli R, *et al*. Differential expression and regulation of toll-like receptors (TLR) in human leukocytes: selective expression of TLR3 in dendritic cells. *J Immunol*. 2000;164(11):5998-6004.
93. Murphy PM. Neutrophil receptors for interleukin-8 and related CXC chemokines. *Semin Hematol*. 1997;34(4):311-8.
94. Khandaker MH, Xu L, Rahimpour R, Mitchell G, DeVries ME, Pickering JG, *et al*. CXCR1 and CXCR2 are rapidly down-modulated by bacterial endotoxin through a unique agonist-independent, tyrosine kinase-dependent mechanism. *J Immunol*. 1998;161(4):1930-8.
95. Juffermans NP, Dekkers PE, Peppelenbosch MP, Speelman P, van Deventer SJ, van Der Poll T. Expression of the chemokine receptors CXCR1 and CXCR2 on granulocytes in human endotoxemia and tuberculosis: involvement of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway. *J Infect Dis*. 2000;182(3):888-94.
96. Sabroe I, Jones EC, Whyte MK, Dower SK. Regulation of human neutrophil chemokine receptor expression and function by activation of Toll-like receptors 2 and 4. *Immunology*. 2005;115(1):90-8.

97. Carlos TM, Harlan JM. Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood*. 1994;84(7):2068-101.
98. Arnaout MA. Leukocyte adhesion molecules deficiency: its structural basis, pathophysiology and implications for modulating the inflammatory response. *Immunol Rev*. 1990;114(145-80).
99. Zhou X, Gao XP, Fan J, Liu Q, Anwar KN, Frey RS, *et al*. LPS activation of Toll-like receptor 4 signals CD11b/CD18 expression in neutrophils. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2005;288(4):L655-62.
100. Galdiero M, D'Isanto M, Vitiello M, Finamore E, Peluso L, Galdiero M. Porins from *Salmonella enterica* serovar Typhimurium induce TNF-alpha, IL-6 and IL-8 release by CD14-independent and CD11a/CD18-dependent mechanisms. *Microbiology*. 2001;147(Pt 10):2697-704.
101. Hansen PS, Petersen SB, Varning K, Nielsen H. Additive effects of *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide and proteins in monocyte inflammatory responses. *Scand J Gastroenterol*. 2002;37(7):765-71.
102. Marsik C, Mayr F, Cardona F, Derhaschnig U, Wagner OF, Jilma B. Endotoxaemia modulates Toll-like receptors on leucocytes in humans. *Br J Haematol*. 2003;121(4):653-6.
103. Haugen TS, Skjonsberg OH, Nakstad B, Lyberg T. Modulation of adhesion molecule profiles on alveolar macrophages and blood leukocytes. *Respiration*. 1999;66(6):528-37.
104. Mazzone A, Ricevuti G. Leukocyte CD11/CD18 integrins: biological and clinical relevance. *Haematologica*. 1995;80(2):161-75.
105. Benacerraf B. Role of MHC gene products in immune regulation. *Science*. 1981;212(4500):1229-38.
106. McDevitt HO. Regulation of the immune response by the major histocompatibility system. *N Engl J Med*. 1980;303(26):1514-7.
107. McLeish KR, Wellhausen SR, Dean WL. Biochemical basis of HLA-DR and CR3 modulation on human peripheral blood monocytes by lipopolysaccharide. *Cell Immunol*. 1987;108(1):242-8.
108. Brunialti MK, Martins PS, Barbosa de Carvalho H, Machado FR, Barbosa LM, Salomao R. TLR2, TLR4, CD14, CD11B, and CD11C expressions on monocytes surface and cytokine production in patients with sepsis, severe sepsis, and septic shock. *Shock*. 2006;25(4):351-7.
109. Martins PS, Brunialti, M. K. B., Martos, L. S. W., Machado, F. R., Assuncao, M. S., Blecher S., Salomao, R., *Cell surface receptors expression and oxidative metabolism modulation across the clinical spectrum of sepsis*. 2008, Federal University of Sao Paulo.
110. Myhre O, Andersen JM, Aarnes H, Fonnum F. Evaluation of the probes 2',7'-dichlorofluorescein diacetate, luminol, and lucigenin as indicators of reactive species formation. *Biochem Pharmacol*. 2003;65(10):1575-82.
111. Liaudet L, Murthy KG, Mabley JG, Pacher P, Soriano FG, Salzman AL, *et al*. Comparison of inflammation, organ damage, and oxidant stress induced by *Salmonella enterica* serovar Muenchen flagellin and serovar Enteritidis lipopolysaccharide. *Infect Immun*. 2002;70(1):192-8.
112. Munakata W, Liu Q, Shimoyama T, Sawaya M, Umeda T, Sugawara K. Ecabet sodium attenuates reactive oxygen species produced by neutrophils after priming with bacterial lipopolysaccharides. *Luminescence*. 2003;18(6):330-3.
113. Ruchaud-Sparagano MH, Ruivenkamp CA, Riches PL, Poxton IR, Dransfield I. Differential effects of bacterial lipopolysaccharides upon neutrophil function. *FEBS Lett*. 1998;430(3):363-9.

114. Chandel NS, Trzyna WC, McClintock DS, Schumacker PT. Role of oxidants in NF-kappa B activation and TNF-alpha gene transcription induced by hypoxia and endotoxin. *J Immunol.* 2000;165(2):1013-21.
115. Gagnon C, Leblond FA, Filep JG. Peroxynitrite production by human neutrophils, monocytes and lymphocytes challenged with lipopolysaccharide. *FEBS Lett.* 1998;431(1):107-10.
116. Klink M, Brzychcy M, Ziolkowski A, Swierzko A, Sulowska Z, Cedzynski M, *et al.* The comparison of some biological activities of lipopolysaccharides obtained from smooth and rough *Proteus mirabilis* strains. *Acta Microbiol Pol.* 1998;47(2):141-51.
117. Kyriakis JM, Avruch J. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev.* 2001;81(2):807-69.
118. van den Blink B, Branger J, Weijer S, Gupta A, van Deventer SJ, Peppelenbosch MP, *et al.* P38 mitogen activated protein kinase is involved in the downregulation of granulocyte CXC chemokine receptors 1 and 2 during human endotoxemia. *J Clin Immunol.* 2004;24(1):37-41.
119. Kim HJ, Lee HS, Chong YH, Kang JL. p38 Mitogen-activated protein kinase up-regulates LPS-induced NF-kappaB activation in the development of lung injury and RAW 264.7 macrophages. *Toxicology.* 2006;225(1):36-47.
120. Yan SR, Al-Hertani W, Byers D, Bortolussi R. Lipopolysaccharide-binding protein- and CD14-dependent activation of mitogen-activated protein kinase p38 by lipopolysaccharide in human neutrophils is associated with priming of respiratory burst. *Infect Immun.* 2002;70(8):4068-74.
121. Carmody RJ, Chen YH. Nuclear factor-kappaB: activation and regulation during toll-like receptor signaling. *Cell Mol Immunol.* 2007;4(1):31-41.
122. Lee JW, Lee MS, Kim TH, Lee HJ, Hong SS, Noh YH, *et al.* Inhibitory effect of infliximab on nitric oxide generation and iNOS expression via inhibition of NF-kappaB activation. *Mediators Inflamm.* 2007;2007(93148).
123. Vancurova I, Miskolci V, Davidson D. NF-kappa B activation in tumor necrosis factor alpha-stimulated neutrophils is mediated by protein kinase Cdelta. Correlation to nuclear I kappa B alpha. *J Biol Chem.* 2001;276(23):19746-52.
124. Miskolci V, Rollins J, Vu HY, Ghosh CC, Davidson D, Vancurova I. NFkappaB is persistently activated in continuously stimulated human neutrophils. *Mol Med.* 2007;13(3-4):134-42.
125. Castro-Alcaraz S, Miskolci V, Kalasapudi B, Davidson D, Vancurova I. NF-kappa B regulation in human neutrophils by nuclear I kappa B alpha: correlation to apoptosis. *J Immunol.* 2002;169(7):3947-53.
126. Nick JA, Avdi NJ, Gerwins P, Johnson GL, Worthen GS. Activation of a p38 mitogen-activated protein kinase in human neutrophils by lipopolysaccharide. *J Immunol.* 1996;156(12):4867-75.
127. Asehnoune K, Strassheim D, Mitra S, Kim JY, Abraham E. Involvement of reactive oxygen species in Toll-like receptor 4-dependent activation of NF-kappa B. *J Immunol.* 2004;172(4):2522-9.
128. Schreck R, Albermann K, Baeuerle PA. Nuclear factor kappa B: an oxidative stress-responsive transcription factor of eukaryotic cells (a review). *Free Radic Res Commun.* 1992;17(4):221-37.
129. Li N, Karin M. Is NF-kappaB the sensor of oxidative stress? *Faseb J.* 1999;13(10):1137-43.
130. Ndengele MM, Muscoli C, Wang ZQ, Doyle TM, Matuschak GM, Salvemini D. Superoxide potentiates NF-kappaB activation and modulates endotoxin-induced cytokine production in alveolar macrophages. *Shock.* 2005;23(2):186-93.

131. Park HS, Jung HY, Park EY, Kim J, Lee WJ, Bae YS. Cutting edge: direct interaction of TLR4 with NAD(P)H oxidase 4 isozyme is essential for lipopolysaccharide-induced production of reactive oxygen species and activation of NF-kappa B. *J Immunol.* 2004;173(6):3589-93.
132. Hailman E, Lichenstein HS, Wurfel MM, Miller DS, Johnson DA, Kelley M, *et al.* Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein accelerates the binding of LPS to CD14. *J Exp Med.* 1994;179(1):269-77.
133. Soler-Rodriguez AM, Zhang H, Lichenstein HS, Qureshi N, Niesel DW, Crowe SE, *et al.* Neutrophil activation by bacterial lipoprotein versus lipopolysaccharide: differential requirements for serum and CD14. *J Immunol.* 2000;164(5):2674-83.
134. Troelstra A, Giepmans BN, Van Kessel KP, Lichenstein HS, Verhoef J, Van Strijp JA. Dual effects of soluble CD14 on LPS priming of neutrophils. *J Leukoc Biol.* 1997;61(2):173-8.
135. Malhotra R, Priest R, Foster MR, Bird MI. P-selectin binds to bacterial lipopolysaccharide. *Eur J Immunol.* 1998;28(3):983-8.
136. Tamassia N, Le Moigne V, Calzetti F, Donini M, Gasperini S, Ear T, *et al.* The MyD88-independent pathway is not mobilized in human neutrophils stimulated via TLR4. *J Immunol.* 2007;178(11):7344-56.
137. Triantafilou M, Triantafilou K, Fernandez N. Rough and smooth forms of fluorescein-labelled bacterial endotoxin exhibit CD14/LBP dependent and independent binding that is influenced by endotoxin concentration. *Eur J Biochem.* 2000;267(8):2218-26.

## *10. Abstract*

---

**Objective:** To compare the biological action of R form and S form LPS in human peripheral blood neutrophils and monocytes. **Methods:** Cell surface receptors modulation, ROS and NO production were evaluated on monocytes and neutrophils in whole blood, and NF- $\kappa$ B activation was evaluated in isolated neutrophils by flow cytometry after incubation with R and S-LPS. **Results:** A small enhancement of TLR4 expression was observed on monocytes with 6 h stimulation whereas no modulation of TLR2 was seen on either cell. Modulation of CD14 on monocytes was biphasic, with initial increment in the first hour followed by decreased expression at 6 h. Both LPS increased CD66b expression on neutrophils. Expression of CD11b was rapidly up-regulated on monocytes and neutrophils by both LPS, while down regulation of CXCR2 expression on neutrophils was observed after a few minutes, lasting for 6 h. S-LPS effect on neutrophils expression of CD11b, CD66b and CXCR2 receptors was a little earlier than the R-LPS effect. Both LPS induced low production of ROS and NO compared to other stimuli, as well as NF- $\kappa$ B translocation. **Conclusions:** A complex LPS-induced cell surface receptors modulation was seen on monocytes and neutrophils in human blood, with up and down regulation depending on the receptors evaluated. R for and S form LPS have similarly activated human neutrophils, despite the low expression of CD14 in those cells. While the presence of LBP and of sCD14 could provide the requirements for S-form LPS induction of neutrophils activity in whole blood, other receptors are also likely to be involved in LPS cell signaling in neutrophils.

## *11. Apêndices*

---

## 11.1 Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo



Universidade Federal de São Paulo  
Escola Paulista de Medicina

Comitê de Ética em Pesquisa  
Hospital São Paulo

São Paulo, 6 de janeiro de 2006.  
CEP 1304/05

Ilmo(a). Sr(a).

Pesquisador(a) REINALDO SALOMÃO

Co-Investigadores: Natália Estevam Gomes, Milena K C Brunialti

Disciplina/Departamento: Infectologia/Medicina da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo

Patrocinador: Recursos Próprios.

### PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA INSTITUCIONAL

Ref: Projeto de pesquisa intitulado: "**Resposta de neutrófilos e monócitos do sangue periférico ao LPS de bactérias lisas e rugosas**".

**CARACTERÍSTICA PRINCIPAL DO ESTUDO:** Estudo in vitro com células de indivíduos normais.

**RISCOS ADICIONAIS PARA O PACIENTE:** risco mínimo, desconforto leve, envolvendo coleta de sangue.

**OBJETIVOS:** Comparar a ação biológica de formas R e S de LPS em neutrófilos e monócitos do sangue periférico de humanos. Serão avaliados: indução de MAPKs em monócitos e neutrófilos de indivíduos sadios por S-LPS e R-LPS; a dinâmica da expressão dos receptores de monócitos e granulócitos em resposta a R-LPS e S-LPS; a produção intracelular de TNF-alfa, IFN-alfa e IL-8 em neutrófilos e monócitos frente aos estímulos de R-LPS e S-LPS.

**RESUMO:** Serão coletados, de indivíduos sadios, 80 mL de sangue em tubo contendo heparina para separação de células mononucleares (CMSP) e polimorfonucleares (PMN) do sangue periférico, para estudos da dinâmica dos receptores e para detecção de produção intracelular de citocinas. Células mononucleares e polimorfonucleares serão separadas em ficoll-paquete, e estimuladas in vitro com LPS para estudo de ativação de proteínas quinases, por Western blot. Será realizado também estimulação in vitro de sangue total para estudo da dinâmica de receptores. A imunofenotipagem será lida em citômetro de fluxo. Produção intracelular de citocinas será realizada e determinada por citometria de fluxo..

**FUNDAMENTOS E RACIONAL:** Estudo visando avaliar a ação biológica de formas R e S de LPS em neutrófilos e monócitos de sangue periférico.

**MATERIAL E MÉTODO:** Estão descritos os métodos, sendo de domínio do laboratório.

**TCLE:** Foram atendidas as solicitações emitidas pelos relatores. Adequado.

**DETALHAMENTO FINANCEIRO:** sem financiamento externo - R\$ 29032,40.

**CRONOGRAMA:** 36 meses.

**OBJETIVO ACADÊMICO:** mestrado.

**ENTREGA DE RELATÓRIOS PARCIAIS AO CEP PREVISTOS PARA:** 01/01/2007 e 27/12/2007.

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

1. Comunicar toda e qualquer alteração do projeto e termo de consentimento livre e esclarecido. 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.

Atenciosamente,

**Prof. Dr. José Osmar Medina Pestana**

Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da  
Universidade Federal de São Paulo/ Hospital São Paulo

## 11.2 Termo de consentimento livre e esclarecido

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

#### RESPOSTA DE NEUTRÓFILOS E MONÓCITOS DO SANGUE PERIFÉRICO AO LPS DE BACTÉRIAS LISAS E RUGOSAS

Pesquisadores responsáveis:

**Natália Estevam Gomes**

**Reinaldo Salomão**

Sepse é uma doença conhecida como infecção generalizada causada por microorganismos (bactérias, fungos, vírus), e pode levar o paciente à morte em até 60% dos casos, o que mostra a importância de entendermos melhor os mecanismos que podem causá-la.

Existem várias células do corpo humano (por exemplo: monócitos, neutrófilos) participando no processo de defesa frente a esses microorganismos invasores, dentre estes microorganismos destacam-se as bactérias Gram-negativas que apresentam em sua membrana externa o LPS, cujo efeito fisiopatológico assemelha-se com as manifestações clínicas da sepsé.

Basicamente, os objetivos desse estudo são comparar a ação biológica de formas R e S de LPS em neutrófilos e monócitos do sangue periférico de humanos. Para tanto, serão avaliados:

- A indução de MAPKs em monócitos e neutrófilos de indivíduos saudáveis por sLPS e rLPS.
- A dinâmica da expressão dos receptores CD14, CD66b, TLR2, TLR4, CXCR2, CD11b e CD11c na superfície de monócitos e granulócitos em resposta a rLPS e sLPS.
- A produção intracelular de TNF- $\alpha$ , IFN- $\alpha$  e IL-8 em neutrófilos e monócitos frente aos estímulos de rLPS e sLPS.
- A produção de espécies reativas de oxigênio e de óxido nítrico por monócitos e neutrófilos em resposta a sLPS e rLPS.

- A translocação de p50 e p65 para o núcleo de monócitos e neutrófilos em resposta a rLPS e sLPS.

**COLETA DE SANGUE:** será coletada amostra de 40 mL de sangue em tubo contendo heparina sódica de voluntários sadios recrutados via comunicação pessoal e a coleta do material será feita no Laboratório de Virologia e Imunologia 1 - DIPA.

**RISCOS:** os riscos são mínimos e o único procedimento que pode acarretar algum desconforto ao participante é a coleta do sangue. A coleta é feita através de uma agulha que penetra em uma veia do braço. O desconforto pode ser pela dor local da picada e, raramente, pela formação de pequeno hematoma. A coleta será realizada por profissionais experientes.

**POTENCIAIS BENEFÍCIOS NA PARTICIPAÇÃO DESTE ESTUDO:** Não há benefício direto para o participante desse estudo. Porém, os resultados desses exames poderão ajudar a compreender os mecanismos que causam a infecção, podendo assim abrir caminho para novos estudos sobre essa doença, como o organismo humano se defende e por vezes orientar o tratamento.

**CONFIDENCIALIDADE:** Todas as informações colhidas e os resultados dos testes serão analisados em caráter estritamente científico, mantendo-se a confidencialidade do voluntário a todo o momento.

Em qualquer etapa do estudo você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas: Natália Estevam Gomes que pode ser encontrada no Laboratório de Virologia e Imunologia I, sito à Rua Pedro de Toledo, 781 - 15<sup>o</sup> andar, pelo telefone 5081-5394. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Botucatu, 572 - 1<sup>o</sup> andar cj 14. Fone: 5571-1062 – Fone/Fax: 5539-7162.

Após assinar o consentimento, você terá total liberdade de retirá-lo a qualquer momento e deixar de participar do estudo se assim o desejar.

Não há qualquer ônus financeiro para o voluntário que participar do estudo. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação.

Os dados e o material coletado somente serão utilizados para esta pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li, descrevendo o estudo “RESPOSTA DE NEUTRÓFILOS E MONÓCITOS DO SANGUE PERIFÉRICO AO LPS DE BACTÉRIAS LISAS E RUGOSAS”.

Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes.

Concordo voluntariamente em participar deste estudo.

\_\_\_\_\_ data \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_  
Voluntário

\_\_\_\_\_ data \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_  
Pesquisador Principal

### 11.3 Artigo científico

#### **Rough and Smooth LPS-induced expression of cell surface receptors and cell activation in neutrophils and monocytes in human whole blood**

Natália E. Gomes, Milena K. C. Brunialti, Marialice E. Mendes, Marina Freudenberg, Chris Galanos, Reinaldo Salomao.

Division of Infectious Diseases

Federal University of Sao Paulo, UNIFESP

Rua Pedro de Toledo nº 781, 15º andar

04039-032, Sao Paulo, SP, Brazil

Running title: Neutrophils response to R and S-LPS

#### **Abstract**

**Objective:** To compare the biological action of R form and S form LPS in human peripheral blood neutrophils and monocytes. **Methods:** Cell surface receptors modulation, ROS and NO production were evaluated on monocytes and neutrophils in whole blood, and NF-κB activation was evaluated in isolated neutrophils by flow cytometry after incubation with R and S-LPS. **Results:** A small enhancement of TLR4 expression was observed on monocytes with 6 h stimulation whereas no modulation of TLR2 was seen on either cell. Modulation of CD14 on monocytes was biphasic, with initial increment in the first hour followed by decreased expression at 6 h. Both LPS increased CD66b expression on neutrophils. Expression of CD11b was rapidly up-regulated on monocytes and neutrophils by both LPS, while down regulation of CXCR2 expression on neutrophils was observed after a few minutes, lasting for 6 h. S-LPS effect on neutrophils expression of CD11b, CD66b and CXCR2 receptors was a little earlier than the R-LPS effect. Both LPS induced low production of ROS and NO compared to other stimuli, as well as NF-κB translocation. **Conclusions:** A complex LPS-induced cell surface receptors modulation was seen on monocytes and neutrophils in human blood, with up and down regulation depending on the receptors evaluated. R for and S form LPS have similarly activated human neutrophils, despite the low expression of CD14 in those cells. While the presence of LBP and of sCD14 could provide the requirements for S-form LPS induction of neutrophils activity in whole blood, other receptors are also likely to be involved in LPS cell signaling in neutrophils

## Introduction

Interaction of the innate immune system with highly conserved microbial constituents is the basis of recognition of pathogens and induced cell activation. Lipopolysaccharide (LPS), one such constituent, is the major recognition marker common to gram-negative bacteria [1-3], triggering many of the pathogenic effects of these bacteria, and also inducing protective immune response [4, 5]. The interaction of LPS with cells of the innate immune system, such as neutrophils and monocytes, leads to the formation and release of mediators initiating inflammatory responses [3, 6] that may become overshadowed by an acute pathophysiological response with the clinical symptoms of septic shock [7-9].

LPS consists of a lipid A (responsible for toxicity of the molecule), a core polysaccharide and an O-polysaccharide of variable length [1]. Colony morphology ('smooth' versus 'rough') is indicative of O-glycosylation status. Microbial variants with long O-polysaccharide chains form smooth colonies, the most common type of LPS present in wild type (WT) bacteria, whereas those that lack an O-polysaccharide chain form rough colonies - hence the designations smooth and rough LPS [10]. Furthermore, the core-oligosaccharide may be present in different degrees of completion, depending on the class (Ra to Re) to which the mutant belongs [11]. Notably, LPS from WT bacteria are always highly heterogeneous mixtures of S-form LPS molecules and contain a varying proportion of R-form molecules lacking the O-specific chain [11].

Cell activation by LPS is mediated by the Toll-like receptor 4 (TLR4). For functional interaction with LPS, TLR4 requires association with myeloid differentiation protein 2 (MD-2) [12]. According to current consensus, activation of TLR4 is preceded by the transfer of LPS to membrane-bound (m) or soluble (s) CD14 by LPS-binding protein (LBP) [13-17]. Signalization by TLRs can occur by two mechanisms: MyD88-dependent and MyD88-independent. The former induces activation of mitogen-activated protein kinases (MAPKs), which belong to three families: p38, n-Jun N-terminal kinase (JNK) and extracellular regulated kinase 1/2 (ERK 1/2); and translocation of transcriptional factor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B). The MyD88-independent signaling also activates NF- $\kappa$ B, although on a late basis [18]. Both signaling are involved in burst oxidative and production of nitric oxide (NO) [19, 20].

Recently it has been shown that R-form LPS could interact with TLR4 without CD14 [11, 21]. R-form LPS and lipid A, but not S-form LPS, are capable of inducing TNF-alpha responses also in the absence of CD14 [21]. R-form LPS was a potent activator of mast cells (that lack of mCD14), while S-form LPS was practically devoid of stimulatory activity [11]. These works

indicated that the S-form is limited in its activating capacity to cells that express mCD14, while the R-form can stimulate all cells that express only TLR4/MD-2.

Human neutrophils, important effector cells of innate immune response, either lack or express low amounts of mCD14 on their surface. So, it became important to study whether LPS-induced neutrophil activation differs between S-LPS and R-LPS. In order to achieve this goal, we evaluated the modulation of cell surface receptors, neutrophils oxidative burst and production of nitric oxide, besides the activation of NF- $\kappa$ B after incubation with both types of LPS. The cell surface receptors evaluated included: CXCR2, a CXC chemokine receptor; TLR2 and TLR4, receptors involved in the recognition of bacteria; CD66b, a selectin with signalization functions, and CD11b and CD11c, integrins involved in the adhesion of neutrophils to the endothelium, besides signaling to LPS. Monocyte cells are the primary targets for LPS, playing an important role in the bridge between innate and adaptative immunity, used in the present study to compare the responses to both LPS forms in a cell expressing CD14.

## Materials and Methods

### Reagents

S-form *Salmonella abortus equi* and R-form LPS from *Salmonella minnesota* mutants (R595 (Re)), were extracted as previously described [10, 22]

Monoclonal antibodies used were the following: CD66b-fluorescein isothiocyanate (FITC), clone G10F5; CD14-peridinin-chlorophyll-protein (PerCP), clone M8P9; CD11b-allophycocyanin (APC), clone D12; CD11c-APC, clone S-HCL-3; CD15-APC, clone HI98 and CXCR2-APC, clone 6C6 obtained from BD Biosciences (San Jose, California, USA). TLR2-phicoeritrin (PE), clone TL2.1 and TLR4-PE, clone HTA125 obtained from eBioscience (San Diego, California, USA). p50-PE, clone sc-8414 and p65-PE, clone sc-8008 obtained from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, California, USA).

### Healthy Volunteers

The study was approved by the University Ethics Committee. Written informed consent was provided by volunteers. Blood samples from 21 volunteers were used in different experiments (mean age,  $28 \pm 7$  years; 38% men).

### Cell surface receptors expression in whole blood in response to R or S-LPS

Expression of cell surface receptors on monocytes and neutrophils was performed in whole blood, as previously described [23, 24]. Briefly, whole heparinized blood was incubated with either R form or S form LPS in polypropylene, sterile, round-bottom tubes at 37°C with 5% CO<sub>2</sub> with different concentrations of stimuli for dose response and during different periods of time for kinetics assays. Following incubation, one-hundred microliters of whole blood were added 2mL PBS and centrifuged at 2500g for 5 min at 4°C. After supernatants were discarded, cells were incubated with 2mL lysis solution (FACS lysing solution, BD Bioscience) for 15 min in the dark at room temperature, so red blood cells were ruptured, followed by centrifugation. Supernatants were discarded and 2mL PBS was added to each tube, followed by centrifugation. Then, pellets were incubated with fluorochrome-conjugated monoclonal antibodies for surface staining for 15 min in the dark at room temperature. Cells were stained with 6uL CD14-PerCP and 5uL CD66b-FITC, so monocytes and neutrophils could be identified, respectively. For kinetics, the tubes were also stained with 20 uL TLR4-PE and 2uL CD11b-APC (tube 1); 20 uL TLR2-PE and 2uL CD11c-APC (tube 2); or 2uL CXCR2-APC (tube 3). Dose-response assay was performed with CD11b-APC. Two milliliters of PBS was added to each tube, followed by centrifugation. Supernatants were discarded, and cells were resuspended in 0.3 mL PBS 1% sodium azide (Sigma, St Louis, Missouri, USA).

Events Acquisition and Analyses was performed using the CellQuest software (BD Bioscience) in a FACSCalibur 4-color flow cytometer (BD Bioscience). Monocyte analyses were carried out by using forward and side scatter parameters combined with CD14-positive and CD66b-negative stained cells, neutrophils analyses were performed using forward and side scatter parameters combined with CD66b-positive and CD14-negative stained cells. The surface receptor expression was measured as the geometric mean fluorescence intensity (GMFI).

### Analysis of oxidative burst in whole blood after stimulation with R or S-LPS

Oxidative burst was quantified by measuring the oxidation of 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA, Sigma) in whole blood [25, 26]. Tubes containing 100 uL of whole blood, stimuli, 200 uL of 0,3mM DCFH-DA and PBS to complete 1mL were incubated in a 37°C shaking water bath during 30 min. Thereafter, 2mL of 3mM EDTA (Sigma) was added to each tube followed by centrifugation (at 250g for 5 min at 4°C). Hypotonic lyses in saline (0.2% and 1.6%, Merck, Frankfurter, Darmstadt, Germany) were performed followed by centrifugation. Finally, the

supernatant was discarded and the pellets were stained with 5uL CD14-PerCP. After centrifugation, the pellets were suspended in 0.3mL PBS to flow cytometric analysis. Neutrophils in whole blood were characterized by side scatter and forward scatter parameters and negativity for CD14 and monocytes by side scatter and forward scatter parameters and positively staining for CD14. ROS generation was shown in histograms and expressed as the GMFI.

#### Analysis of nitric oxide production in whole blood after stimulation with R or S-LPS

NO production was quantified by measuring the oxidation of 4-amino-5-methylamino- 2',7'-difluorofluorescein diacetate (DAF-FM DA, Invitrogen, Carlsbad, California, USA) in whole blood, modified from Zelnickova et al. [27]. Tubes containing 80 uL of whole blood, stimuli, 24uL of 0.05mM DAF-FM DA and PBS to complete 120 uL were incubated in a 37°C shaking water bath during 30 min. Thereafter, 2mL PBS was added to each tube followed by centrifugation (at 250g for 5 min at 4°C). Hypotonic lyses in saline were performed followed by centrifugation. Finally, the supernatant was discarded and 5uL CD14-PE and 5uL CD15-APC were added in the pellets. The samples were incubated in the dark at room temperature for 15 min. After centrifugation, the pellets were suspended in 0.3mL PBS to flow cytometric analysis. Neutrophils in whole blood were characterized by side and forward scatter parameters and positively staining for CD15 and monocytes by side and forward scatter parameters and positively staining for CD14. NOS generation was shown in histograms and expressed as the GMFI.

#### Analysis of NF- $\kappa$ B subunits p50 and p65 translocation to nucleus after neutrophils stimulation with R or S-LPS

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from heparinized blood were excluded by the ficoll density gradient method (ficoll-paque plus, Amersham Bioscience GE Healthcare, Uppsala, Sweden). Neutrophils (PMN) were further purified by phosphate-buffered saline (PBS) 3% dextran (Amersham), erythrocytes were lysed with hypotonic saline solution and the cells were suspended in RPMI 1640 medium (Sigma) supplemented with 5% human AB serum (Valley Biomedical, Inc., Winchester, Virginia, USA), 10 IU/mL penicillin, 10 2g/mL streptomycin (Gibco, Gaithersburg, Maryland, USA), and 200 mM L-glutamine (Sigma). The cells viability and count were made with trypan blue dye (Sigma) using a hemocytometer

chamber. Cytospin and Giemsa staining revealed 97.1% purity for PBMC and 94.5% for neutrophils.

Nuclear binding of NF- $\kappa$ B was quantified by flow cytometry based on the method of Nakamori et al. [28] and Garcia-Garcia & Rosales [29]. Briefly, PMNs were isolated as described above and  $2 \times 10^6$  PMNs were prepared for each analysis, stimulated or not with 100ng/ $2 \times 10^6$  cells R or S-LPS during 30 min. Cells were fixed by adding 2mL PBS 1% paraformaldehyde (Polysciences, Inc., Warrington, Pennsylvania, USA) and 2mL PBS was added quickly after 2min and the preparation was centrifuged at 600g for 5 min at 4°C. Samples were washed in 2mL PBS and centrifuged. The supernatants were discarded, and cells were washed in 3mL citrate buffer (pH 7.6; 250mmol/L sucrose (Sigma), 40mmol/L trisodium citrate (Sigma), 5% dimethylsulfoxide (Calbiochem, San Diego, California, USA). After centrifugation, the fixed PMN pellet was obtained. To lyse the cytosol, cells were treated with 100 uL lysing buffer (pH 7.6; 3.4mmol/L trisodium citrate; 0.1% Nonidet P-40 (ICN Biomedicals, Irvine California, USA), 0.2% trypsin (Sigma), 1.5 mmol/L spermine tetrachloride (Sigma), 0.5 mmol/L Tris (Invitrogen)) for 10 min at 32°C. Trypsin inhibitor 1x (80 uL, Sigma) was added to stop the proteolysis, and PBS 4% paraformaldehyde (2mL) was added to fix the nuclei for 20 min. After centrifugation at 800g for 10 min at 4°C, the supernatant was discarded. The nuclear pellet was then permeabilized with 100 uL of 0.1% triton X-100 (Sigma) in PBS 4% paraformaldehyde for 10 min. Then, 2mL PBS was added and the samples were centrifuged. The nuclear pellets were washed in 2mL wash buffer (PBS containing 0.5% bovine serum albumin and 0.05% Tween-20 (Invitrogen) to block nonspecific binding. Ten microliters of anti-p65 or anti-p50/ $1 \times 10^6$  cells and 5uL of 7-AAD (BD Biosciences) were added. After 30 min incubation at room temperature, the nuclei were washed in 2mL wash buffer. After centrifugation, supernatants were discarded and the pellet suspended in 0.3mL PBS 1% paraformaldehyde to flow cytometric analysis. The nuclei acquisition was similar to cells acquisition, with 10,000 events being acquired combining nuclei morphology and positivity for 7-AAD. NF $\kappa$ B p50 and p65 translocation were analyzed on histograms and the results expressed as to the ratio of LPS-stimulated cells and control.

Nucleus isolation was confirmed by using fluorescent microscopy and HE staining.

### Statistical Analysis

Results were presented as means and compared using analyses of variance (ANOVA) and the Post Hoc Tukey honestly significant difference (HSD) test. The software used was SPSS 13.0 for Windows (Chicago, Illinois, USA).

## Results

### 1. LPS-induced modulation on cell surface receptors expression in whole blood

#### 1.1 Surface receptors on monocytes

An R and S-LPS 100ng/mL dose was used for kinetics of cell surface receptors expression based on dose response assays (figure 1). A weak modulation of TLR4 expression by R or S-LPS was found on monocytes after 6 h ( $p=0.039$ , figure 2A). However, TLR2 expression was not modulated by either form of LPS during 24 h stimulation (data not shown). CD14 expression on monocytes showed LPS-induced modulation in a biphasic manner (figure 2B). There is a difference among control, R-LPS and S-LPS groups after 15, 30 and 360 min ( $p=0.034$ ;  $p=0.050$  e  $p<0.001$ ; respectively). Post Hoc analysis showed that the difference seen with 15 min was between control and S-LPS ( $p=0.037$ ), with 30 min between control and R-LPS ( $p=0.059$ ) and with 360 min between control and both R-LPS ( $p<0.001$ ) and S-LPS ( $p<0.001$ ). An increase of around 30% of CD14 expression was found at initial times, followed by a 40% decrease after 6 h of stimulation. Kinetics with longer times of stimulation (6 h, 10h, and 24 h) showed persistently decreased CD14 expression (data not shown).

Expression of CD11b was enhanced in monocytes at all times studied ( $p<0.001$  with 15, 30, 60 and 180 min and  $p=0.002$  with 360 min), with a 2-fold increase following 5 min and a 4-fold increase following 6 h incubation in stimulated monocytes when compared with controls (figure 2C). It can be noticed that both R and S-LPS act in a similar manner. R and S form LPS-induced CD11c expression on monocytes reached no statistical significance compared with controls (figura 2D).

#### 1.2 Surface receptors in neutrophils

TLR4 expression was not modulated by R or S-LPS (data not shown), even when cells were stimulated for a longer time (10 and 24 h, data not shown). This was also true for TLR2 expression (data not shown).

CD14 surface expression on neutrophils is widely reduced as compared with monocytes (GMFI around 30 in neutrophils compared to higher than 120 in monocytes). So, neutrophils have little expression or do not express CD14 on their surface, and its expression was not modulated by either R or S-LPS (data not shown).

Modulation by R and S-LPS of CXCR2 expression on neutrophils was negative (figure 3A), reaching around 50% reduction following 6 h incubation. The difference can be observed from 15 min to 6 h ( $p=0.028$ ,  $p=0.023$ ,  $p=0.006$ ,  $p=0.001$  and  $p<0.001$ , with 15, 30, 60, 180 e 360 min, respectively). S-LPS seems to have an earlier effect ( $p=0.026$ ,  $p=0.023$ ,  $p=0.008$ ,  $p=0.003$ ,  $p<0.001$ , following 15 to 360 min of incubation), while R-LPS was significantly different from control after 60 min ( $p=0.020$ ,  $p=0.003$ ,  $p<0.001$ ; following 60, 180 and 360 min, respectively).

CD66b expression on neutrophils was up regulated by R and S-LPS, with statistical significance after 180 and 360 min of incubation ( $p=0.028$  and  $p=0.006$ , respectively). This expression was 2-fold higher after 180 min and 3-fold after 360 min in stimulated neutrophils when compared with controls. S-LPS seems to have an earlier effect in inducing CD66b expression, as shown in figure 3B. CD66b expression on stimulated cells remained elevated in relation to controls after longer incubation periods (10 and 24 h, data not shown).

CD11b expression on neutrophils was up regulated after 15 min of incubation with stimuli, when its expression was 2-fold higher compared with control (figure 3C). The expression continued high, and it was 4-fold compared with controls in 3 and 6 h ( $p=0.003$  and  $p=0.002$  with 15 and 30 min,  $p<0.001$  with 180 and 360 min). LPS-induced up-regulation persisted after 10 and 24 h of stimuli (data not shown). When Tukey's test was performed, both LPS forms showed activity - S-LPS ( $p=0.002$ ,  $p=0.002$ ,  $p<0.001$ ,  $p<0.001$ ,  $p<0.001$  with 15, 30, 60, 180 and 360 min) and R-LPS ( $p=0.028$ ,  $p<0.001$ ,  $p<0.001$ ,  $p<0.001$  with 30, 60, 180 and 360 min) – with the S form presenting a little earlier activation (15 min) and both inducing similar expression after 180 min (Figure 3C). CD11c expression was smaller than CD11b expression on neutrophils, and its up-regulation by stimuli reached no significance (figure 3D).

## 2. ROS production by monocytes and neutrophils in whole blood

A dose response curve of ROS production by monocytes and neutrophils in whole blood was generated with crescent doses of R and S-LPS. As depicted in figure 4, an increment of ROS production was seen in monocytes (figure 4A) and neutrophils (figure 4B) with increasing amounts of LPS.

## 3. NO production by monocytes and neutrophils in whole blood

NO production by monocytes and neutrophils in whole blood was performed with 100ng/mL R-LPS or S-LPS stimuli for 30 min. An enhanced NO production was seen in monocytes (figure 5A) ( $p=0.019$ ), and Post Hoc analyses showed a difference between control

and R-LPS ( $p=0.042$ ) and control and S-LPS ( $p=0.024$ ). No LPS-induction was seen in neutrophils (figure 5.B).

#### 4. LPS-induced NF- $\kappa$ B mobilization in isolated neutrophils

The translocation of p50 and p65, NF $\kappa$ B subunits, to nuclei was measured in isolated nuclei from neutrophils after stimulation with 100ng R-LPS or S-LPS/ $2 \times 10^6$  cells for 30 min. p50 and p65 translocation was induced by both LPS forms, yet significance was reached only for p50 after 30 min between control and S-LPS (figure 6).

### **Discussion**

Recent papers have pointed out that the LPS may trigger cellular signaling via TLR4, dependent or independent of CD14. While the S form LPS signaling was restricted to TLR4 and CD14, the R form LPS was demonstrated to signal both via a dependent and independent CD14 pathway. Since many host cells lack CD14 on their surface, R form LPS from mutant bacteria or its contents in S form LPS mixtures from smooth bacteria would represent a bacterial compound with a much wider biological activity. Considering the discrepant CD14 expression on monocytes and neutrophils we evaluated whether LPS bioactivity would differ between both LPS forms in those cells. Our results show that S form and R form LPS induce similar responses in human neutrophils.

Furthermore, we were interested in evaluating the LPS-induced modulation of a wide range of cell surface receptors on human monocytes and neutrophils, involved in bacterial recognition, chemotaxis, and cell to cell interactions, in whole blood, thus preserving the micro-environment of *in vivo* LPS and cell interactions.

CD14 modulation on monocytes was biphasic, with initial increase by both LPS by 30 min, returning to baseline expression and decrease at posterior times. Some authors have shown different CD14 modulations, such as unaltered response of PBMC after S-LPS during 120 min [30], biphasic pattern in PBMC cells with reduced expression after 3 and 6 h of incubation, similar to our results, followed by a sharp increase (24 and 44 h) [31], while others have described a positive modulation of CD14 on whole blood monocytes with incubation during 4 h [32]. We observed that both LPS forms induced the same pattern of CD14 modulation on monocytes. Since CD14 is one of the main LPS receptors on the cells surface, our data and further ones previously published indicate that LPS can modulate its own response in those cells. On the other hand, we found either low or no CD14 expression on neutrophils and that such is no

different upon the presence of LPS, which is not a consensus in the literature. Some authors claim CD14 to be present in PMN, however, in a smaller amount than in monocytes [33]. Within the same context, some showed positive modulation of CD14 expression on neutrophils by LPS [34-37], while others showed no such effect [38].

Previous data are contradictory about TLR4 modulation by LPS. Our data show that TLR4 expression was modulated only by R-LPS in 6 h on monocytes, without any modulation on neutrophils. Kurt-Jones et al. [33] showed reduced TLR4 expression on isolated monocytes after 2h of S-LPS stimulus, and either not seen or smaller expression on isolated neutrophils. Husebye et al. [39] showed down-regulation of TLR4 on isolated monocytes during initial times of incubation with S-LPS, accompanied by formation of endosom similar structures.

Our data revealed CXCR2 reduction on neutrophils after incubation with both LPS, a finding previously shown by other authors in response to S-LPS [40, 41]. Both R and S-forms LPS have similar action, but S-LPS seems to have an earlier effect. The reduction of CXCR2 expression may be a tentative by the host to limit inflammation, but Sabroe et al. [42] showed that even reduced, the receptors were still functional.

Both LPS forms induced great expression of CD66b on the neutrophils surface, with the S-form inducing a little earlier. The modulation of this selectin is important for the adhesion of those cells to the endothelium, and then for their migration to the tissues. We found no further studies that saw modulation of this receptor on the neutrophils surface by LPS. The positive modulation shows that the neutrophils, when activated by LPS, can migrate to the tissues, where they play a role in innate immunity. As known, adhesion is mediated also by  $\beta$ 2 integrins (composed of CD18 and CD11 (a, b or c)) [42]. We found CD11b expression to be up-regulated by both LPS forms on monocytes and neutrophils, and again S-LPS seems to have an earlier action. Haugen et al. [43], using S-LPS (100ng/mL), found an initial CD11b increase for nearly 1 h followed by a decrease after 6 h in monocytes and neutrophils, but our results show that in 6 h the expression is still up regulated. Zhou et al. [44] suggested that LPS can amplify its response because of CD11b. Interesting is the fact that besides playing a role in migration, CD11b/CD18 had already been suggested as an LPS receptor in human macrophages [45], and recently CD11b/CD18 was found not to be necessary for LPS-induced responses, but that it plays a significant role in the optimal response [46]. A transient association between CD14 and CD11b/CD18 was reported in neutrophils after LPS stimulation [47].

CD11c is more expressed on monocytes and plays an important role in various adhesive process [48]. In neutrophils, CD11c plays a minor role. Our data show up-regulation on

monocytes and neutrophils surfaces by both LPS, but no difference in statistics could be seen. Haughen et al. [43] showed maximum CD11c expression after 6 h incubation with S-LPS, followed by a decrease.

Altogether, following LPS stimulation in whole blood we found a decreased expression of CXCR2, the chemokines receptor, and increased CD11b and CD66b expression, which play a leading role in adhesion and migration of leukocytes through the endothelium, on neutrophils. On monocytes a transient increase, followed by decreased expression of CD14 was observed in parallel with increased expression of CD11b. In both cells only a minor modulation was observed in TLR2 and TLR4 receptors. The enhanced co-expression of CD11b and CD14 on monocytes might indicate an up-regulation of recognizing and signaling receptors in the initial response to LPS, while the decreased CD14 and the persistently increased expression of CD11b might privilege adhesion properties. The enhanced expression of CD66b and CD11b on neutrophils also seems to indicate an enhanced capacity of migration and adhesion, which somehow contrasts with the decreased expression of CXCR2.

The present findings of LPS-induced cell surface modulation on monocytes are similar to our previous results in septic patients [23], when we found no difference on monocyte TLR2, TLR4 and CD11c expression among patients with sepsis and healthy volunteers, and found a reduction on CD14 and up-regulation of CD11b expression in septic patients. In the same set of patients we found up-regulation of CD66 expression and a trend towards down regulation of TLR2 on neutrophils [24], while no modulation was seen on CD11b and CD11c, thus contrasting with the in vitro LPS-response. Our ex-vivo study was performed in whole blood, thus providing the micro-environment of LPS-cell interaction in vivo. However, an ex-vivo experiment is far less complex than the in vivo response, and might miss important interaction with other cells or mediators produced by them. Moreover, in clinical sepsis blood samples are collected based on clinical manifestations and the time lag between infectious insult and sampling might not be uniform in different individuals.

Other responses can be elicited by LPS, such as ROS and NO generation and intracellular protein activation. Despite the good results obtained with monocytes and neutrophils in dose response assays, ROS production by LPS was not consistent in all experiments and it is not a consensus in the literature. Myhre et al. [49] suggested that DCFH is sensible to oxidation by ONOO<sup>-</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (in combination with cellular peroxidases), peroxidases and hidroxil, while it is not good to measure NO, HOCl or superoxide in biological systems. They suggest that various methods should be used for identification of ROS. Liaudet et al. [50] showed that LPS from *Salmonella enterica senovar* induced little oxidative burst, while Munaka et al. [51] showed

production of superoxide by LPS from *E. coli*. Ruchaud-Sparagano et al. [53] showed superoxide production by neutrophils in response to R and S-LPS with 15 or 30 min. Interestingly, Kapp et al. [52], using lucigenin-dependent chemiluminescence for the detection of oxygen radicals showed that only R-LPS was capable of a robust neutrophils activation. We may have missed this activity by the method of detection used, and found a weak and similar ROS generation with R and S-LPS by DCFH oxidation.

R and S-LPS induced NO production by monocytes after 30 min of stimulation, while no detection was seen in neutrophils in whole blood. Klink et al. [54] saw no stimulation of neutrophils production by S, Ra or Re-form LPS in any dose or time used., as our results. The low LPS-induced production of NO in these experiments might reflect the difficulties in detecting NO activity in human cells since LPS is one of the main inducers of NO synthase in inflammatory cells [55].

Translocation of p50 and p65 to nuclei was seen in the first 30 min, in agreement with other authors [56-58]. TLR4 response is greatly dependent on the NF $\kappa$ B activation, and it leads to cytokine [59], NO and ROS production [60]. It is important to have in mind that post-transcriptional regulation does exist and that it can involve NF $\kappa$ B and ROS [59].

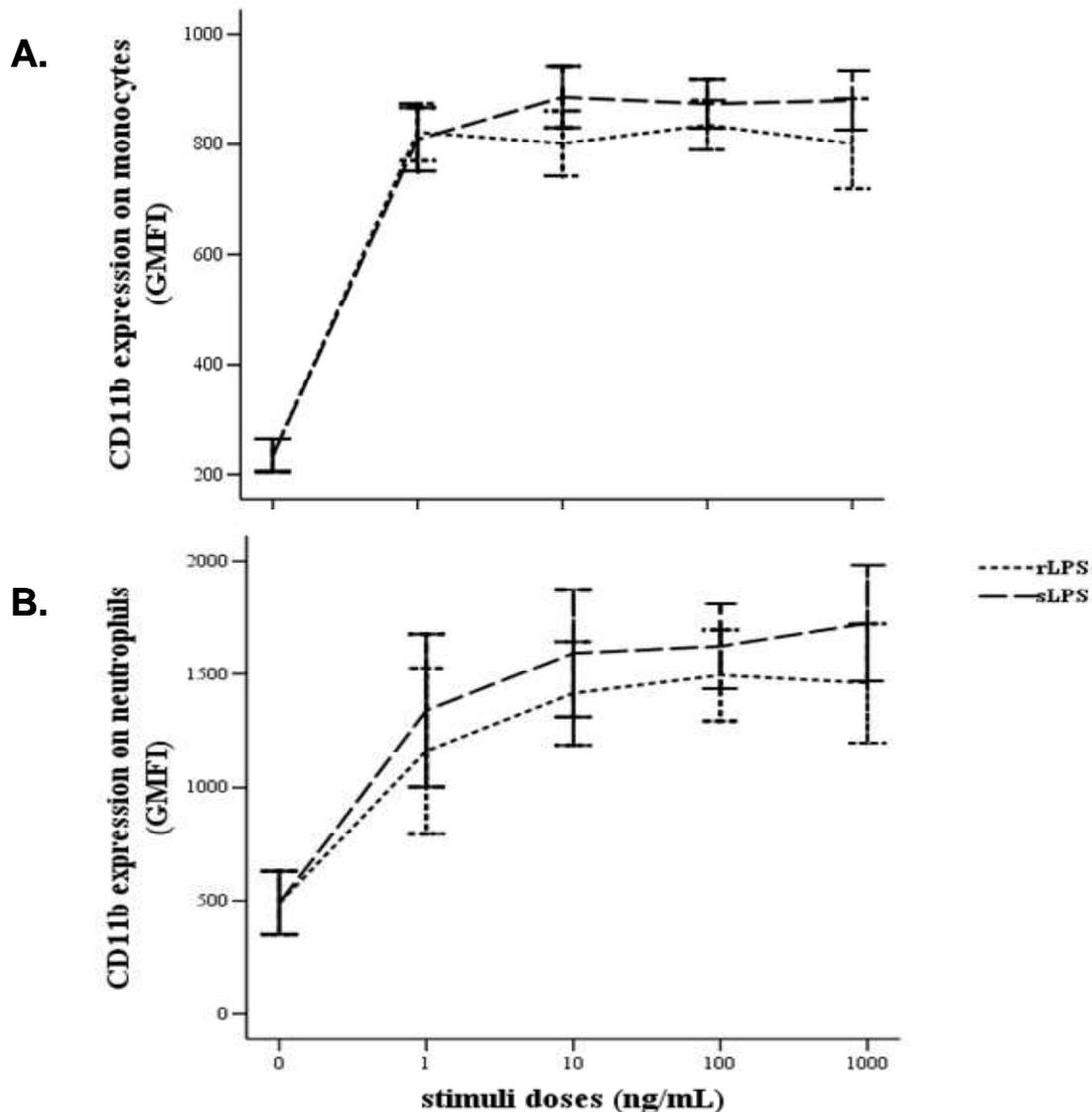
Overall, our results fail to support our initial hypothesis that R-form LPS could induce stronger human neutrophils activity than S-form LPS. Instead, regarding LPS modulated expression of cell surface receptors we saw an even earlier activation by S-LPS. The experiments were performed in whole blood, so plasma proteins could play a role in LPS-cell interaction and induced activity. The presence of LBP as well as of sCD14 in whole blood could provide the requirements for S-form LPS induction of neutrophils activity. In this context, the presence of low amounts of mCD14 on neutrophils would suffice for cell signaling. The up-regulation of CD11b on neutrophils, observed during the first minutes of LPS incubation, in concert with CD14 and TLR expression, even at low levels, could also play a role in optimizing the LPS sensing by neutrophils, as demonstrated by Perera et al. in murine macrophages.(Perera... Vogel, 2001). These conditions differ from the experimental one in which bone-marrow derived mast cells, which lack CD14, responded to R-LPS and not to S-LPS. Even these cells, however, could be activated by S-forms in the presence of high concentration of sCD14 (Huber, Marina, Chris 2006). Additionally, it may also be considered that LPS may signal through other cell receptors, such as CD11c/CD18 (Ingals and Golenbock 1995) and L-selectin (Malhotra et al 1996).

In conclusion, our work present a comprehensive LPS-induced cell surface receptors modulation on monocytes and neutrophils in human whole blood, with up and down regulation

depending on the receptors. Also, we found a similar response to R and S-type LPS chemotypes in neutrophils, despite the low expression of CD14 in these cells.

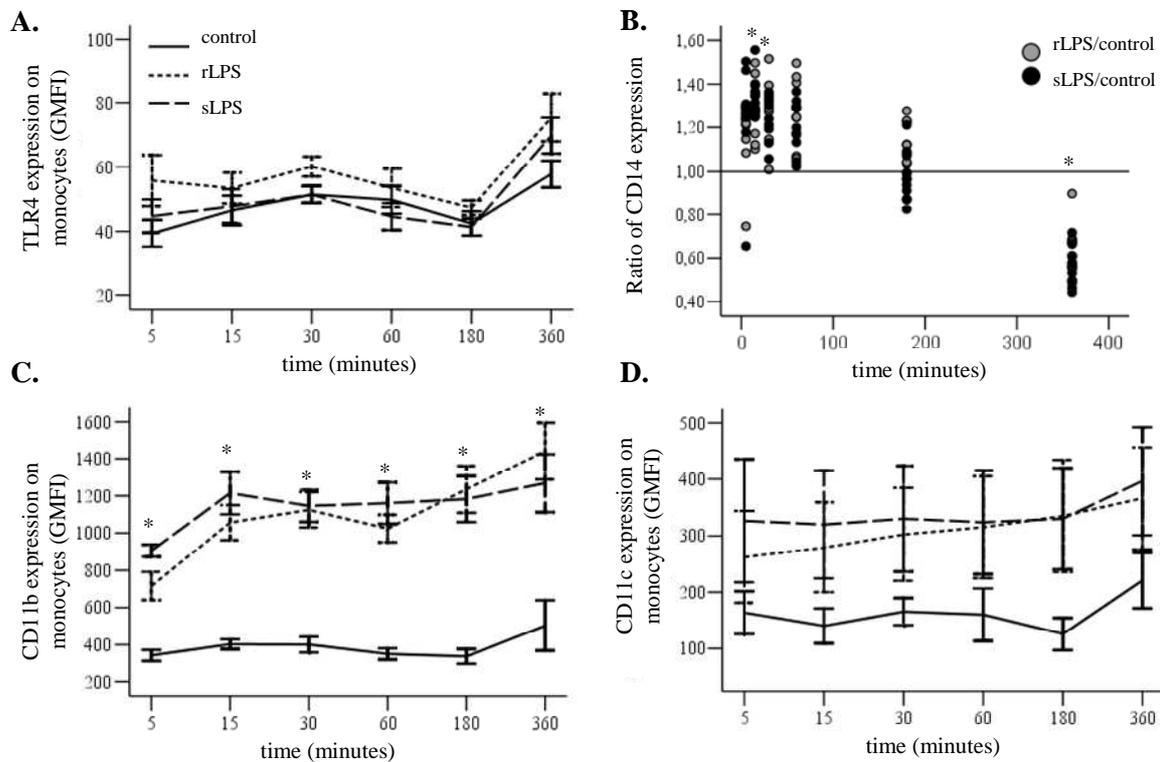
### Acknowledgements

We thank Dr. Ricardo P. Bertolla and Pedro L. A. Scherholz for the kind assistance with fluorescence microscopy.

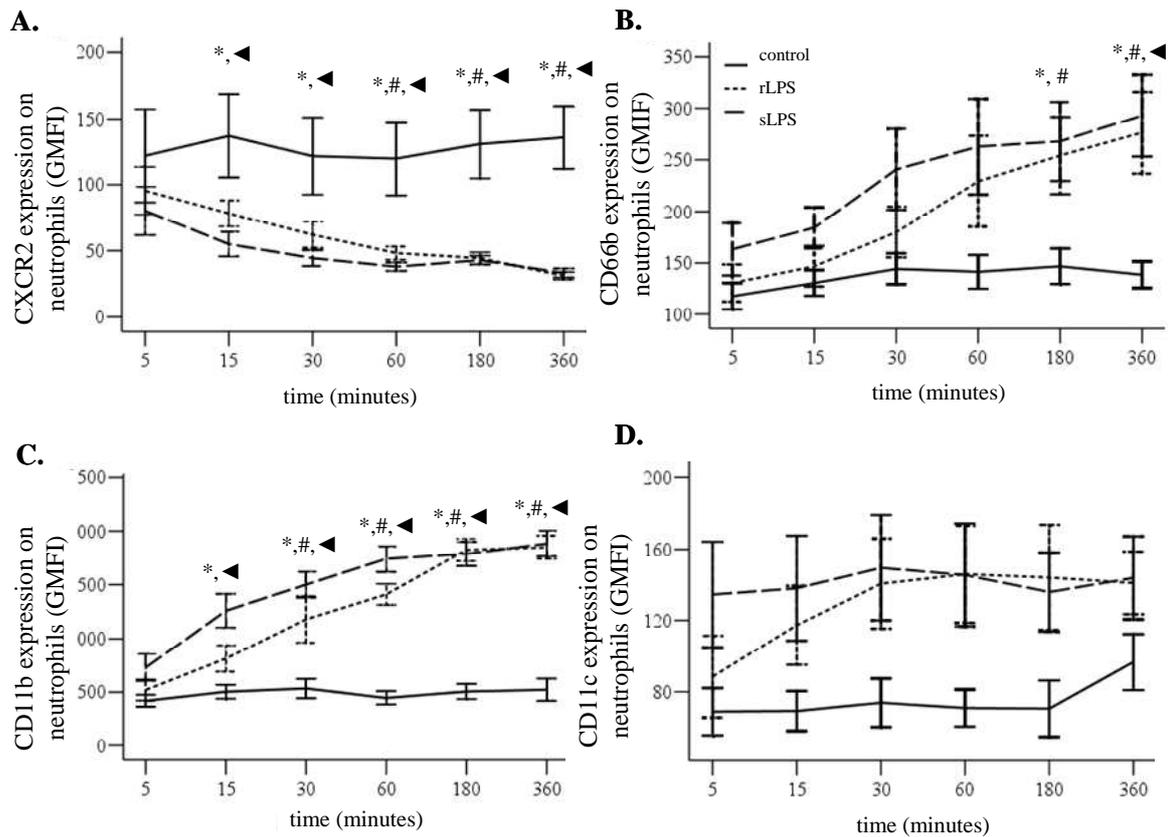


**Figure 1:** Dose responses curves. **A.** CD11b on monocytes surface in response to different doses of R or S-LPS (0, 1, 10, 100 or 1000 ng/mL) during 30 minutes. Monocytes were gated based on forward and side scatter parameters and positivity for CD14 staining. The cell surface receptor expression is measured as GMFI and presented as media and standard error for each time point. **B.** CD11b on neutrophils surface in response to different doses of R or S-LPS (0, 1, 10, 100 or 1000 ng/mL) during 30 minutes. Neutrophils were gated based on forward and side scatter

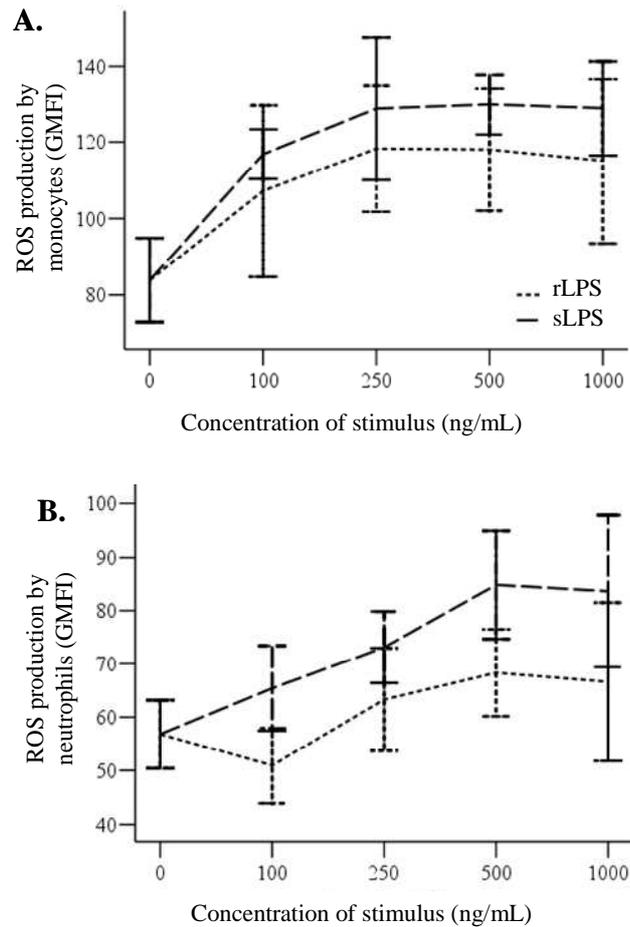
parameters and positivity for CD66b staining. The cell surface receptor expression is measured as GMFI and presented as media and standard error for each time point. Results obtained from 4 individuals,



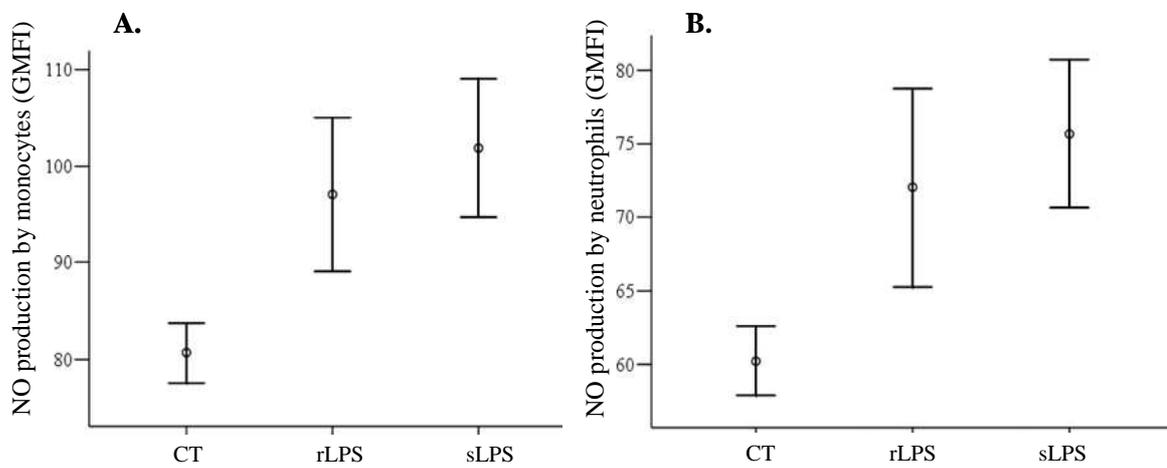
**Figure 2:** Receptors surface expression on monocytes in whole blood after incubation with medium (control) or 100ng/mL of rLPS and sLPS. **A.C.D** Monocytes were gated based on forward and side scatter parameters and positivity for CD14 staining. The cell surface receptor expression is measured as geometric mean fluorescence intensity (GMFI) and presented as media and standard error for each time point. **B.** Monocytes were gated based on forward and side scatter parameters and CD14 represented as the ratio of CD14 expression between stimulated cells and controls. **A.** TLR4 expression, results obtained from 4 individuals. **B.** CD14 expression, results obtained from 10 healthy volunteers are shown. **C.** CD11b expression, results obtained from 5 individuals; and **D.** CD11c expression, results obtained from 4 individuals. \* $p \leq 0.05$  in comparison among groups (ANOVA).



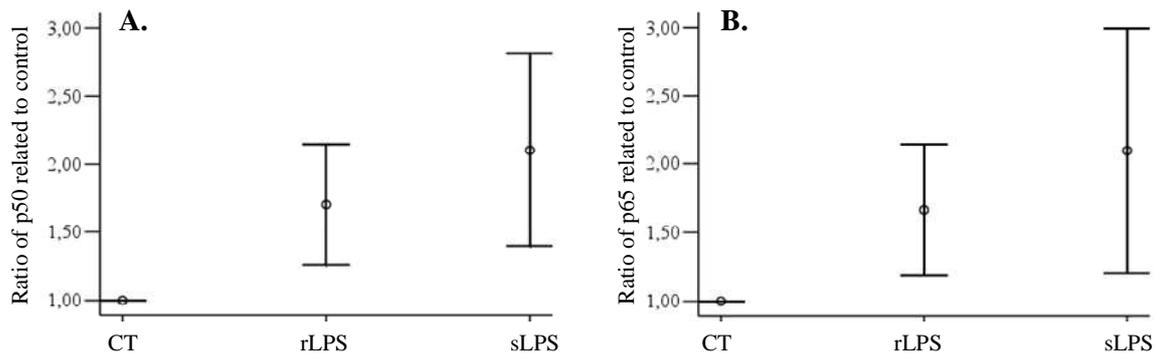
**Figure 3:** Receptors surface expression on neutrophils after incubation with medium (control) or 100ng/mL of R-LPS and S-LPS. **A.C.D** Neutrophils were gated based on forward and side scatter parameters and positivity for CD66b staining. The cell surface receptor expression is measured as GMFI and presented as media and standard error for each time point. **B.** Neutrophils were gated based on forward and side scatter parameters and CD66b expression is measured as geometric mean fluorescence intensity (GMFI) and presented as media and standard error for each time point. **A.** CXCR2 expression, results obtained from 6 individuals. **B.** CD66b expression, results obtained from 9 individuals. **C.** CD11b expression, results obtained from 4 individuals. **D.** CD11c expression, results obtained from 4 individuals. \* $p \leq 0.05$  in comparison among groups (ANOVA), # $p \leq 0.05$  when compared rLPS and controls (Tukey's Post Hoc) and ◄ $p \leq 0.05$  when compared sLPS and controls (Tukey's Post Hoc).



**Figure 4:** ROS production by monocytes and neutrophils in response to different concentrations of R or S-LPS (0, 100, 250, 500 and 1000ng/mL), with incubation during 30 min. **A.** Monocytes were gated based on forward and side scatter parameters and positivity for CD14 staining. The ROS production is measured as geometric mean of fluorescence intensity (GMFI) of DCF and presented as media and standard error for each concentration. Results obtained from 3 individuals. **B.** Neutrophils were gated based on forward and side scatter parameters and negativity for CD14 staining. The ROS production is measured as GMFI and presented as media and standard error for each concentration. Results obtained from 3 individuals.



**Figure 5:** NO production by monocytes and neutrophils after incubation with medium (control) or 100ng/mL of rLPS and sLPS during 30 min. **A.** Monocytes were gated based on forward and side scatter parameters and positivity for CD14 staining. The NO production is measured as geometric mean of fluorescence intensity (GMFI) of benzotriazolic derivate and presented as media and standard error for each stimulus. Results obtained from 7 individuals. **B.** Neutrophils were gated based on forward and side scatter parameters and positivity for CD15 staining. The NO production is measured as GMFI and presented as media and standard error for each concentration. Results obtained from 7 individuals.



**Figure 6:** p50 and p65 translocation to neutrophils nuclei after incubation during 30 min with medium (control) or 100ng of rLPS or sLPS/2x10<sup>6</sup> cells. Neutrophils were isolated from whole blood, nuclei were isolated and stained with 7-AAD and p65 or p50 as described in Methods. The p50 (**A.**) and p65 (**B.**) translocation are represented as the ratio of p50 or p65 between stimulated cells and controls. Data is presented as media and standard error for each stimulus. Data obtained from 3 individuals.

## References

1. Galanos, C., Freudenberg, M.A., Luderitz, O., Rietschel, E.T., Westphal, O. (1979) Chemical, physicochemical and biological properties of bacterial lipopolysaccharides. *Prog Clin Biol Res* **29**, 321-32.
2. Alexander, C., Rietschel, E.T. (2001) Bacterial lipopolysaccharides and innate immunity. *J Endotoxin Res* **7**, 167-202.
3. Freudenberg, M.A., Merlin, T., Gumenscheimer, M., Kalis, C., Landmann, R., Galanos, C. (2001) Role of lipopolysaccharide susceptibility in the innate immune response to *Salmonella typhimurium* infection: LPS, a primary target for recognition of Gram-negative bacteria. *Microbes Infect* **3**, 1213-22.
4. O'Brien, A.D., Rosenstreich, D.L., Scher, I., Campbell, G.H., MacDermott, R.P., Formal, S.B. (1980) Genetic control of susceptibility to *Salmonella typhimurium* in mice: role of the LPS gene. *J Immunol* **124**, 20-4.
5. Rosenstreich, D.L., Weinblatt, A.C., O'Brien, A.D. (1982) Genetic control of resistance to infection in mice. *Crit Rev Immunol* **3**, 263-330.
6. Beutler, B., Hoebe, K., Du, X., Ulevitch, R.J. (2003) How we detect microbes and respond to them: the Toll-like receptors and their transducers. *J Leukoc Biol* **74**, 479-85.

7. Karima, R., Matsumoto, S., Higashi, H., Matsushima, K. (1999) The molecular pathogenesis of endotoxic shock and organ failure. *Mol Med Today* **5**, 123-32.
8. Ginsburg, I. (2002) The role of bacteriolysis in the pathophysiology of inflammation, infection and post-infectious sequelae. *Apmis* **110**, 753-70.
9. Martins, P.S., Brunialti, M.K., da Luz Fernandes, M., Martos, L.S., Gomes, N.E., Rigato, O., Salomao, R. (2006) Bacterial recognition and induced cell activation in sepsis. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* **6**, 183-91.
10. Galanos, C., Luderitz, O., Westphal, O. (1979) Preparation and properties of a standardized lipopolysaccharide from salmonella abortus equi (Novo-Pyrexal). *Zentralbl Bakteriol [Orig A]* **243**, 226-44.
11. Huber, M., Kalis, C., Keck, S., Jiang, Z., Georgel, P., Du, X., Shamel, L., Sovath, S., Mudd, S., Beutler, B., Galanos, C., Freudenberg, M.A. (2006) R-form LPS, the master key to the activation of TLR4/MD-2-positive cells. *Eur J Immunol* **36**, 701-11.
12. Kimoto, M., Nagasawa, K., Miyake, K. (2003) Role of TLR4/MD-2 and RP105/MD-1 in innate recognition of lipopolysaccharide. *Scand J Infect Dis* **35**, 568-72.
13. Wright, S.D., Ramos, R.A., Tobias, P.S., Ulevitch, R.J., Mathison, J.C. (1990) CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science* **249**, 1431-3.
14. Ulevitch, R.J., Tobias, P.S. (1995) Receptor-dependent mechanisms of cell stimulation by bacterial endotoxin. *Annu Rev Immunol* **13**, 437-57.
15. Tapping, R.I., Tobias, P.S. (2000) Soluble CD14-mediated cellular responses to lipopolysaccharide. *Chem Immunol* **74**, 108-21.
16. Kitchens, R.L., Thompson, P.A., Viriyakosol, S., O'Keefe, G.E., Munford, R.S. (2001) Plasma CD14 decreases monocyte responses to LPS by transferring cell-bound LPS to plasma lipoproteins. *J Clin Invest* **108**, 485-93.
17. Hamann, L., Alexander, C., Stamme, C., Zahringer, U., Schumann, R.R. (2005) Acute-phase concentrations of lipopolysaccharide (LPS)-binding protein inhibit innate immune cell activation by different LPS chemotypes via different mechanisms. *Infect Immun* **73**, 193-200.
18. Takeda, K., Akira, S. (2005) Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol* **17**, 1-14.
19. Beutler, B., Rietschel, E.T. (2003) Innate immune sensing and its roots: the story of endotoxin. *Nat Rev Immunol* **3**, 169-76.
20. Kim, J.W., Kim, C. (2005) Inhibition of LPS-induced NO production by taurine chloramine in macrophages is mediated through Ras-ERK-NF-kappaB. *Biochem Pharmacol* **70**, 1352-60.
21. Jiang, Z., Georgel, P., Du, X., Shamel, L., Sovath, S., Mudd, S., Huber, M., Kalis, C., Keck, S., Galanos, C., Freudenberg, M., Beutler, B. (2005) CD14 is required for MyD88-independent LPS signaling. *Nat Immunol* **6**, 565-70.
22. Galanos, C., Luderitz, O., Westphal, O. (1969) A new method for the extraction of R lipopolysaccharides. *Eur J Biochem* **9**, 245-9.
23. Brunialti, M.K., Martins, P.S., Barbosa de Carvalho, H., Machado, F.R., Barbosa, L.M., Salomao, R. (2006) TLR2, TLR4, CD14, CD11B, and CD11C expressions on monocytes surface and cytokine production in patients with sepsis, severe sepsis, and septic shock. *Shock* **25**, 351-7.
24. Martins, P.S., Brunialti, M.K., Martos, L.S., Machado, F.R., Assuncao, M.S., Blecher, S., Salomao, R. (2008) Expression of cell surface receptors and oxidative metabolism modulation in the clinical continuum of sepsis. *Crit Care* **12**, R25.
25. Bass, D.A., Parce, J.W., Dechatelet, L.R., Szejda, P., Seeds, M.C., Thomas, M. (1983) Flow cytometric studies of oxidative product formation by neutrophils: a graded response to membrane stimulation. *J Immunol* **130**, 1910-7.

26. Martins, P.S., Kallas, E.G., Neto, M.C., Dalboni, M.A., Blecher, S., Salomao, R. (2003) Upregulation of reactive oxygen species generation and phagocytosis, and increased apoptosis in human neutrophils during severe sepsis and septic shock. *Shock* **20**, 208-12.
27. Zelnickova, P., Faldyna, M., Ondracek, J., Kovaru, H., Kovaru, F. (2007) Ontogeny of reactive nitrogen species production by blood phagocytes in pigs. *Physiol Res*.
28. Nakamori, Y., Ogura, H., Koh, T., Fujita, K., Tanaka, H., Sumi, Y., Hosotsubo, H., Yoshiya, K., Irisawa, T., Kuwagata, Y., Shimazu, T., Sugimoto, H. (2005) The balance between expression of intranuclear NF-kappaB and glucocorticoid receptor in polymorphonuclear leukocytes in SIRS patients. *J Trauma* **59**, 308-14; discussion 314-5.
29. Garcia-Garcia, E., Rosales, C. (2007) Nuclear factor activation by FcgammaR in human peripheral blood neutrophils detected by a novel flow cytometry-based method. *J Immunol Methods* **320**, 104-18.
30. Flo, T.H., Halaas, O., Torp, S., Ryan, L., Lien, E., Dybdahl, B., Sundan, A., Espevik, T. (2001) Differential expression of Toll-like receptor 2 in human cells. *J Leukoc Biol* **69**, 474-81.
31. Landmann, R., Reber, A.M., Sansano, S., Zimmerli, W. (1996) Function of soluble CD14 in serum from patients with septic shock. *J Infect Dis* **173**, 661-8.
32. Moller, A.S., Ovstebo, R., Haug, K.B., Joo, G.B., Westvik, A.B., Kierulf, P. (2005) Chemokine production and pattern recognition receptor (PRR) expression in whole blood stimulated with pathogen-associated molecular patterns (PAMPs). *Cytokine* **32**, 304-15.
33. Kurt-Jones, E.A., Mandell, L., Whitney, C., Padgett, A., Gosselin, K., Newburger, P.E., Finberg, R.W. (2002) Role of toll-like receptor 2 (TLR2) in neutrophil activation: GM-CSF enhances TLR2 expression and TLR2-mediated interleukin 8 responses in neutrophils. *Blood* **100**, 1860-8.
34. Rodeberg, D.A., Morris, R.E., Babcock, G.F. (1997) Azurophilic granules of human neutrophils contain CD14. *Infect Immun* **65**, 4747-53.
35. Allen, R.C., Pruitt, B.A., Jr. (1982) Humoral-phagocyte axis of immune defense in burn patients. Chemoluminogenic probing. *Arch Surg* **117**, 133-40.
36. Weingarten, R., Sklar, L.A., Mathison, J.C., Omid, S., Ainsworth, T., Simon, S., Ulevitch, R.J., Tobias, P.S. (1993) Interactions of lipopolysaccharide with neutrophils in blood via CD14. *J Leukoc Biol* **53**, 518-24.
37. Wagner, C., Deppisch, R., Deneffle, B., Hug, F., Andrassy, K., Hansch, G.M. (2003) Expression patterns of the lipopolysaccharide receptor CD14, and the Fc gamma receptors CD16 and CD64 on polymorphonuclear neutrophils: data from patients with severe bacterial infections and lipopolysaccharide-exposed cells. *Shock* **19**, 5-12.
38. Wright, S.D., Ramos, R.A., Hermanowski-Vosatka, A., Rockwell, P., Detmers, P.A. (1991) Activation of the adhesive capacity of CR3 on neutrophils by endotoxin: dependence on lipopolysaccharide binding protein and CD14. *J Exp Med* **173**, 1281-6.
39. Husebye, H., Halaas, O., Stenmark, H., Tunheim, G., Sandanger, O., Bogen, B., Brech, A., Latz, E., Espevik, T. (2006) Endocytic pathways regulate Toll-like receptor 4 signaling and link innate and adaptive immunity. *Embo J* **25**, 683-92.
40. Khandaker, M.H., Xu, L., Rahimpour, R., Mitchell, G., DeVries, M.E., Pickering, J.G., Singhal, S.K., Feldman, R.D., Kelvin, D.J. (1998) CXCR1 and CXCR2 are rapidly down-modulated by bacterial endotoxin through a unique agonist-independent, tyrosine kinase-dependent mechanism. *J Immunol* **161**, 1930-8.
41. Juffermans, N.P., Dekkers, P.E., Peppelenbosch, M.P., Speelman, P., van Deventer, S.J., van Der Poll, T. (2000) Expression of the chemokine receptors CXCR1 and CXCR2 on granulocytes in human endotoxemia and tuberculosis: involvement of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway. *J Infect Dis* **182**, 888-94.

42. Sabroe, I., Jones, E.C., Whyte, M.K., Dower, S.K. (2005) Regulation of human neutrophil chemokine receptor expression and function by activation of Toll-like receptors 2 and 4. *Immunology* **115**, 90-8.
43. Haugen, T.S., Skjonsberg, O.H., Nakstad, B., Lyberg, T. (1999) Modulation of adhesion molecule profiles on alveolar macrophages and blood leukocytes. *Respiration* **66**, 528-37.
44. Zhou, X., Gao, X.P., Fan, J., Liu, Q., Anwar, K.N., Frey, R.S., Malik, A.B. (2005) LPS activation of Toll-like receptor 4 signals CD11b/CD18 expression in neutrophils. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **288**, L655-62.
45. Wright, S.D., Jong, M.T. (1986) Adhesion-promoting receptors on human macrophages recognize *Escherichia coli* by binding to lipopolysaccharide. *J Exp Med* **164**, 1876-88.
46. Perera, P.Y., Mayadas, T.N., Takeuchi, O., Akira, S., Zaks-Zilberman, M., Goyert, S.M., Vogel, S.N. (2001) CD11b/CD18 acts in concert with CD14 and Toll-like receptor (TLR) 4 to elicit full lipopolysaccharide and taxol-inducible gene expression. *J Immunol* **166**, 574-81.
47. Zarewych, D.M., Kindzelskii, A.L., Todd, R.F., 3rd, Petty, H.R. (1996) LPS induces CD14 association with complement receptor type 3, which is reversed by neutrophil adhesion. *J Immunol* **156**, 430-3.
48. Mazzone, A., Ricevuti, G. (1995) Leukocyte CD11/CD18 integrins: biological and clinical relevance. *Haematologica* **80**, 161-75.
49. Myhre, O., Andersen, J.M., Aarnes, H., Fonnum, F. (2003) Evaluation of the probes 2',7'-dichlorofluorescein diacetate, luminol, and lucigenin as indicators of reactive species formation. *Biochem Pharmacol* **65**, 1575-82.
50. Liaudet, L., Murthy, K.G., Mabley, J.G., Pacher, P., Soriano, F.G., Salzman, A.L., Szabo, C. (2002) Comparison of inflammation, organ damage, and oxidant stress induced by *Salmonella enterica* serovar Muenchen flagellin and serovar Enteritidis lipopolysaccharide. *Infect Immun* **70**, 192-8.
51. Munakata, W., Liu, Q., Shimoyama, T., Sawaya, M., Umeda, T., Sugawara, K. (2003) Ecabet sodium attenuates reactive oxygen species produced by neutrophils after priming with bacterial lipopolysaccharides. *Luminescence* **18**, 330-3.
52. Kapp, A., Freudenberg, M., Galanos, C. (1987) Induction of human granulocyte chemiluminescence by bacterial lipopolysaccharides. *Infect Immun* **55**, 758-61.
53. Ruchaud-Sparagano, M.H., Ruivenkamp, C.A., Riches, P.L., Poxton, I.R., Dransfield, I. (1998) Differential effects of bacterial lipopolysaccharides upon neutrophil function. *FEBS Lett* **430**, 363-9.
54. Klink, M., Brzychcy, M., Ziolkowski, A., Swierzko, A., Sulowska, Z., Cedzynski, M., Tchorzewski, H. (1998) The comparison of some biological activities of lipopolysaccharides obtained from smooth and rough *Proteus mirabilis* strains. *Acta Microbiol Pol* **47**, 141-51.
55. Jesch, N.K., Dorger, M., Enders, G., Rieder, G., Vogelmeier, C., Messmer, K., Krombach, F. (1997) Expression of inducible nitric oxide synthase and formation of nitric oxide by alveolar macrophages: an interspecies comparison. *Environ Health Perspect* **105 Suppl 5**, 1297-300.
56. Vancurova, I., Miskolci, V., Davidson, D. (2001) NF-kappa B activation in tumor necrosis factor alpha-stimulated neutrophils is mediated by protein kinase Cdelta. Correlation to nuclear I kappa B alpha. *J Biol Chem* **276**, 19746-52.
57. Miskolci, V., Rollins, J., Vu, H.Y., Ghosh, C.C., Davidson, D., Vancurova, I. (2007) NFkappaB is persistently activated in continuously stimulated human neutrophils. *Mol Med* **13**, 134-42.
58. Castro-Alcaraz, S., Miskolci, V., Kalasapudi, B., Davidson, D., Vancurova, I. (2002) NF-kappa B regulation in human neutrophils by nuclear I kappa B alpha: correlation to apoptosis. *J Immunol* **169**, 3947-53.

- 
59. Carmody, R.J., Chen, Y.H. (2007) Nuclear factor-kappaB: activation and regulation during toll-like receptor signaling. *Cell Mol Immunol* **4**, 31-41.
  60. Lee, J.W., Lee, M.S., Kim, T.H., Lee, H.J., Hong, S.S., Noh, Y.H., Hwang, B.Y., Ro, J.S., Hong, J.T. (2007) Inhibitory effect of inflixinol on nitric oxide generation and iNOS expression via inhibition of NF-kappaB activation. *Mediators Inflamm* **2007**, 93148.
  61. Hailman, E., Lichenstein, H.S., Wurfel, M.M., Miller, D.S., Johnson, D.A., Kelley, M., Busse, L.A., Zukowski, M.M., Wright, S.D. (1994) Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein accelerates the binding of LPS to CD14. *J Exp Med* **179**, 269-77.
  62. Soler-Rodriguez, A.M., Zhang, H., Lichenstein, H.S., Qureshi, N., Niesel, D.W., Crowe, S.E., Peterson, J.W., Klimpel, G.R. (2000) Neutrophil activation by bacterial lipoprotein versus lipopolysaccharide: differential requirements for serum and CD14. *J Immunol* **164**, 2674-83.
  63. Troelstra, A., Giepmans, B.N., Van Kessel, K.P., Lichenstein, H.S., Verhoef, J., Van Strijp, J.A. (1997) Dual effects of soluble CD14 on LPS priming of neutrophils. *J Leukoc Biol* **61**, 173-8.
  64. Sabroe, I., Jones, E.C., Usher, L.R., Whyte, M.K., Dower, S.K. (2002) Toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 in human peripheral blood granulocytes: a critical role for monocytes in leukocyte lipopolysaccharide responses. *J Immunol* **168**, 4701-10.
  65. Merlin, T., Woelky-Bruggmann, R., Fearn, C., Freudenberg, M., Landmann, R. (2002) Expression and role of CD14 in mice sensitized to lipopolysaccharide by *Propionibacterium acnes*. *Eur J Immunol* **32**, 761-72.

# 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](#)