

Fabiane Sônego

***Papel da caspase-1 na gênese da resposta
inflamatória durante a sepse grave experimental***

*Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto da Universidade
de São Paulo como requisito parcial para
obtenção do título de mestre em Ciências
Biológicas*

*Área de concentração: Farmacologia
Orientador: Fernando de Queiróz Cunha*

RIBEIRÃO PRETO

2009

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE
TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA
FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE

FICHA CATALOGRÁFICA

Sônego, Fabiane

Papel da caspase-1 na gênese da resposta inflamatória
durante a sepse grave experimental. Ribeirão Preto, 2009.

85 p.: il. ; 30cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração:
Farmacologia.

Orientador: Cunha, Fernando de Queiróz.

1. Sepse. 2. Caspase-1. 3. Migração de neutrófilos.

Fabiane Sônego

***Papel da caspase-1 na gênese da resposta
inflamatória durante a sepse grave experimental***

*Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo como requisito
parcial para obtenção do título de mestre
em Ciências Biológicas
Área de concentração: Farmacologia*

Aprovado em 10 de março de 2009

Banca examinadora:

Prof. Dr. Fernando de Queiróz Cunha

FMRP-USP

Prof. Dr. Dario Simões Zamboni

FMRP-USP

Dr^a. Patrícia Torres Bozza

FIOCRUZ/RJ

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Roque e Janete,

*pelo amor, ensinamentos de como viver a vida,
coragem e incentivo constantes em minha vida.
Sem vocês eu não seria o que sou.*

Ao meu irmão, Cássio,

*pelo amor, carinho e felicidades proporcionadas
ao longo desses anos.*

AGRADECIMENTOS

Ao professor Fernando Cunha, pela exemplar orientação, oportunidade de integrar seu grupo de pesquisa e pelos valiosos ensinamentos que contribuíram muito para o meu crescimento profissional e intelectual.

Ao Zeca, pela grande amizade, contribuição fundamental no meu aperfeiçoamento científico e grande participação no delineamento deste trabalho.

Ao professor Dario Zamboni, pelas importantes discussões científicas sobre este trabalho, disponibilidade em participar da banca avaliadora desta dissertação e por ter gentilmente cedido os animais deficientes para caspase-1, objetos de estudo deste trabalho.

À doutora Patrícia Bozza, pelo aceite em participar desta banca avaliadora.

Ao professor Sérgio Ferreira, pelas brilhantes discussões científicas e pelos momentos de descontração propiciados ao longo destes anos.

À Andressa de Freitas, Daniele Nascimento e Fabrício Souto, pela disposição em auxiliar nos experimentos deste trabalho e acima de tudo pela valiosa amizade, carinho, companheirismo em momentos de angústia e alegrias que vivemos juntos.

Ao Tiago Cunha e Heitor pela amizade e importantes discussões científicas sobre este trabalho.

À Sílvia e Catarina, pela amizade e disponibilidade em ajudar nos experimentos deste trabalho.

À Giuliana, Kátia, Walter, Fabíola, Diva, Serginho e Ieda pelo suporte técnico e amizade. Em especial à Giuliana pela indispensável participação nas dosagens de citocinas e quimiocinas, à Kátia, pelo auxílio em experimentos deste trabalho e ao Walter pela importante participação nas análises de citometria de fluxo.

À Sandra Fukada, Dionéia e Daniela Dal Secco, pela grande amizade, carinho, e alegrias proporcionadas, mesmo após terem seguido seus caminhos e estarmos distantes.

Aos colegas e grandes amigos do laboratório de Inflamação e Dor: Jhimmy, Thiago, Adriana, Spiller, Paula, Larissa, Daniela Carlos, Paulo, Renata, Guilherme, Vanessa, Sílvio, Henrique, Rafaela, Francine, Marina, Danilo, Ibraim, Morena e Thiago, pelos maravilhosos momentos de descontração, receptividade e incentivo em momentos pouco felizes.

Aos amigos do laboratório de Patogenicidade Microbiana e Imunidade Inata: Juliana, Jonilson, Marcelo, Eulália, Larissa, Tatiana, Liliana, Greice, Djalma, Mariana, Zé Eduardo e Gabriel, pelos auxílios, discussões científicas e momentos de descontração que vivemos juntos.

Aos colegas que já integraram o Laboratório de Inflamação e Dor e agora estão seguindo seus caminhos e os visitantes deste laboratório: Waldiceu, Jozi, Nylane, Ana Tereza, Sabrina, Roberto, Felipe, Flávia, Mani, Djane, Michel, Paula, Maria, Isabela, Beth, Luiz Fernando, pelos momentos que convivemos.

Aos funcionários dos biotérios: Júlio, Sávio, Edir, Inês e Eliana, pelo suporte na criação, distribuição e cuidado com os animais utilizados neste estudo.

Aos professores do departamento de Farmacologia pelo convívio e ensinamentos passados e aqueles de outros departamentos que foram importantes na minha formação profissional.

Aos amigos e funcionários do departamento de Farmacologia, pelo carinho, momentos de diversão, e aprendizado divididos.

À Fátima, Sônia, Ramon, Valéria e Acácio, pelo auxílio em questões burocráticas e pela amizade.

À Carla, Verena e Mariana, pela amizade incondicional, paciência, carinho e grandes alegrias vivenciadas.

Ao CNPq, CAPES e FAPESP, pelo auxílio financeiro na realização deste trabalho, em especial ao CNPq, pelo fornecimento da bolsa.

A Deus, força inexplicável.

A todos, que direta ou indiretamente, contribuíram para meu crescimento pessoal e profissional e para a realização deste trabalho.

“A percepção do desconhecido é a mais fascinante das experiências. O homem que não tem os olhos abertos para o misterioso passará pela vida sem ver nada.”

Albert Einstein

RESUMO

RESUMO

SÔNEGO, F. **Papel da caspase-1 na gênese da resposta inflamatória durante a sepse grave experimental.** 2009. 85 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

Sepse é uma resposta inflamatória sistêmica que decorre da inabilidade do hospedeiro em controlar uma infecção local. De fato, trabalhos prévios de nosso laboratório demonstram que ocorre um prejuízo na migração de neutrófilos durante a sepse grave, que é associado ao aumento das concentrações séricas de citocinas, bacteremia e aumento da mortalidade dos animais. A participação dos receptores *Toll-like* (TLRs) foi recentemente descrita neste processo de falência da migração de neutrófilos na sepse grave. A caspase-1 é uma enzima que parece ser importante na ativação da via de sinalização dos TLRs além de ter um papel essencial na ativação das citocinas inflamatórias IL-1 β , IL-18 e IL-33. Neste trabalho, nós avaliamos a participação da caspase-1 na gênese da resposta inflamatória na sepse grave. Observamos que os animais deficientes para caspase-1 apresentaram maior resistência à sepse induzida por CLP (*cecal ligation and puncture*). No entanto, animais deficientes para IL-18 ou ST2 (receptor da IL-33) não apresentaram redução na mortalidade após indução da sepse. O tratamento com antagonista do receptor da IL-1 foi também incapaz de alterar a curva de sobrevivência de animais selvagens submetidos à sepse grave. Estes dados indicam que a redução nos níveis destas citocinas não é relevante para a redução da mortalidade observada nos animais deficientes para caspase-1 submetidos à sepse. A redução na mortalidade dos animais deficientes para caspase-1 foi associada à reduzida concentração sistêmica de TNF- α e IL-6. Apesar das concentrações locais de citocinas e quimiocinas apresentarem-se inalteradas, os animais deficientes para caspase-1 submetidos à sepse grave apresentaram um aumento na migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal, que foi favorecida pelo aumento no número de rolamentos e adesões dos leucócitos nestes animais. Como consequência, observamos uma redução no crescimento bacteriano no exudato peritoneal e no sangue destes animais, embora os neutrófilos dos animais deficientes para caspase-1 ou selvagens tenham apresentado capacidade microbicida e viabilidade celular semelhantes. Assim, na ausência da caspase-1, há maior migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal, que culmina na redução da mortalidade devido ao eficiente controle da infecção.

Palavras-chave: sepse – caspase-1 – migração de neutrófilos

ABSTRACT

ABSTRACT

SÔNEGO, F. **The role of caspase-1 on inflammatory response during experimental severe sepsis.** 2009. 85 f. Dissertation (Mestrado em Farmacologia) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

Sepsis is a systemic inflammatory response resulting from the inability of the host to restrict locally the infection. Previous works from our laboratory demonstrated that occurs a marked impairment on neutrophil migration during severe sepsis and it is associated to the increase of cytokines systemic levels, bacteremia and high mortality. The role of Toll-like receptors (TLRs) was recently described in this process of failure of neutrophil migration in severe sepsis. Caspase-1 is an enzyme that seems to be important on the activation of signalling pathway of TLRs, beside of to be critical on the activation of inflammatory cytokines IL-1 β , IL-18 and IL-33. In this work, we evaluated the participation of caspase-1 in the development of inflammatory response during severe sepsis. We observed that caspase-1 deficient mice presented increased resistance to severe sepsis induced by CLP (cecal ligation and puncture). However, IL-18 or ST2 (receptor of IL-33) deficient mice did not present reduction on mortality after sepsis. The treatment with antagonist of IL-1 receptor was also unable to modify the survival rate of wild type mice underwent to severe sepsis. These data indicate that the reduction on levels of these cytokines is not critical to reduction of mortality observed in caspase-1 deficient mice. The reduction on mortality of caspase-1 deficient mice was associated to decreased systemic levels of TNF- α and IL-6. Despite of the unaltered local levels of cytokines and chemokines, caspase-1 deficient mice underwent to severe sepsis presented a marked increase in neutrophil migration to peritoneal cavity, that was supported by an increased rolling and adhesion of leukocytes in these mice. As consequence, a reduced bacterial growth in peritoneal exudates and blood was observed in these animals although neutrophils from caspase-1 deficient and wild type mice presented similar killing and cellular viability. Thus, in the absence of caspase-1, neutrophil migration to peritoneal cavity is increased and culminates in a reduction of mortality because of the efficient control of the infection.

Keywords: sepsis – caspase-1 – neutrophil migration

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Caracterização dos animais deficientes para caspase-1	47
Figura 2	Avaliação da resistência dos animais deficientes para caspase-1 à sepse letal	49
Figura 3	Efeito do tratamento com IL-1Ra na curva de sobrevivência após sepse letal	51
Figura 4	Avaliação da resistência dos animais deficientes para IL-18 à sepse letal	52
Figura 5	Avaliação do efeito do tratamento com IL-33 e da deficiência do receptor ST2 na resistência à sepse letal	54
Figura 6	Avaliação da produção local de citocinas e quimiocinas durante a sepse	56
Figura 7	Avaliação da produção sistêmica de citocinas e quimiocinas durante a sepse	58
Figura 8	Avaliação do crescimento bacteriano no lavado peritoneal e no sangue durante a sepse	60
Figura 9	Avaliação da migração de neutrófilos para o foco infeccioso durante a sepse	62
Figura 10	Avaliação da capacidade microbicida dos neutrófilos selvagens e deficientes para caspase-1	63
Figura 11	Avaliação da apoptose e necrose após indução de sepse em neutrófilos de animais selvagens e deficientes para caspase-1	65
Figura 12	Avaliação do rolamento e adesão de leucócitos durante a sepse	67
Figura 13	Desenho esquemático	76

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE ABREVIATURAS

ACCP	<i>American College of Chest Physicians</i>
SCC	<i>Society of Critical Care Medicine</i>
SIRS	Síndrome da resposta inflamatória sistêmica
CLP	Ligação e perfuração do ceco
LPS	Lipopolissacarídeo
TNF	Fator de necrose tumoral
IL	Interleucina
PAF	Fator de agregação plaquetária
GPCR	Receptores acoplados à proteína G
LFA	Antígeno associado à função linfocitária
ICAM	Molécula de adesão intracelular
VCAM	Molécula de adesão de célula vascular
GRK	<i>G protein-coupled receptor kinase</i>
iNOS	Óxido nítrico sintase induzida
LTB4	Leucotrieno B4
fMLP	N-formil-L-metionil-L-leucil-L-fenilalanina
TLR	Receptor <i>Toll-like</i>
PRR	Receptor de reconhecimento padrão
PAMP	Padrão molecular associado a patógenos
MIP	<i>Macrophage-inflammatory protein</i>
IFN	Interferon
MIF	<i>Macrophage migration inhibitor factor</i>
ICE	Enzima conversora de IL-1 β
MyD88	<i>Myeloid differentiation factor 88</i>

SUMÁRIO

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
1.1. Sepses	19
1.1.1. Definição e epidemiologia da sepsis	19
1.1.2. Migração de neutrófilos e seu papel na sepsis grave	21
1.1.2.1. Mecanismos de migração leucocitária	21
1.1.2.2. Papel dos neutrófilos na sepsis grave	23
1.1.3. Citocinas na sepsis	26
1.2. Caspase-1	28
2 MATERIAIS E MÉTODOS	31
2.1. Animais	32
2.2. Soluções	33
2.2.1. Solução de tribromoetanol 2,5%	33
2.2.2. Tampão fosfato em salina (PBS) 10 X	33
2.2.3. Tampão fosfato em salina (PBS) 1 X	33
2.2.4. PBS – EDTA	33
2.2.5. Solução de tioglicolato 3%	34
2.2.6. Meio ágar Mueller-Hinton	34
2.2.7. Meio líquido BHI (<i>Brain heart infusion</i>)	34
2.2.8. Solução de Triton X-100 0,2%	34
2.2.9. Tampão de lise	35
2.2.10. Meio RPMI	35
2.2.11. Tampão de lise para extração de DNA	35
2.2.12. Corante Panótico Rápido	35
2.2.13. Tampões utilizados para o ensaio de ELISA	36
2.2.13.1. Solução de ligação (binding buffer) pH 9.0	36
2.2.13.2. Tampão substrato pH 5.0	36
2.2.13.3. Substrato	36
2.3. Genotipagem dos animais	36
2.4. Ligação e Perfuração do ceco (CLP)	37
2.5. Migração de neutrófilos	38
2.6. Quimiocinas e citocinas	38
2.7. Crescimento bacteriano	40
2.8. Isolamento de bactérias da flora intestinal	40
2.9. Ensaio de <i>killing</i>	41
2.10. Produção de superóxido	42
2.11. Apoptose	42
2.12. Microscopia intravital	43
2.13. Tratamento com IL-1Ra	44
2.14. Tratamento com IL-33	44
3 RESULTADOS	45
3.1. Caracterização dos animais deficientes para caspase-1	46
3.2. Animais deficientes para caspase-1 apresentam aumento na resistência à sepsis letal	48

3.3. Redução na concentração das citocinas clivadas pela caspase-1 não resulta em aumento na resistência de animais selvagens submetidos à sepse letal	49
3.4. Animais deficientes para caspase-1 apresentam produção normal de citocinas e quimiocinas no local da infecção	55
3.5. Animais deficientes para caspase-1 apresentam redução na concentração sistêmica de citocinas	57
3.6. Animais deficientes para caspase-1 apresentam maior controle do crescimento bacteriano durante a sepse letal	59
3.7. Animais deficientes para caspase-1 apresentam maior migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal e igual capacidade microbicida em relação aos animais selvagens durante a sepse letal	61
3.8. Neutrófilos deficientes para caspase-1 não apresentam diferença na viabilidade celular durante a sepse letal	64
3.9. Animais deficientes para caspase-1 apresentam aumento no número de rolamento e adesão de leucócitos em relação aos animais selvagens	66
4 DISCUSSÃO	68
5 CONCLUSÃO	74
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77
7 ANEXOS	83

1 INTRODUÇÃO

1.1. Sepses

1.1.1. Definição e epidemiologia da sepsis

Sepsis é uma resposta inflamatória sistêmica decorrente de uma infecção. Esta patologia tem sido considerada um problema de saúde pública emergente, que apresenta altas taxas de incidência e mortalidade. Nos Estados Unidos, há uma incidência anual de 737.000 casos de sepsis [1]. No Brasil, há relatos de que a incidência seja de 57 casos a cada 1000 pacientes por dia (Silva, Pedro Mde *et al.*, 2004).

Até o ano de 1991, termos como bacteremia, síndrome séptica, septicemia, sepsis e choque séptico eram intercambiáveis, causando confusões e tornando difícil o entendimento desta patologia. No intuito de definir termos apropriados que auxiliassem o diagnóstico e permitissem o esclarecimento dos estágios da doença, o *American College of Chest Physicians (ACCP)* e a *Society of Critical Care Medicine (SCC)* reuniram-se na *Consensus Conference*, em 1991. A partir desta conferência, novas definições tornaram-se facilmente aplicáveis aos diferentes estágios da doença. De acordo com ACCP/SCC, **infecção** é um fenômeno microbiano, caracterizado pela resposta inflamatória decorrente da invasão de microorganismos em lugares normalmente estéreis. Ainda, **bacteremia** foi definida como presença de bactérias viáveis no sangue. **Síndrome da resposta inflamatória sistêmica** (*Systemic inflammatory response syndrome - SIRS*) define a presença de dois ou mais fatores: temperatura corporal superior a 38°C ou inferior a 36°C; frequência cardíaca maior que 90 batimentos/minuto; frequência respiratória maior que 20 respirações/minuto ou PaCO₂ inferior a 32 mm Hg; contagem de glóbulos brancos superior a 12.000 células/mm³, inferior a 4.000 células/mm³ ou com presença de

mais de 10% de formas imaturas. A presença de uma infecção, associada a um quadro de síndrome da resposta inflamatória sistêmica decorrente desta infecção descreve a **sepse**. A associação da sepse com disfunção de órgãos, hipoperfusão ou hipotensão é característica da **sepse grave**. O agravamento deste quadro, representado pela associação da sepse grave e hipotensão não-responsiva à reposição por fluidos e agentes hipertensores, desencadeada pela sepse, caracteriza o **choque séptico**. Ainda **síndrome da disfunção múltipla de órgãos** descreve a presença de funções orgânicas inalteradas, que causam um desequilíbrio da homeostasia. A não reversão destes quadros pode culminar na morte do paciente (Bone, Sibbald *et al.*, 1992; Bone, Grodzin *et al.*, 1997).

O termo sepse tem origem grega, com significado referente à putrefação, devido ao mau odor exalado pelos portadores desta doença, observado há centenas de anos (Beutler e Rietschel, 2003). Decorre de infecções bacterianas, fúngicas ou virais (Jean-Baptiste, 2007). No entanto, infecções bacterianas são as mais frequentes, com proporções similares de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas como agentes etiológicos da sepse. Infecções mistas também detêm parte da etiologia desta doença (Vincent, Sakr *et al.*, 2006).

A metodologia experimental frequentemente utilizada para estudos relacionados à sepse é a de ligação e perfuração do ceco (*cecal ligation and puncture* – CLP). Esta metodologia permite a indução de uma peritonite séptica polibacteriana de alto grau de complexidade. Após a cirurgia, um foco infeccioso polimicrobiano é estabelecido na cavidade peritoneal e leva ao envolvimento de uma complexa resposta imune desencadeada por diferentes mecanismos (Mannel, 2007).

1.1.2. Migração de neutrófilos e seu papel na sepse grave

1.1.2.1. Mecanismos de migração leucocitária

Os neutrófilos são células leucocitárias pertencentes ao sistema imune inato e encontradas na circulação sanguínea. Em uma infecção, os neutrófilos são os primeiros leucócitos recrutados ao foco infeccioso para destruir o patógeno invasor. De maneira didática, o processo de migração leucocitária envolve as etapas de marginação, rolamento, adesão e transmigração dos leucócitos até o foco da lesão (Alves-Filho, De Freitas *et al.*, 2008). Estímulos como lipopolissacarídeo (LPS), fator de necrose tumoral (TNF) $-\alpha$ e interleucina (IL)- 1β induzem a expressão de moléculas de ligação a carboidratos, conhecidas como selectinas, no endotélio vascular e nos leucócitos. A expressão de selectinas na superfície celular modula o processo de migração dos neutrófilos da circulação sanguínea para o foco de lesão tecidual. A interação da L-selectina (expressa em leucócitos) e P-selectina (expressa em células endoteliais e plaquetas) com seus respectivos ligantes é responsável pela marginação dos leucócitos circulantes, bem como pelo processo de rolamento destas células sobre o endotélio vascular, na fase inicial da migração celular. A síntese *de novo* da E-selectina, induzida por fatores decorrentes do estímulo inflamatório e sua expressão na superfície das células endoteliais também tem papel fundamental no rolamento dos leucócitos sobre o endotélio. Tal influência é marcante no processo de rolamento lento dos leucócitos, o qual precede a adesão destes ao endotélio. Durante o processo de rolamento, os leucócitos podem ser ativados por diferentes vias de sinalização, incluindo os agentes quimioatraentes, como fator de agregação plaquetária (PAF- *platelet-activating factor*), leucotrieno B₄, o componente do sistema complemento C5a, peptídeos formilados e quimiocinas. A

ativação de receptores com sete domínios transmembrana, acoplados à proteína G (*G-protein-coupled receptors* – GPCRs) por agentes quimioatraentes estimula a aderência, o extravasamento dos leucócitos, promovendo o rearranjo do citoesqueleto e em última instância, a morte do agente invasor, propiciada pela liberação de grânulos contendo enzimas de degradação e espécies reativas de oxigênio (Ley, Laudanna *et al.*, 2007; Zarbock e Ley, 2008). Em condições inflamatórias agudas e na imunidade inata, os receptores quimiotáticos CXCR1 e CXCR2 são considerados protótipos para as quimiocinas CXC induzidas por estímulo inflamatório, tais como lipopolissacarídeo e as citocinas TNF- α e IL-1 β , pois apresentam um papel importante na atração de neutrófilos ao foco da lesão (Cummings, Martin *et al.*, 1999; Viola e Luster, 2008). Em adição aos agentes quimioatraentes, as integrinas também podem facilitar o processo de migração de leucócitos (Bokoch, 1995) (Ley, Laudanna *et al.*, 2007; Zarbock e Ley, 2008). As integrinas são moléculas de adesão celular transmembrana do tipo I, formadas por subunidades α e β . Os neutrófilos expressam as β_2 -integrinas $\alpha_L\beta_2$ (LFA - *lymphocyte function-associated antigen-1*), $\alpha_M\beta_2$ (Mac- *macrophage receptor-1*), $\alpha_X\beta_2$ e baixos níveis de $\alpha_4\beta_1$ (Zarbock e Ley, 2008), onde as β_2 -integrinas interagem com ICAM (*intracellular adhesion molecule*)-1 e as α_4 integrinas têm afinidade por VCAM (*vascular cell adhesion molecule*)-1 (Laudanna, Kim *et al.*, 2002; Zarbock e Ley, 2008). Após aderidos, os leucócitos respondem ao gradiente quimiotático e completam o processo de transmigração de maneira específica ao tipo de quimioatraente liberado (Alves-Filho, De Freitas *et al.*, 2008).

A intensidade e a duração do estímulo do agonista nos receptores quimiotáticos são reguladas pela dessensibilização destes receptores, a qual determina não apenas o número de polimorfonucleares que migram, como também

a motilidade e a habilidade de parar quando em contato com o patógeno ou célula alvo (Lefkowitz, 1998). Um mecanismo geral de dessensibilização dos GPCRs envolve o sistema GRK (*G protein-coupled receptor kinase*)-arrestina. GRKs são quinases específicas a receptores acoplados a proteína G, responsáveis pela fosforilação dos receptores, acarretando na dessensibilização da sinalização desencadeada pela interação entre quimiocinas e receptores (Fan e Malik, 2003). A fosforilação do receptor pelas GRKs ocorre quando este se apresenta na forma ativada ou ligada ao agonista, o que é caracterizado como dessensibilização homóloga (Pierce, Premont *et al.*, 2002). Em receptores quimiotáticos de polimorfonucleares o mecanismo de dessensibilização é mediado por GRK2 e GRK5. Uma vez fosforilado, a ligação da β -arrestina acarreta no seqüestro em microdomínios membranares ricos em clatrin, que possibilita a retirada endocítica. A internalização rápida permite a contínua redistribuição dos receptores na superfície do polimorfonuclear, o que mantém a polarização quimiotática e direciona a migração celular ao longo do gradiente de quimiocinas (Moser, 2003).

1.1.2.2. Papel dos neutrófilos na sepse grave

Devido a sua função de célula de defesa, a presença dos neutrófilos no local da infecção é determinante para a resolução desta. Esta afirmação é claramente ilustrada pela depleção de neutrófilos em camundongos infectados com *Staphylococcus aureus*. A depleção de neutrófilos em animais infectados resulta em taxa de sobrevivência de cerca de 20%, enquanto que animais infectados que tiveram seus macrófagos pulmonares depletados apresentam 100% de sobrevivência (Robertson, Perrone *et al.*, 2008).

Assim como na infecção localizada, na sepse o papel dos neutrófilos é crucial para o controle do crescimento bacteriano e, conseqüentemente, para a sobrevivência do indivíduo. De fato, a dependência da presença de neutrófilos no foco infeccioso para a resolução da doença tem sido claramente demonstrada em metodologias experimentais em animais, bem como em pacientes sépticos. Benjamim e colaboradores demonstraram que camundongos submetidos à sepse grave/letal induzida por CLP, assim como por inoculação intraperitoneal de *Salmonella typhimurium*, apresentam uma considerável redução de neutrófilos migrados para o foco da infecção quando comparados aos animais submetidos à sepse sub-letal (Benjamim, Ferreira *et al.*, 2000; Alves-Filho, De Freitas *et al.*, 2006). A falência da migração de neutrófilos nos animais submetidos à sepse letal pode ser associada à mortalidade dos animais, os quais apresentam taxa de mortalidade igual a 100%, enquanto que a totalidade dos animais submetidos à sepse sub-letal sobrevivem a este episódio. Interessantemente, o prejuízo na migração de neutrófilos ao foco infeccioso nos animais durante a sepse letal tem sido associado ao óxido nítrico. Animais deficientes da isoforma induzida da óxido nítrico sintase (*inducible nitric oxide synthase* – iNOS), e animais tratados com inibidor desta isoforma não apresentam o prejuízo no rolamento e adesão de neutrófilos após a indução da sepse grave, fenômeno característico observado nos animais selvagens submetidos às mesmas condições (Benjamim, Silva *et al.*, 2002). Ainda, o óxido nítrico tem sido relacionado à dessensibilização do receptor quimiotático CXCR2 durante a sepse, reduzindo, desta forma, a atividade quimiotática destes neutrófilos (Rios-Santos, Alves-Filho *et al.*, 2007). De fato, Tavares-Murta e colaboradores demonstraram, em 2002, que pacientes sépticos apresentam reduzida atividade quimiotática em resposta a agentes quimiotáticos como LTB4 e fMLP (N-formil-L-

metionil-L-leucil-L-fenilalanina) (Tavares-Murta, Zaparoli *et al.*, 2002). Além disso, o grau de hiporesponsividade ao quimioatraente pode ser relacionado ao prognóstico do paciente, reforçando a importância da migração de neutrófilos para a resolução da doença. Corroborando esta observação, Arraes e colaboradores mostraram em 2006 que neutrófilos de pacientes sépticos apresentam reduzida expressão do receptor quimiotático CXCR1. De acordo com o proposto pelos autores, o ambiente séptico sistêmico poderia ativar os neutrófilos circulantes e desta forma, impedir que respondam aos estímulos quimiotáticos, causando a falência da migração de neutrófilos ao sítio infeccioso. Associada à dessensibilização de CXCR1 observou-se a indução de GRK2 e GRK5 e redução na polimerização de actina, processo importante para a mobilidade dos neutrófilos (Arraes, Freitas *et al.*, 2006).

Os *Toll-like receptors* (TLRs) são descritos como receptores de reconhecimento padrão (*pattern recognition receptors* – PRRs) por reconhecerem estruturas conservadas de patógenos, essenciais para a sobrevivência dos mesmos, as quais são conhecidas como padrões moleculares associados a patógenos (*pathogen-associated molecular pattern* – PAMPs), reconhecendo também, desta forma, produtos bacterianos desencadeadores de sepse (West, Koblansky *et al.*, 2006). De fato, recentemente Alves-Filho e colaboradores demonstraram que a ativação de TLR2 ou TLR4 na sepse polimicrobiana grave culmina na indução da proteína quinase GRK2 (*G protein-coupled receptor kinase 2*), responsável pela fosforilação de receptores acoplados a proteína G, entre eles, o receptor quimiotático expresso em neutrófilos, CXCR2. A fosforilação de CXCR2 promove a perda da resposta quimiotática em neutrófilos e, conseqüentemente, redução da migração de neutrófilos ao foco da infecção. Assim, animais deficientes para TLR2 ou TLR4 apresentam redução na ativação desta via, favorecendo a manutenção da

expressão de CXCR2 nos neutrófilos, mantendo-os hábeis a responder a estímulos quimiotáticos. Como consequência, observa-se aumento na migração de neutrófilos e redução na mortalidade dos animais deficientes para TLR2 ou TLR4 submetidos à sepse polimicrobiana grave (Alves-Filho, De Freitas *et al.*, 2006) (e trabalho aceito no periódico PNAS).

Juntos, estes dados reforçam a hipótese de que os neutrófilos sejam imprescindíveis para a resolução da sepse e manutenção da vida do indivíduo afetado.

1.1.3. Citocinas na sepse

A inflamação é um processo auto-limitante e protetor do hospedeiro, que visa a eliminação do agente invasor, através da produção de citocinas e ativação de neutrófilos. No entanto, a presença de altas concentrações sistêmicas de citocinas acarreta injúrias e disfunções de órgãos. De maneira clássica, a patogênese da sepse é considerada resultante de uma resposta inflamatória exacerbada que medeia a produção excessiva de citocinas, quimiocinas e óxido nítrico e a ativação intensa do sistema imune (Dinarello, 1997; Shimaoka e Park, 2008). De fato, a concentração de citocinas e quimiocinas, tais como IL-1 β , TNF- α e MIP (*macrophage-inflammatory protein*)-2, produzidas durante a sepse letal, supera aquela encontrada em animais com sepse sub-letal induzida (Benjamim, Silva *et al.*, 2002; Alves-Filho, De Freitas *et al.*, 2006). Estes dados são reforçados pela observação em humanos sépticos, onde a concentração de IL-8, TNF- α e interferon (IFN) - γ foi maior do que a observada em indivíduos hígidos (Arraes, Freitas *et al.*, 2006).

Verdadeiramente, as concentrações altas de citocinas podem ser prejudiciais ao organismo infectado. O TNF- α tem sido associado à redução na expressão de receptores quimiotáticos CXCR1 e CXCR2 em neutrófilos (Khandaker, Mitchell *et al.*, 1999). Além disso, TNF- α e IL-1 β , que parecem ter ações sinérgicas durante a sepse, induzem febre e hipotensão quando administrados por via intravenosa, culminando em choque e possível letalidade em animais experimentais. Diferente destas citocinas, a IL-6 parece não ser uma citocina inflamatória *per se*, uma vez que a administração intravenosa não causa choque em camundongos e primatas. No entanto, as concentrações sistêmicas de IL-6 são bem correlacionadas à mortalidade por choque séptico (Dinarello, 1997). Além disso, a produção de IL-6 foi também associada à indução de resposta de fase aguda no fígado (Mudter e Neurath, 2007).

A despeito da hipótese inicial e de testes em animais experimentais, de que agentes neutralizantes de mediadores inflamatórios, tais como TNF- α e IL-1 β , poderiam melhorar o quadro de choque séptico, os testes clínicos não resultaram em redução significativa no número de mortes (Vincent, Slotman *et al.*, 1999) (Dinarello, 1997). Estes resultados sugerem que a sepse possui uma fisiopatologia distinta, diferenciando-se de uma doença inflamatória comum (Shimaoka e Park, 2008).

Outro mediador que parece interferir negativamente na sepse é o fator inibitório da migração de macrófagos (MIF, *macrophage migration inhibitor factor*). Animais tratados com anticorpo neutralizador deste mediador ou animais deficientes para MIF apresentaram aumento na resistência à sepse induzida por CLP (Bozza, Satoskar *et al.*, 1999; Calandra, Echtenacher *et al.*, 2000).

Em adição a estas citocinas, outras possuem descrições contraditórias em relação a suas participações na sepse. Isto pode ser exemplificado pela citocina IL-18. Trabalho anterior de nosso laboratório indica que a IL-18 não participa na fisiopatologia da sepse induzida por CLP (Moreno, Alves-Filho *et al.*, 2006). No entanto, a neutralização de IL-18 foi eficaz em proteger os animais infectados contra infecção por *E.coli* ou *Salmonella thyphimurium* (Dinarello e Fantuzzi, 2003).

Considerando a exacerbação na produção de citocinas e a falência de migração de neutrófilos observada durante a sepse grave, é possível excluir a possibilidade de que esta ocorra por falta de mediadores inflamatórios que orquestram a resposta imune/inflamatória, e pode ser sugerido que, possivelmente o excesso de ativação destas respostas culmine com a estagnação das mesmas.

1.2. Caspase-1

Algumas citocinas inflamatórias são produzidas e liberadas em sua forma inativa e precisam ser ativadas por clivagem de suas pró-formas em citocinas ativas. A citocina IL-1 β é um exemplo, pois estímulos de produtos bacterianos induzem sua síntese como pró-IL-1 β . Em seguida, a enzima caspase-1, inicialmente conhecida como ICE (*IL-1 β -converting enzyme*), cliva a pró-citocina em IL-1 β ativa. Em adição a IL-1 β , IL-18 e IL-33 também parecem ter suas ativações dependentes de caspase-1 (Arend, Palmer *et al.*, 2008; Chowdhury, Tharakan *et al.*, 2008).

As caspases fazem parte de uma família de proteases ácidas específicas para aspartato e dependentes de cisteína, onde o resíduo de cisteína é o nucleófilo catalítico que confere especificidade aos seus substratos (Chowdhury, Tharakan *et al.*, 2008). Para ter função catalítica, a pró-caspase inativa precisa ser ativada. A

ativação da caspase-1 por complexos multiméricos denominados inflamassomas envolve a formação de um heterotetrâmero, formado por duas subunidades grandes e duas pequenas (p20 e p10, respectivamente). A caspase ativa é representada pela porção p20, que apresenta os resíduos Cys285 e His237 no sítio ativo. Quando ativada, a caspase-1 é hábil para clivar as pró-formas das citocinas nas suas formas ativas. A pró-IL-1- β é sintetizada no citoplasma como uma molécula de 31 KDa, que após clivagem pela caspase-1, libera a forma madura que apresenta 17KDa. O peptídeo precursor da IL-18, com 23 KDa, também é encontrado no citoplasma e sofre clivagem pela caspase-1, da mesma forma que a pró-IL-33 (30KDa) é também clivada em sua forma ativa, de 18KDa (Arend, Palmer *et al.*, 2008; Chowdhury, Tharakan *et al.*, 2008) .

Recentemente, a caspase-1 foi relacionada à secreção não-convencional de proteínas. Assim, caspase-1 poderia estar envolvida na secreção de proteínas como IL-1 α e MIF, até então consideradas independentes da ação desta cisteíno-protease (Keller, Ruegg *et al.*, 2008).

Interessantemente, estudo recente demonstrou que caspase-1 pode ter capacidade de ativar a proteína adaptadora *MyD88* (*myeloid differentiation factor 88*) *adapter-like* (Mal) da via de sinalização de TLR2 e TLR4. De fato, a ausência de caspase-1 implicou no prejuízo da sinalização destes dois receptores (Miggin, Palsson-Mcdermott *et al.*, 2007).

Desta forma, os dados da literatura demonstram a participação da caspase-1 na ativação de citocinas inflamatórias. No entanto, os relatos existentes até o momento sobre a participação destas citocinas na sepse são contraditórios ou inexistentes, a exemplo do desconhecido papel da IL-33 na gênese da sepse. Com base no que foi descrito e considerando a possibilidade de interação entre caspase-

1 e a via de sinalização dos receptores TLR2 e TLR4, importantes na gênese da sepse polimicrobiana grave, nosso objetivo neste trabalho foi investigar a participação da caspase-1 na gênese da sepse polimicrobiana grave.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Animais

Os camundongos selvagens (WT – *wild type*) C57Bl/6 e Balb/c foram provenientes de *The Jackson Laboratory (Bar Harbor, Estados Unidos)*. Os animais deficientes para caspase-1 (caspase-1^{-/-}), provenientes do laboratório do professor Dr. Richard A. Flavell (Kuida, Lippke *et al.*, 1995) foram gentilmente cedidos pelo professor Dr. Dario Simões Zamboni (Universidade de São Paulo - USP, SP) e os deficientes para IL-18 e ST2 gentilmente doados pelo professor Dr. Foo Y. Liew (*University of Glasgow, UK*). Os animais selvagens foram criados no Serviço de Biotério (Prefeitura do campus de Ribeirão Preto – USP) e os deficientes para caspase-1 no Biotério dos departamentos de bioquímica e imunologia e biologia celular, molecular e bioagentes patogênicos, enquanto que os deficientes para IL-18 e ST2 foram criados no Centro de criação de camundongos especiais. Antes dos experimentos, os camundongos foram acondicionados em caixas de polipropileno com tampa em aço galvanizado, sob iluminação, umidade e temperatura controlados, no Biotério departamental (Farmacologia). Os animais, machos ou fêmeas, tiveram acesso à água e comida *ad libitum* e foram utilizados para experimentação entre a 6^a e 8^a semana de vida (18-23g). O número de animais utilizados por grupo foi igual a 5 ou aquele indicado nas legendas. Todos os procedimentos foram previamente aprovados pelo Comitê de ética em experimentação animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, sob número 129/2008.

2.2. Soluções

2.2.1. Solução de tribromoetanol 2,5%

2,2,2 - tribromoetanol (<i>Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA</i>)	250 mg
Salina (NaCl 0,9%, Glicolabor, Ribeirão Preto, SP, BR) q.s.p.	10 mL

A solução foi aquecida a 56 °C até a dissolução total da droga.

2.2.2. Tampão fosfato em salina (PBS) 10 X

Cloreto de Sódio (<i>NaCl, Merck, Darmstadt, Germany</i>)	80 g
Cloreto de Potássio (<i>KCl, Merck, Darmstadt, Germany</i>)	2 g
Fosfato de Sódio dibásico (<i>Na₂HPO₄, Merck, Darmstadt, Germany</i>)	11,5 g
Fosfato de Potássio monobásico (<i>KH₂PO₄, Merck, Darmstadt, Germany</i>) ..	20 g
Água deionizada q.s.p	1000m L

O pH foi ajustado para 7,2 com NaOH ou HCl e a solução autoclavada e estocada em frascos estéreis a 4°C antes de ser utilizada.

2.2.3. Tampão fosfato em salina (PBS) 1 X

PBS 10 X	100 mL
Água deionizada q.s.p	1000m L

O pH foi ajustado para 7,2 com NaOH ou HCl e a solução autoclavada e estocada em frascos estéreis a 4°C antes de ser utilizada.

2.2.4. PBS – EDTA

PBS 1 X	100 mL
Ácido etilenodiaminotetracético (<i>EDTA, Merck, Darmstadt, Germany</i>)...	37,2 mg

2.2.5. Solução de tioglicolato 3%Tioglicolato (*Difco, Detroit, USA*) 3 g

Água deionizada q.s.p. 100 mL

A água foi aquecida a 56°C para facilitar a solubilização do tioglicolato. A seguir, a solução foi autoclavada e armazenada em condições estéreis.

2.2.6. Meio ágar Mueller-HintonÁgar Mueller-Hinton (*OXOID, Basingstok, Hampshire, England*) 38 g

Água deionizada q.s.p. 1 L

A água foi aquecida para facilitar a solubilização do meio e autoclavada em seguida. Antes do resfriamento do meio o mesmo foi distribuído em placas de petri para posterior semeadura das bactérias.

2.2.7. Meio líquido BHI (*Brain heart infusion*)Meio BHI (*OXOID, Basingstok, Hampshire, England*) 37 g

Água deionizada q.s.p. 1 L

O meio foi autoclavado e acondicionado a 4°C até o uso.

2.2.8. Solução de Triton X-100 0,2%Triton X-100 (*Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA*) 200 µL

Água deionizada q.s.p. 100 mL

2.2.9. Tampão de lise

Cloreto de amônia (NH ₄ Cl, Merck, Rio de Janeiro, BR)	8,04 g
EDTA (Merck, Rio de Janeiro, BR)	0,36 g
Bicarbonato de sódio (NaHCO ₃ , Vetec, Rio de Janeiro, BR)	0,64 g
Água deionizada q.s.p.	1 L

2.2.10. Meio RPMI

Meio RPMI-1640 (<i>Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA</i>)	10,4 g
Hepes (<i>Merck, Darmstadt, Germany</i>)	2,38 g
NaHCO ₃ (Vetec, Rio de Janeiro, BR)	2,20 g
Água deionizada q.s.p.	1 L

O pH da solução foi aferido para 7,2. Após filtração a vácuo a solução foi mantida a 4°C até o uso.

2.2.11. Tampão de lise para extração de DNA

NaCl (<i>Merck, Darmstadt, Germany</i>) 5 M	10 mL
Tris – HCl (<i>Merck, Darmstadt, Germany</i>) 1 M, pH=7,6	10 mL
EDTA (Merck, Rio de Janeiro, BR) 0,5 M, pH=8.0	10 mL
Duodecil sulfato de sódio (SDS, BioRad, Hercules, CA, USA) 20%	12,5 mL
Água deionizada q.s.p.	500 mL

2.2.12. Corante Panótico Rápido (LaborClin)

Panótico rápido n° 1: compõe-se por uma solução de triarilmetano a 0,1%.

Panótico rápido n° 2: compõe-se por uma solução de xantenos a 0,1%.

Panótico rápido n° 3: compõe-se por uma solução de tiazinas a 0,1%.

2.2.13. Tampões utilizados para o ensaio de ELISA

2.2.13.1. Solução de ligação (binding buffer) pH 9.0

Na₂PO₄ (Merk, Darmstadt, Germany) 0,1M

2.2.13.2. Tampão substrato pH 5.0

Ácido cítrico (Merk, Darmstadt, Germany) 34,7mM

Na₂PO₄ (Merk, Darmstadt, Germany) 66,7 mM

2.2.13.3. Substrato

o-fenilenediamina-dihidroclorato (OPD, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO,USA)

..... 0,4 mg

H₂O₂ (Merk, Darmstadt, Germany) 0,4µL

Tampão substrato q.s.p. 1 mL

2.3. Genotipagem dos animais

Os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal (ip) de 0,25 mg/kg tribrometanol e a parte distal da cauda (cerca de 1 cm) de camundongos selvagens e deficientes para caspase-1 foi cortada para possibilitar a genotipagem dos animais, a partir de uma reação de PCR (Reação em cadeia da polimerase). A seguir, as partes foram digeridas em tampão de lise e proteinase K (20 mg/mL) em temperatura de 56° por aproximadamente 12 horas. A lise foi completada pela adição de solução saturada de NaCl e posteriormente a suspensão foi centrifugada. Ao sobrenadante foi adicionado etanol para possibilitar a formação de fios de DNA. A amplificação foi feita com os *primers* ICE5P (5'-GAGACATATAAGGGAGAAGGG-3'), ICE3P (5'-ATGGCACACCACAGATATCGG-3') e NEO3P (5'-TGCTAAAGCG CATGCTCCAGACTG-3'). Cada reação conteve tampão da *Taq* (*Thermus aquaticus*)

DNA polimerase 1 X, 2 mM de deoxinucleotídeos, 10 µM de cada *primer*, 1,25 U de *Taq* DNA polimerase (*Promega Corporation, Madison, WY, USA*), e 0,5 µL de DNA genômico. As condições de ciclagem incluíram 45 segundos (s) a 96°C, 30 ciclos de 94°C / 30 s, 53°C / 30 s e 72°C / 1 minuto. Com extensão de 72°C / 5 minutos. O produto da PCR foi visualizado por eletroforese em gel de agarose (*Promega Corporation, Madison, WY, USA*) e o material genético corado com brometo de etídio. O gel foi fotografado para permitir a análise das bandas formadas.

2.4. Ligação e Perfuração do ceco (CLP)

Os animais, previamente anestesiados com injeção intraperitoneal (ip) de 0,25 mg/kg tribrometanol, foram submetidos a uma incisão de aproximadamente 1 cm, no abdômen anterior, para permitir a exposição do ceco. A junção íleo-cecal foi ligada, para impedir o fluxo retrógrado do conteúdo fecal no ceco. Perfurações com agulhas de calibres 18G (1 perfuração transversal), 26G (5 perfurações superficiais) e 30G (4 perfurações superficiais) foram feitas no ceco dos animais para indução das diferentes intensidades de sepse: letal ou grave (L-CLP), moderada (M-CLP) e subletal (SL-CLP), respectivamente. Animais pertencentes ao grupo *sham* não tiveram perfurações no ceco. Em seguida, o ceco foi recolocado no interior da cavidade abdominal e a membrana peritoneal suturada juntamente com a pele com fio de sutura odontológico, número 4.0 (Polysuture, São Sebastião do Paraíso, MG, BR). Os animais receberam 1 mL de salina por via subcutânea (s.c.), no dorso, para reposição hídrica e foram deixados sob exposição de luz incandescente até a total recuperação da anestesia. Para avaliação da sobrevida após a cirurgia os animais

foram novamente acondicionados no biotério departamental da Farmacologia, com água e comida *ad libitum* e a mortalidade registrada a cada 24h, durante 10 dias.

2.5. Migração de neutrófilos

A migração de neutrófilos para a cavidade abdominal foi avaliada 6 horas após a indução da sepse polimicrobiana por CLP. Os animais foram mortos por deslocamento cervical e o lavado peritoneal foi realizado com a administração de 1,5 mL de tampão fosfato em salina (*phosphate-buffer saline* – PBS) contendo 1 mM de (*ethylene diamino tetraacetic* – EDTA). Após homogeneização, o PBS foi retirado da cavidade peritoneal e as células brancas totais contadas em contador automático (Coulter® A^CT, Coulter Corporation, Miami, Florida, USA). A contagem diferencial das células totais foi possível pelo método de May-Grünwald Giemsa com corante panótico rápido (LaborClin produtos para laboratório, Pinhais, PR, BR) de lâminas contendo as células totais, preparadas em citocentrífuga Cytospin 4 (Shandon Cytospin Lipshaw Inc., Pittsburgh, Pennsylvania, USA). As células foram visualizadas em microscópio óptico através da objetiva de imersão em óleo (aumento de 1000 vezes). A porcentagem de macrófagos e neutrófilos foi calculada pela contagem de 100 células. Os resultados são expressos em número de neutrófilos migrados ($\times 10^6$) por cavidade peritoneal.

2.6. Quimiocinas e citocinas

O exudato peritoneal e soro dos camundongos foram coletados em 6 horas para dosagem de citocinas por método espectrofotométrico de ELISA (*enzyme-*

linked immuno sorbent assay). A concentração das quimiocinas MIP-2 e KC foram medidas utilizando anticorpos comercialmente disponíveis e seguindo as instruções do fabricante. Os anticorpos utilizados para detecção e quantificação das citocinas IL-1 β , IL-6 e TNF- α foram gentilmente cedido pelo e dosadas como descrito por Benjamim e col, 2002. As concentrações das citocinas e quimiocinas são expressas como picogramas/ml de amostra.

As placas de microtitulação (96 poços) foram recobertas com 50 μ L/ poço do anticorpo específico anti-TNF- α (2 μ g/mL), anti-IL-1 β (2 μ g/mL) ou anti-IL-6 (2 μ g/mL), gentilmente cedidos pelo Dr. Steven Poole (*National Institute for Biological Standards and Control, UK*), ou ainda, com anti-MIP-2 ou anti-KC (*R&D Systems, Minneapolis, MN, USA*). Os anticorpos foram previamente diluídos em solução de ligação (binding buffer) pH 9.0 e incubados por 18-24 horas a 4°C. As placas foram lavadas três vezes com PBS/Tween-20 (0.05%, *Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA*). As ligações não específicas foram bloqueadas com 100 μ L de PBS contendo 1% de albumina sérica bovina (BSA, *Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA*) por 120 minutos em temperatura ambiente. As amostras e a curva padrão contendo as concentrações para TNF- α (2000 pg/mL) IL-1 β (2000 pg/mL), IL-6 (4000 pg/mL), MIP-2 (4000 pg/mL) e KC (4000 pg/mL) (*R&D Systems, Minneapolis, MN, USA*) foram colocados nas placas (50 μ L) e incubados por 18-24 horas a 4°C. Após esse período, as placas foram lavadas com PBS/Tween e 50 μ L dos anticorpos biotinizados específicos para cada citocina foram adicionados nas concentrações: TNF- α (1:1000), IL-1 β (1:1000), IL-6 (1:1000), MIP-2 (0,2 μ g/mL) e KC (0,2 μ g/mL). Após uma hora, as placas foram lavadas com PBS/Tween e o conjugado avidina-peroxidase, na diluição de 1/5000 adicionado a cada poço e as placas incubadas por 30 minutos. As placas foram lavadas com PBS/Tween e 100 μ L do substrato OPD

em tampão substrato (pH 5.0) foram adicionados. A reação foi interrompida com 50 μL de H_2SO_4 (1 M) e a densidade óptica (DO) medida a 490 nm em espectrofotômetro (*Spectra Max-250, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA*). Os resultados foram expressos em pg/ mL.

2.7. Crescimento bacteriano

Amostras de sangue e lavado peritoneal foram coletadas nos mesmos tempos citados no item anterior e semeadas puras ou diluídas 10 vezes, respectivamente, para quantificação de bactérias viáveis. As diluições foram semeadas em placas de Petri contendo meio Agar Mueller-Hinton e estas acondicionadas a 37°C por 18 horas. O número de bactérias formadoras de colônias foi registrado e esse número considerado equivalente ao número de bactérias viáveis nas amostras avaliadas. Os resultados são expressos como Log de unidades formadoras de colônias (UFC)/mL.

2.8. Isolamento de bactérias da flora intestinal

Camundongos C57Bl/6 foram mortos por deslocamento cervical e o ceco exposto por uma incisão no abdômen anterior. Um corte foi feito na junção ileocecal, e o conteúdo do ceco foi retirado por meio de lavagens com PBS estéril e filtrado em gaze, também estéril. O filtrado foi cultivado em 45 mL de meio líquido BHI, a 37°C. A cada 24 horas, a suspensão bacteriana foi centrifugada e o meio BHI trocado. No final do 5º dia de realização deste procedimento, a suspensão foi centrifugada, ressuspensa em volume conhecido e liofilizada em liofilizador (*Hetovac CT 110, Heto Lab Equipament, A/S, Birkerød, Denmark*). As alíquotas foram

congeladas em freezer -70°C até o uso. Uma quantidade representativa das alíquotas foram descongeladas, homogeneizadas em 45 mL de BHI e cultivadas por 20 horas a 37°C . Em seguida, a suspensão foi lavada 2 vezes com PBS estéril e diluições dessas alíquotas foram semeadas em placas de petri contendo meio ágar Mueller-Hinton, como descrito no item *Crescimento bacteriano*. A média obtida dos números de UFC contado nas placas após 18 horas de incubação foi considerada a estimativa do número de bactérias viáveis, quando seguidas as mesmas condições de cultivo.

2.9. Ensaio de *killing*

O ensaio de *killing* foi desenvolvido com neutrófilos peritoneais estimulados por 6 horas com 3 mL de tioglicolato 3%. A coleta dos neutrófilos foi procedida como descrito no item *Migração de neutrófilos* usando como meio RPMI com 10U/mL de heparina sódica (Parinex, Hipolabor, Sabará, MG, BR). Após a contagem, 1×10^6 neutrófilos foram incubados por 3 horas, a 37°C , com 2×10^6 bactérias isoladas da flora intestinal. Em seguida, os neutrófilos foram lisados com 500 μL de Triton X-100, 0,2%, sonicadas por 2 minutos e mantidas em temperatura ambiente por 15 minutos, para permitir a liberação no meio das bactérias que ainda permaneciam vivas, porém no interior das células. Após, 10 μL do meio de incubação foram semeados em placas contendo meio ágar Mueller-Hinton. O ensaio foi realizado como descrito no item *Crescimento bacteriano*.

2.10. Produção de superóxido

A produção de superóxido pelos neutrófilos foi estimada pelo teste de redução do tetrazólio de nitroazul (NBT – Sigma-Aldrich®) não estimulado conforme descrito anteriormente [41a]. Em resumo, 25µL de sangue foi adicionado à mesma quantidade de NBT (1mg/mL) e incubado a 37°C durante 15 minutos, seguindo-se de 15 minutos em temperatura ambiente. A porcentagem de células redutoras de NBT foi estabelecida a partir da contagem de 100 neutrófilos em microscópio óptico.

2.11. Apoptose

O sangue dos animais submetidos ou não à sepse foi coletado em tubos heparinizados e as hemácias foram lisadas com tampão de lise. Após lavagem das células com PBS 1 X, 1 µg/mL de Anexina V FITC e 1 µg/mL de iodeto de propídeo (PI) (*SouthernBiotech, Birmingham, UK*) foram incubados por 20 minutos. Em seguida, 50 µL de tampão para anexin V foi adicionado e imediatamente lido em citômetro de fluxo (*FACSort, Becton Dickinson, San Jose, CA, USA*). Foram adquiridas 3×10^4 células por amostra e a análise foi avaliada com auxílio do software CellQuest (*Becton Dickinson, San Jose, CA, USA*), na *gate* de neutrófilos. As porcentagens de células viáveis e células necróticas (anexina V- e PI-) e apoptóticas/necróticas (anexina V+ e PI+) foi determinada como descrito previamente (Vermes, Haanen *et al.*, 1995).

2.12. Microscopia intravital

A microscopia intravital foi realizada 6 horas após a indução da sepse, em animais selvagens e deficientes para caspase-1. Os animais foram anestesiados com tribromoetanol (0,25 mg/kg, ip) e por meio de uma laparotomia o mesentério foi exposto para avaliação *in situ* da microcirculação. Os animais foram mantidos sobre uma placa aquecida a 37°C, dotada de área transparente, sobre a qual o tecido foi fixado. A preparação foi mantida úmida e aquecida por irrigação com salina estéril a 37°C. A placa aquecida foi mantida sobre o *charriot* de um microscópio óptico tri-ocular, ao qual estavam acoplados um fototubo, com sistema de lentes ampliadoras superpostas, uma câmera e um monitor de vídeo que permitiu a projeção e gravação das imagens. O aumento final foi de 3400 vezes. Os vasos selecionados para o estudo foram vênulas pós-capilares com diâmetro variando entre 10 e 16 μm . O rolamento foi avaliado pela análise dos vasos durante 10 minutos e o resultado considerado a partir da média de todos. Os resultados do rolamento foram expressos como número de leucócitos que rolaram por minuto por vaso. A adesão foi avaliada em uma extensão de 100 μm^2 de vênula, definida na tela do monitor, onde 10 μm no tecido correspondem a 3,4 cm na tela. O número de células aderidas foi avaliado utilizando-se imagens visualizadas no vídeo. Uma dada seção do leito vascular foi testada somente uma vez para a determinação do número de leucócitos aderidos ao endotélio e o resultado foi estimado pela média de todos os animais, sendo expresso como número de leucócitos aderidos a cada 100 μm^2 .

2.13. Tratamento com IL-1Ra

O tratamento dos camundongos C57Bl/6 com IL-1Ra (gentilmente cedida pelo Dr. Steven Poole (*National Institute for Biological Standards and Control, UK*), foi realizado por via subcutânea, na dose de 100mg/kg, 1 hora antes da indução da sepse por CLP, com reforço dessa dose em 6, 12, 24, 36, 48 e 60 horas após a cirurgia. Durante e após o tratamento, o número de animais sobreviventes foi registrado a cada 24 horas. A dose citada também foi administrada 1 hora antes da injeção intraperitoneal de 75 pg de rIL-1 β /cavidade peritoneal dos camundongos. A cavidade peritoneal foi lavada 4 horas após a administração da citocina e o número de neutrófilos foi contado como descrito no item “*Migração de neutrófilos*”.

2.14. Tratamento com IL-33

A citocina IL-33 recombinante murina foi gentilmente cedida pelo professor Dr. Foo Y. Liew (*University of Glasgow, UK*). O tratamento com IL-33 consistiu em administração intravenosa de 1 mg/Kg da citocina, 27 e 3 horas antes da indução da sepse. Após a recuperação da cirurgia, o número de animais sobreviventes foi registrado a cada 24 horas.

3.1. Caracterização dos animais deficientes para caspase-1

Para confirmar a ausência ou a presença do gene codificador da caspase-1 nos animais, procedemos a análise por PCR de DNA extraído da cauda dos camundongos. A análise do gel confirmou a deficiência do gene da caspase-1 nos animais tidos como deficientes para caspase-1, o que pode ser observado na figura 1A pela ausência da banda 3P, referente ao gene da caspase-1 e presença da banda referente à inserção Neo3P. Ao contrário dos animais deficientes para caspase-1, o material extraído de animais selvagens apresentam banda referente à porção 3P e ausência da banda referente a Neo3P. Com base neste resultado, confirmamos a deficiência dos animais para sintetizar caspase-1.

Além da ausência do gene codificador de caspase-1, avaliamos também a alteração na atividade biológica decorrente da ausência desta enzima. Essa avaliação foi possível pela quantificação da citocina IL-1 β , que depende de caspase-1 para tornar-se ativa, após indução de sepse (figura 1B). Como esperado, a concentração de IL-1 β no lavado peritoneal foi menor nos animais deficientes para caspase-1, reforçando, assim, a ausência de caspase-1 e redução na atividade biológica exercida por esta enzima nestes animais.

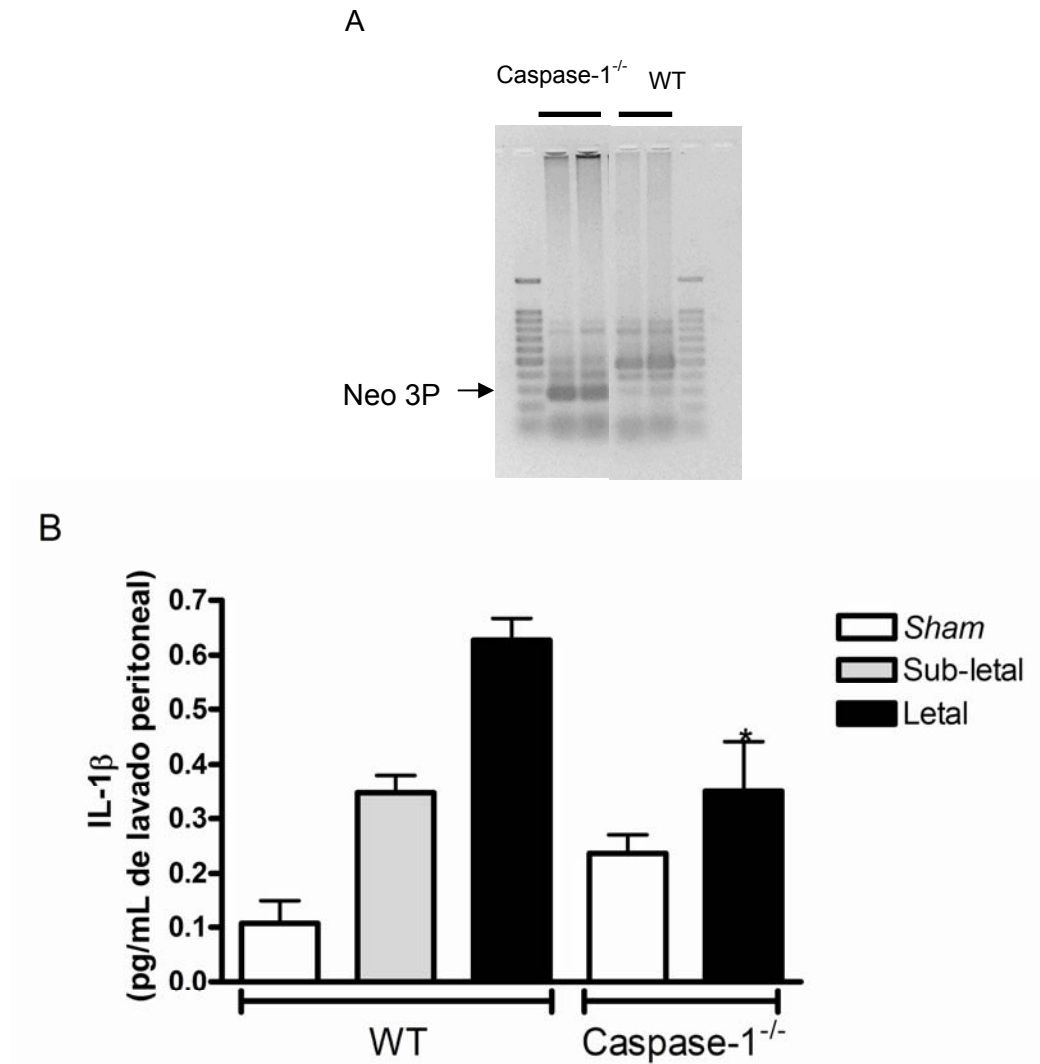


Figura 1: Caracterização dos animais deficientes para caspase-1. (A) O material genético dos animais selvagens C57Bl/6 e deficientes para caspase-1 foram extraídos e analisados em gel de eletroforese após PCR. (B) Animais selvagens C57Bl/6 e deficientes para caspase-1 ($n=5$) foram submetidos à cirurgia de CLP para indução de sepse sub-lethal e letal. Após 6h, a cavidade peritoneal foi lavada e o sobrenadante do lavado peritoneal foi utilizado para determinação da produção da citocina IL-1 β pelo método de ELISA. Os resultados são expressos em pg de citocina / ml de lavado peritoneal. A análise foi realizada por ANOVA, seguida por *Bonferroni's Test*, * $P<0.05$.

3.2. Animais deficientes para caspase-1 apresentam aumento na resistência à sepse letal

Após confirmar a deficiência para caspase-1 nos animais, avaliamos a resistência destes à sepse polimicrobiana letal induzida por CLP. De maneira muito interessante, os animais deficientes para caspase-1 apresentaram taxa de sobrevivência maior que os animais selvagens. Como o esperado, os animais selvagens submetidos à sepse letal apresentaram 100% de mortalidade até 48 horas após a indução da mesma (figura 2). Surpreendentemente, os animais deficientes para caspase-1 apresentaram 57% de sobrevivência no 5º dia após a CLP e mantiveram essa porcentagem até o final da avaliação. De acordo com a análise estatística de *Mantel-Cox*, as curvas de sobrevida dos animais diferem entre si, com um $P < 0.05$. Estes resultados sugerem a participação da enzima caspase-1 na susceptibilidade à sepse polimicrobiana grave. Desta forma, nossas próximas investigações neste trabalho fizeram referência à identificação do papel da caspase-1 na sepse polimicrobiana grave.

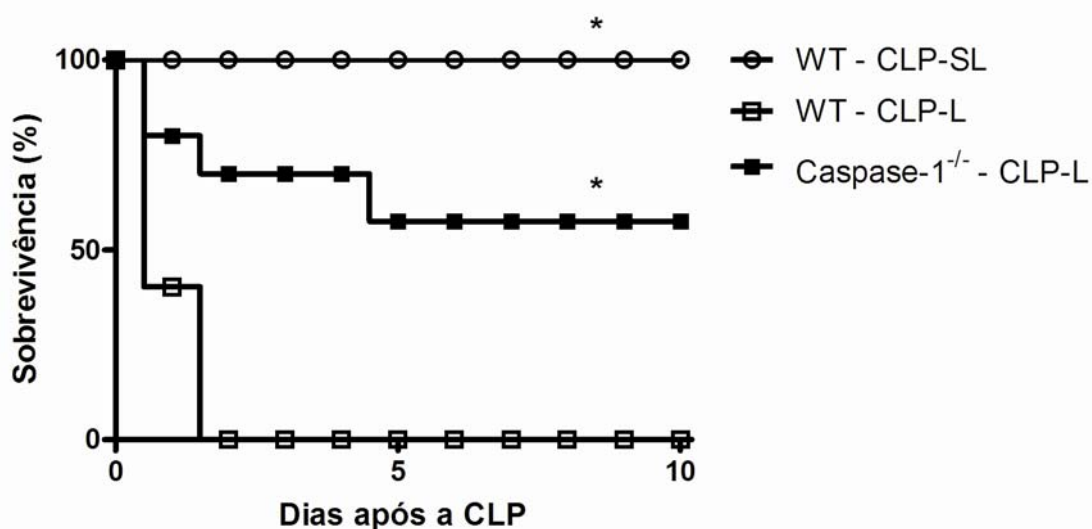


Figura 2: Avaliação da resistência dos animais deficientes para caspase-1 à sepsise letal. Animais selvagens C57Bl/6 e animais deficientes para caspase-1 ($n=5$) foram submetidos à sepsise polimicrobiana sub-letal ou letal, induzida por CLP. Após a indução da sepsise, a taxa de sobrevivência dos animais foi registrada a cada 24h, durante 10 dias. Os resultados são expressos como porcentagem de sobrevivência e foram analisados por *Log-rank Mantel-Cox Test* (* $p<0.05$).

3.3. Redução na concentração das citocinas clivadas pela caspase-1 não resulta em aumento na resistência de animais selvagens submetidos à sepsise letal

Uma importante função da caspase-1 é clivar as pró-citocinas pertencentes à superfamília da IL-1 (IL-1 β , IL-18 e IL-33) em suas formas ativas (Arend, Palmer *et al.*, 2008). Uma vez que a deficiência de caspase-1 em animais foi relacionada a um aumento na resistência à sepsise polimicrobiana grave, nossa primeira pergunta foi se tais citocinas teriam participação na gênese desta patologia. Inicialmente, estimamos a participação da IL-1 β utilizando o antagonista do receptor da IL-1 (IL-1Ra) como ferramenta farmacológica para bloquear a resposta da IL-1 (α e β) via seu receptor (IL-1R). Para isso, administramos uma dose considerada alta de IL-1Ra (100 mg/kg) (Alexander, Doherty *et al.*, 1992) (Granowitz, Porat *et al.*, 1993; Opal, Fisher *et al.*, 1997) 1 hora antes da CLP para que os receptores da IL-1 já estivessem bloqueados

durante a indução da sepse. Para manter o bloqueio dos receptores, a primeira dose foi reforçada 6 e 12 horas após a indução da sepse por CLP e pela administração de doses repetidas a cada 12 horas durante 2 dias (esquema figura 3A). Os animais tratados com IL-1Ra não apresentaram redução da mortalidade como observado nos animais deficientes para caspase-1 e, de maneira semelhante aos animais controles, apresentaram alta taxa de mortalidade (80% *versus* 100% nos selvagens), valores estes não considerados diferentes por análise estatística de Mantel-Cox, para $P < 0.05$ (figura 3A). Este resultado sugere que a redução na concentração de IL-1 β ativa durante a sepse letal não é um fator crítico para a resistência dos animais submetidos a esta patologia.

Para assegurarmos a potência biológica do IL-1Ra em impedir o efeito causado pela IL-1 β , induzimos migração peritoneal por administração intraperitoneal de IL-1 β recombinante murina em animais selvagens (figura 3B). Como esperado, o tratamento com IL-1Ra impediu a migração de neutrófilos induzida pela citocina, sugerindo que, de fato, este esquema de tratamento bloqueia o receptor da IL-1, impedindo a resposta induzida por IL-1 β .

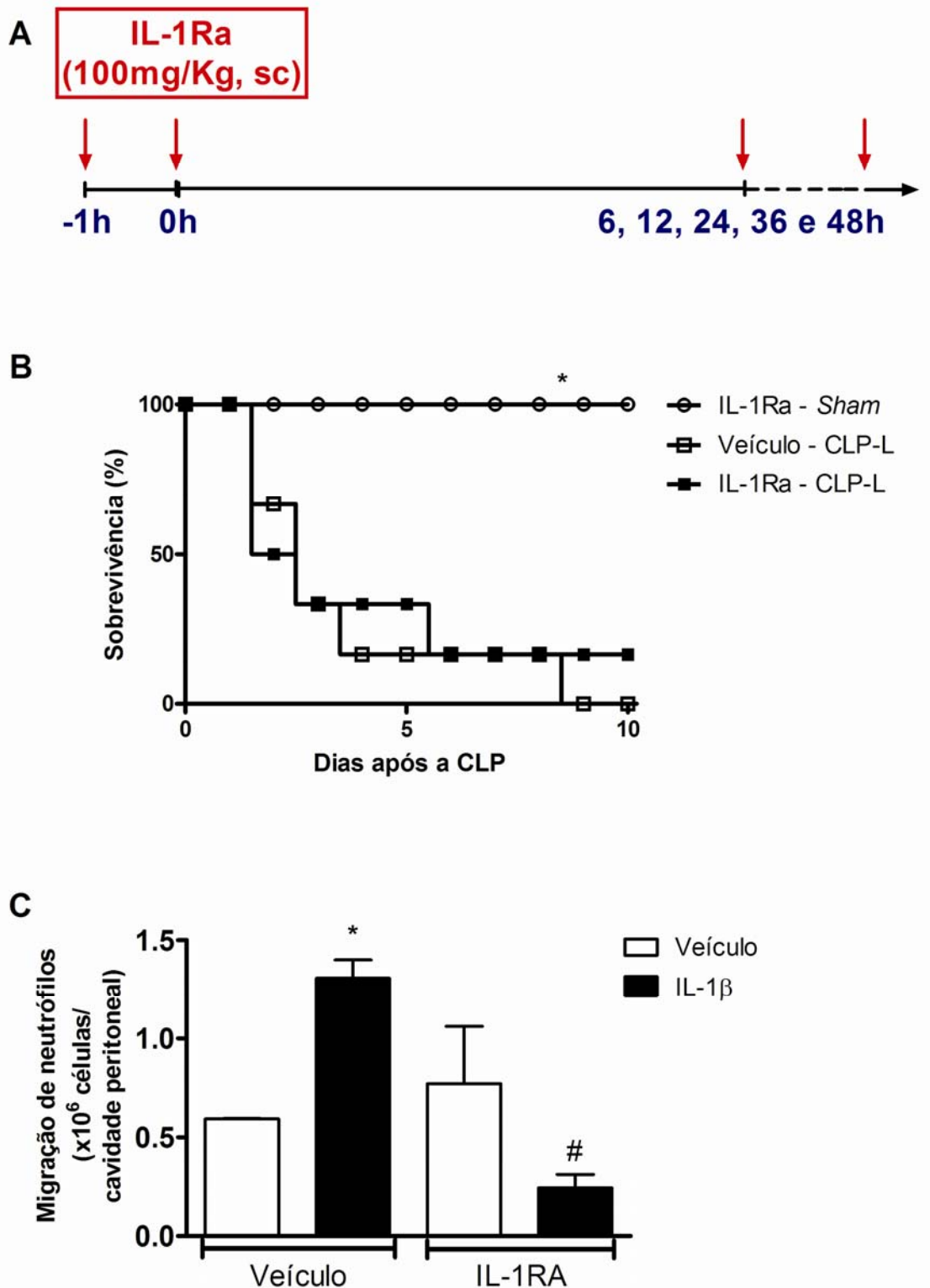


Figura 3: Efeito do tratamento com IL-1Ra na curva de sobrevivência após sepse letal. (A) Animais selvagens C57Bl/6 ($n=5$) submetidos à sepse letal induzida por CLP foram tratados de acordo com o esquema. A taxa de sobrevivência dos animais foi registrada a cada 24h, durante 10 dias. Os resultados são expressos como porcentagem de sobrevivência e foram analisados utilizando-se o *Mantel-Cox Test* (B) Animais selvagens C57Bl/6 receberam 100mg/Kg de IL-1RA (sc) e após 1 hora 75 pg/Kg de IL-1 β . O lavado peritoneal foi coletado depois de decorridas 4h da última injeção e o número de neutrófilos foi contado e expresso como número de neutrófilos $\times 10^6$ / cavidade peritoneal. Os resultados foram analisados por ANOVA seguida por *Bonferroni Test*, $*P<0.05$.

A IL-18 é outra citocina que depende da caspase-1 para ser convertida em sua forma ativa. Para excluirmos a participação da IL-18 ativa, na susceptibilidade à sepse letal, submetemos animais deficientes para esta citocina à cirurgia de CLP e, interessantemente, estes apresentaram curva de sobrevivência semelhante a dos animais selvagens (20% a partir do 3º dia de observação, figura 4). Desta forma, podemos sugerir que a IL-18 não possui papel crítico na resistência à sepse letal, e, conseqüentemente, o aumento na resistência apresentado pelos animais deficientes em caspase-1 não deriva da ausência de IL-18 inativa.

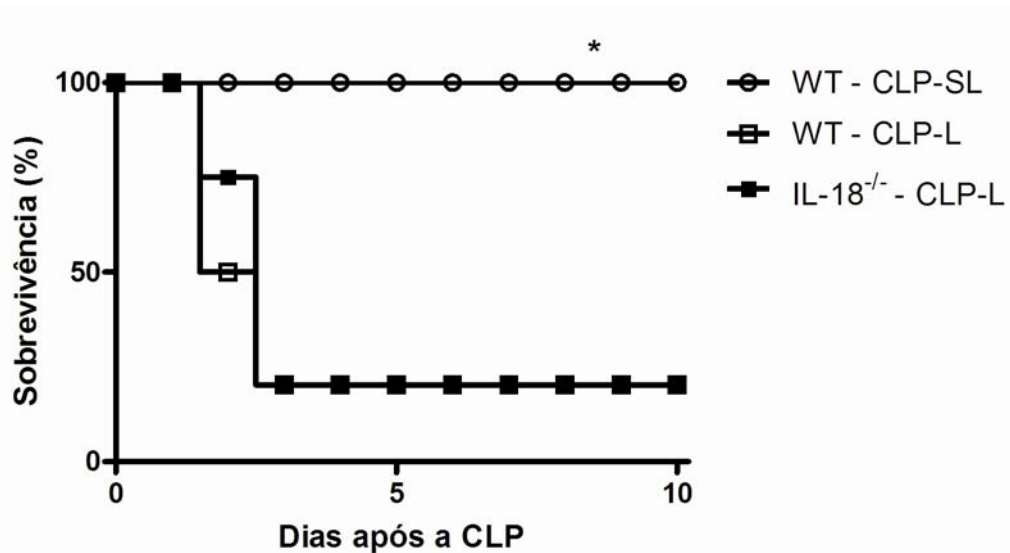


Figura 4: Avaliação da resistência dos animais deficientes para IL-18 à sepse letal. Animais selvagens Balb/C e animais deficientes para IL-18 ($n=5$) foram submetidos à sepse polimicrobiana letal, induzida por CLP. Após a indução da sepse, a taxa de sobrevivência dos animais foi registrada a cada 24h, durante 10 dias. Os resultados são expressos como porcentagem de sobrevivência e foram analisados com o *Log-Rank Mantel-Cox Test*.

A IL-33, que tem seus efeitos mediados pelo receptor ST2, foi descrita recentemente e sua clivagem tem sido atribuída a caspase-1 (Dinarello, 2005). Avaliamos o papel desta citocina na sepse pela administração de duas doses de IL-33 (1 µg/kg, i.v.) em animais selvagens C57Bl/6, uma 27 e outra 3 horas antes da

indução da sepse por CLP. Surpreendentemente, os animais tratados com IL-33 apresentaram um aumento na resistência à sepse letal, onde a taxa de sobrevivência destes animais foi maior em comparação aos animais não-tratados (33% *versus* 0%, respectivamente, figura 5A). Este resultado é reforçado pela observação que animais deficientes para o receptor da IL-33, ST2, apresentam comportamento semelhante aos animais selvagens quando submetidos à sepse (figura 5B). Sendo assim, este dado sugere que a ausência da IL-33 ativa nos animais deficientes para caspase-1 não é o fator determinante para o aumento na resistência observado nestes animais, uma vez que a administração da citocina é responsável pelo aumento da resistência à sepse e a deficiência do receptor em que esta age não altera a resistência à patologia em questão.

Com base nestes dados podemos sugerir que o aumento na resistência à sepse, observado nos animais deficientes para caspase-1 não é decorrente da ausência ou redução da ação da IL-1 β , IL-18 ou IL-33 durante o desenvolvimento da patologia.

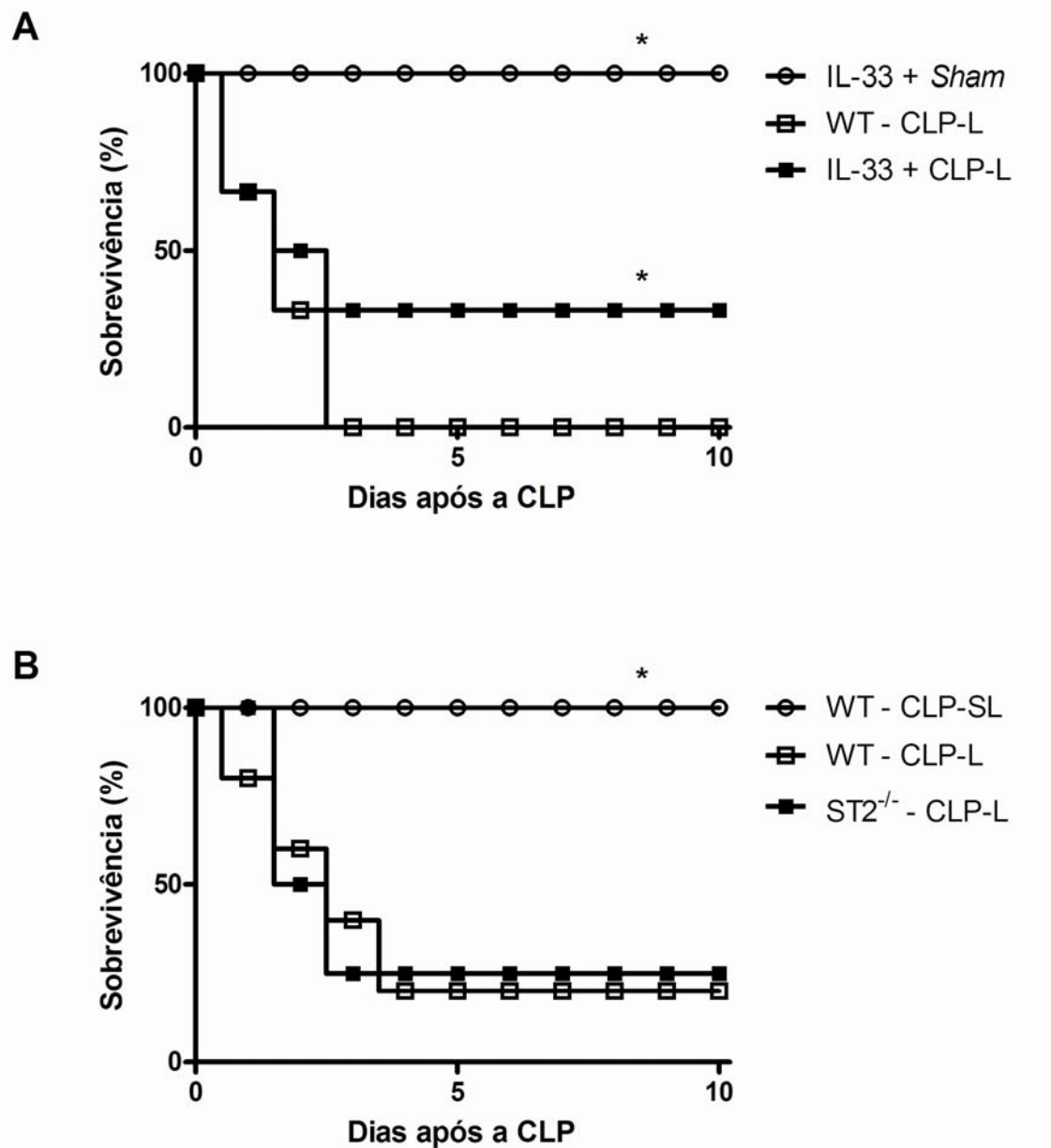


Figura 5: Avaliação do efeito do tratamento com IL-33 e da deficiência do receptor ST2 na resistência à sepse letal. (A) Animais selvagens C57Bl/6 ($n=5$) foram tratados com 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de IL-33 (i.v.) 27 e 3 horas antes da indução da sepse por CLP. (B) Animais selvagens Balb/C e animais deficientes para o receptor ST2 ($n=5$) foram submetidos à sepse polimicrobiana letal, induzida por CLP. Após a indução da sepse, o número de animais sobreviventes foi registrado a cada 24h, durante 10 dias. Os resultados são expressos como porcentagem de sobrevivência e foram analisados com *Log-Rank Mantel-Cox Test*.

3.4. Animais deficientes para caspase-1 apresentam produção normal de citocinas e quimiocinas no local da infecção

Algumas citocinas, diferentes das avaliadas na sessão anterior, e algumas quimiocinas possuem uma importância fundamental no processo de resolução de uma infecção. Muitas delas não possuem descrição de dependência da caspase-1 para produção e liberação. Isto foi, de fato, confirmado pela determinação da concentração das citocinas TNF- α e IL-6 (figuras 6B e D, respectivamente) no exudato peritoneal 6 horas após a indução da sepse. Embora em concentrações maiores que aquelas dos animais selvagens submetidos à sepse sub-letal, os animais deficientes para caspase-1 apresentaram concentrações semelhantes às daquelas dos animais selvagens submetidos à sepse letal, indicando a normalidade deste parâmetro nos animais em estudo. Ainda, a concentração local de quimiocinas CXC, MIP-2 e KC (figuras 6A e B), também foram encontradas em concentrações similares nos dois grupos de animais testados, reforçando a habilidade dos animais deficientes para caspase-1 em estabelecer uma resposta inflamatória local adequada.

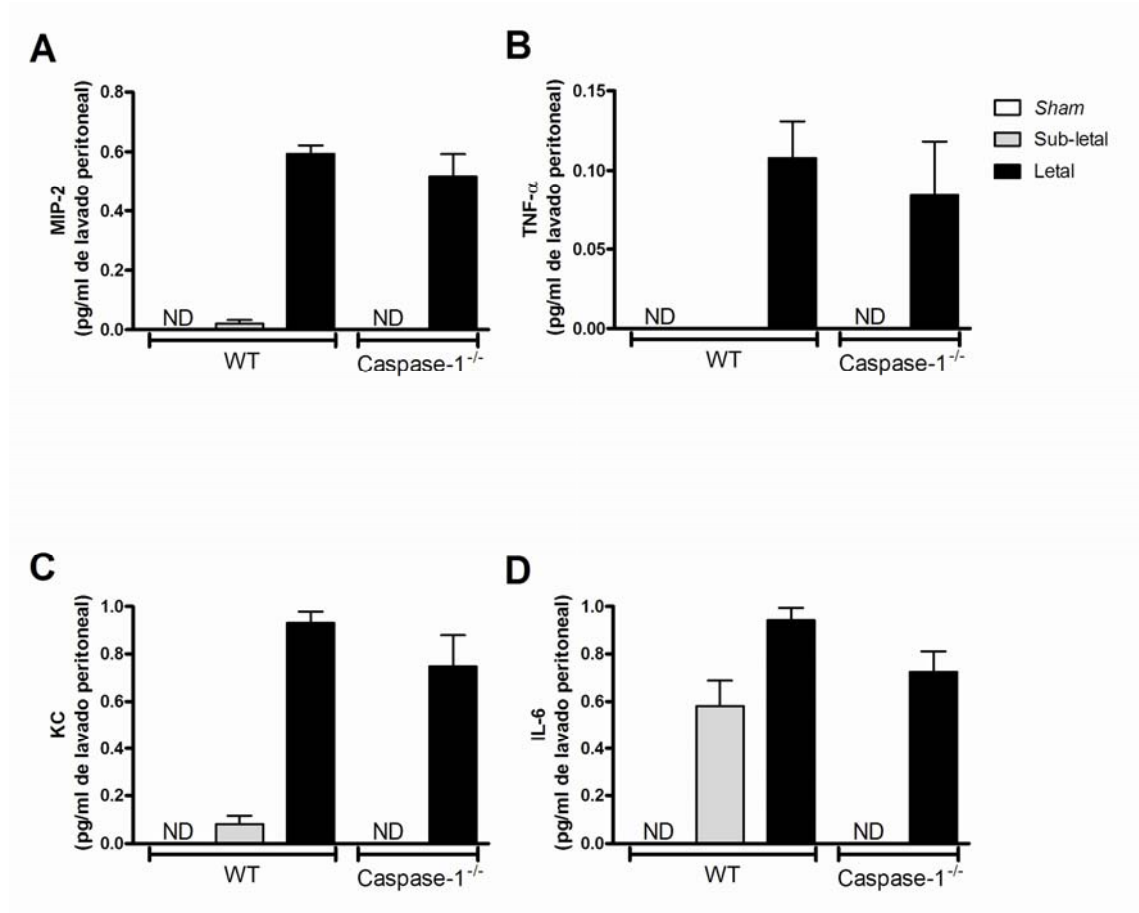


Figura 6: Avaliação da produção local de citocinas e quimiocinas durante a sepse. Animais selvagens C57Bl/6 e deficientes para caspase-1 ($n=5$) foram submetidos à cirurgia de CLP para indução de sepse sub-letal ou letal. Após 6h, a cavidade peritoneal foi lavada e o sobrenadante do lavado peritoneal foi utilizado para determinação da produção das quimiocinas (A) MIP-2 e (C) KC e citocinas (B) TNF- α e (D) IL-6 pelo método de ELISA. Os resultados são expressos em pg de citocina ou quimiocina/ ml de lavado peritoneal. A análise foi realizada por ANOVA, seguida pelo teste de Bonferroni.

3.5. Animais deficientes para caspase-1 apresentam redução na concentração sistêmica de citocinas

Diferentemente da produção local de citocinas e quimiocinas, a presença de concentrações sistêmicas altas destes mediadores pode ter implicações no agravamento da resposta sistêmica inflamatória durante a sepse. Embora não tenhamos encontrado diferenças entre as concentrações das citocinas avaliadas no local da infecção de animais deficientes ou não para caspase-1, a determinação das concentrações sistêmicas destas citocinas foi marcadamente importante. O plasma dos animais deficientes para caspase-1 submetidos à sepse letal apresentou redução na concentração de TNF- α e IL-6 em relação aos animais selvagens submetidos à mesma intensidade de sepse, aproximando-se aos valores encontrados nos animais selvagens submetidos à sepse grave (figuras 7A e B, respectivamente). A partir deste resultado é possível inferir que a inflamação sistêmica está reduzida nos animais que apresentam deficiência para caspase-1. Este dado corrobora o aumento na resistência à sepse apresentado pelos animais deficientes para caspase-1.

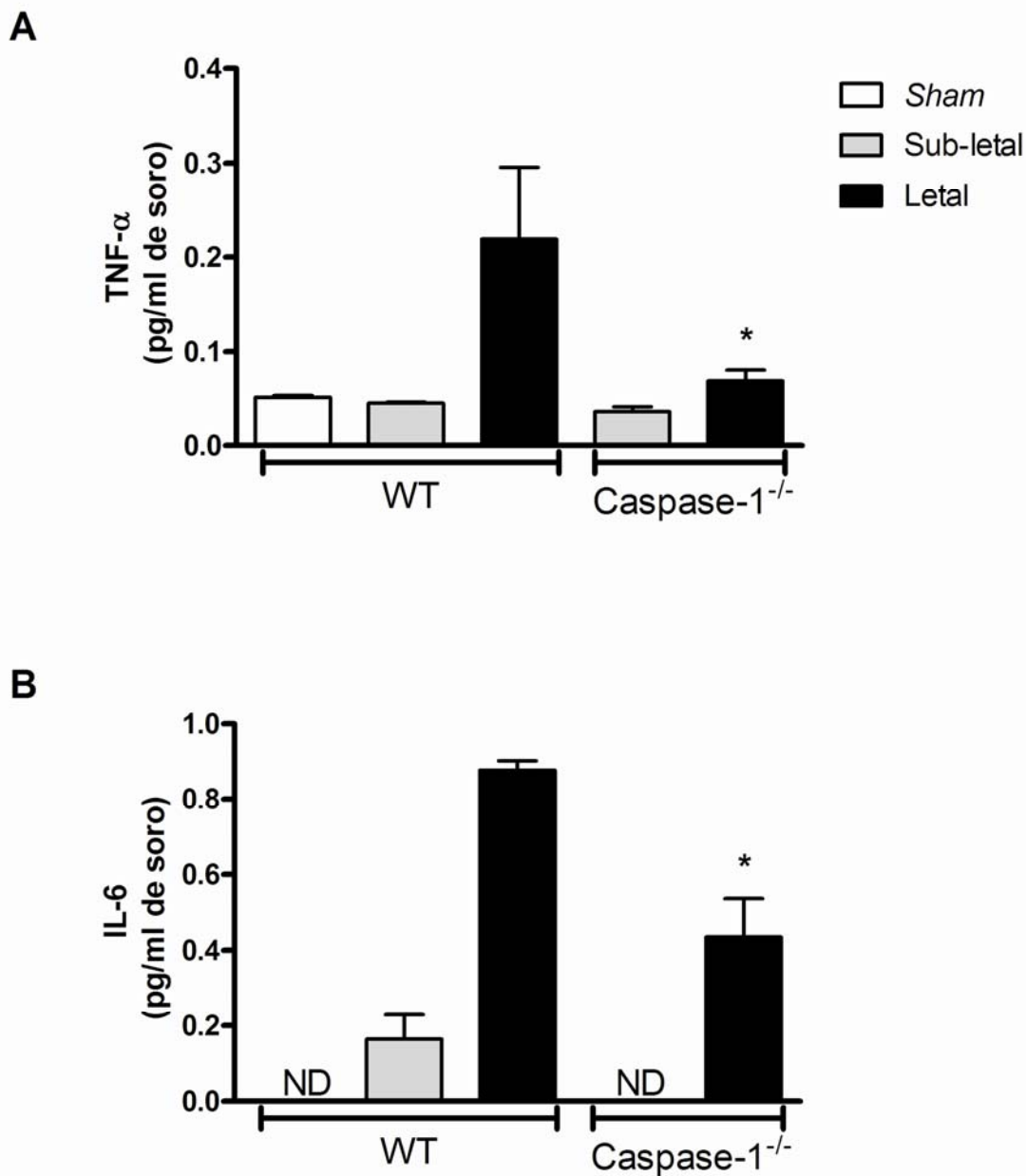


Figura 7: Avaliação da produção sistêmica de citocinas e quimiocinas durante a sepse. Animais selvagens C57Bl/6 e deficientes para caspase-1 ($n=5$) foram submetidos à cirurgia de CLP para indução de sepse sub-lethal ou letal. Após 6h, o sangue foi coletado e o plasma foi utilizado para determinação da produção das citocinas (A) TNF- α e (B) IL-6 pelo método de ELISA. Os resultados são expressos em pg de citocina / ml de plasma. A análise foi realizada por ANOVA, seguida pelo teste de Bonferroni (* $p<0,05$).

3.6. Animais deficientes para caspase-1 apresentam maior controle do crescimento bacteriano durante a sepse letal

Aliado à redução da intensidade da inflamação sistêmica, o controle do crescimento bacteriano é um fator crucial na resolução da sepse. Visto que observamos redução nas concentrações sistêmicas das citocinas importantes nessa patologia, TNF- α e IL-6, nos animais deficientes para caspase-1 em comparação aos selvagens, nossa próxima investigação foi avaliar o número de bactérias em crescimento no organismo durante a sepse. Surpreendentemente, os animais deficientes para caspase-1 apresentaram uma redução acentuada no crescimento bacteriano local quando comparados aos animais selvagens submetidos à sepse letal. De acordo com o esperado, o controle eficiente do crescimento bacteriano local evita a proliferação sistêmica de bactérias, o que, de fato, é observado nos animais deficientes para caspase submetidos à sepse letal (figuras 8A e B, respectivamente). O número de bactérias encontradas no local da infecção e na circulação de animais deficientes para caspase-1 é menor que aquele apresentado por animais selvagens submetidos à sepse letal, aproximando-se do observado nos animais selvagens submetidos à sepse sub-letal. Juntos, estes resultados explicam o aumento da resistência à sepse letal observado nos animais deficientes para caspase-1, uma vez que o controle da infecção reduz o desencadeamento da infecção por reduzir a quantidade do agente etiológico, e com isso, reduz a inflamação sistêmica, também responsável por complicações durante a sepse letal.

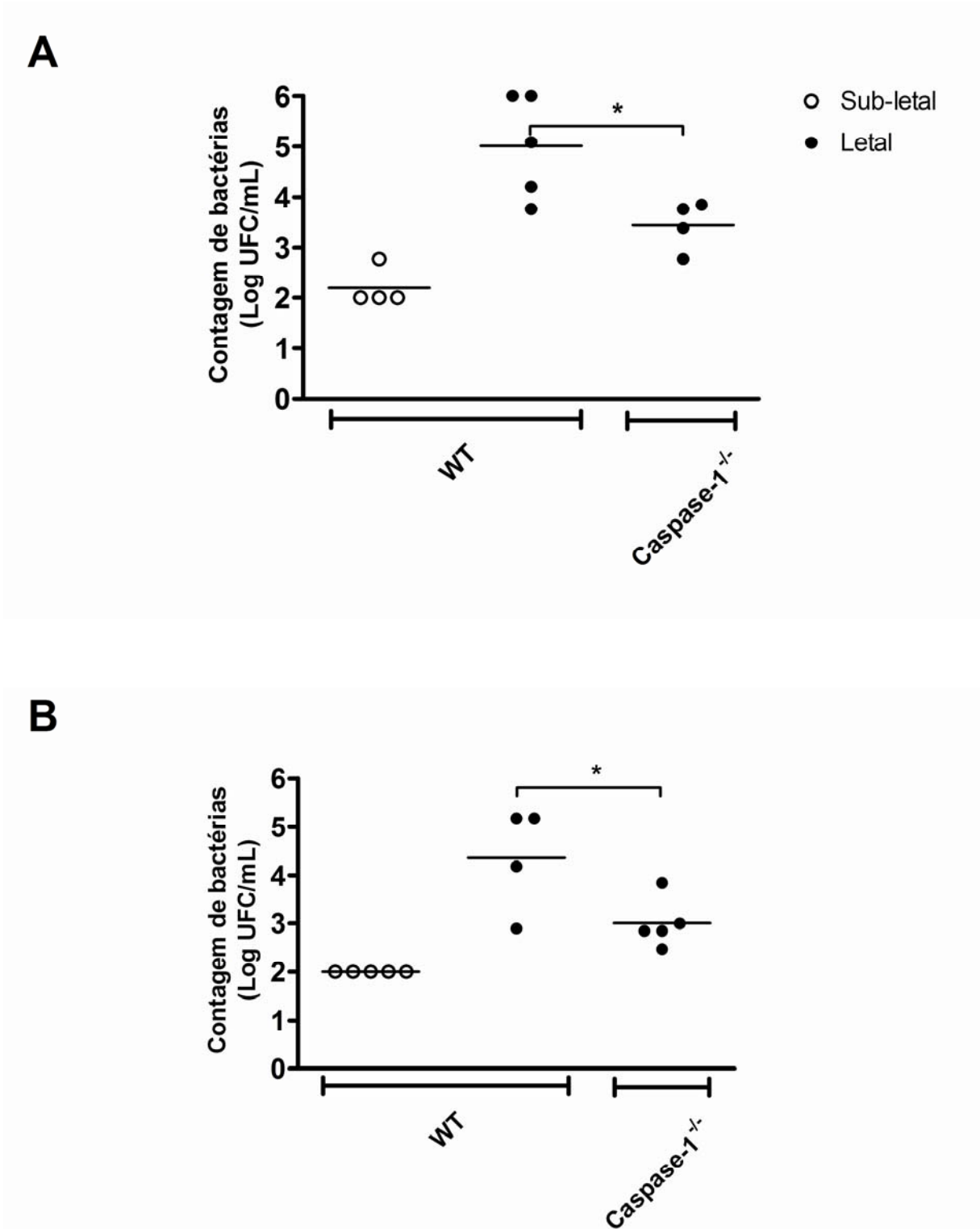


Figura 8: Avaliação do crescimento bacteriano no lavado peritoneal e no sangue durante a sepse. Animais selvagens C57Bl/6 ($n=5$) foram submetidos à sepse letal induzida por CLP e 6 horas após (A) o lavado e (B) o sangue dos animais foram coletados. O número total de bactérias foi estimado pelo cultivo das amostras em placas contendo meio Mueller-Hinton durante 12 horas. Os resultados são expressos como Log do número de unidades formadoras de colônia (UFC) por ml de amostra e foram analisados por *Mann-Whitney U test* (* $p<0,05$).

3.7. Animais deficientes para caspase-1 apresentam maior migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal e igual capacidade microbicida em relação aos animais selvagens durante a sepse letal

Sabemos que o controle no crescimento bacteriano durante a infecção é dependente do número de neutrófilos que migram para o foco da infecção e também da capacidade microbicida dos neutrófilos emigrados. De acordo com o apresentado no item anterior, animais deficientes para caspase-1 apresentaram um controle do crescimento bacteriano mais eficiente que os animais selvagens. Devido a isso, consideramos importante a avaliação da migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal. Interessantemente, o número de neutrófilos migrados apresentado pelos animais deficientes para caspase-1 submetidos à sepse letal foi marcadamente maior que a observada nos animais selvagens submetidos à sepse de mesma gravidade (figura 9). Tais valores assemelham-se aos de neutrófilos encontrados em animais submetidos à sepse sub-letal, o qual é considerado eficiente por controlar a infecção e ser associado a 100% de sobrevivência. De fato, este resultado corrobora o controle do crescimento bacteriano mais eficiente observado nos animais deficientes para caspase-1. No entanto, a capacidade microbicida dos neutrófilos deficientes para caspase-1 não apresenta diferença daquela encontrada nos neutrófilos selvagens (figura 10A), uma vez que o número de bactérias mortas pela incubação com neutrófilos selvagens foi semelhante àquele com neutrófilos deficientes para caspase-1. Ainda, a produção de superóxidos por neutrófilos circulantes não difere entre animais deficientes para caspase-1 e selvagens (figura 10B). Desta forma, o controle do crescimento bacteriano nos animais deficientes para caspase-1 ocorre pelo maior número de neutrófilos que migram para a

cavidade peritoneal, e não por diferenças entre os dois grupos na capacidade de matar as bactérias.

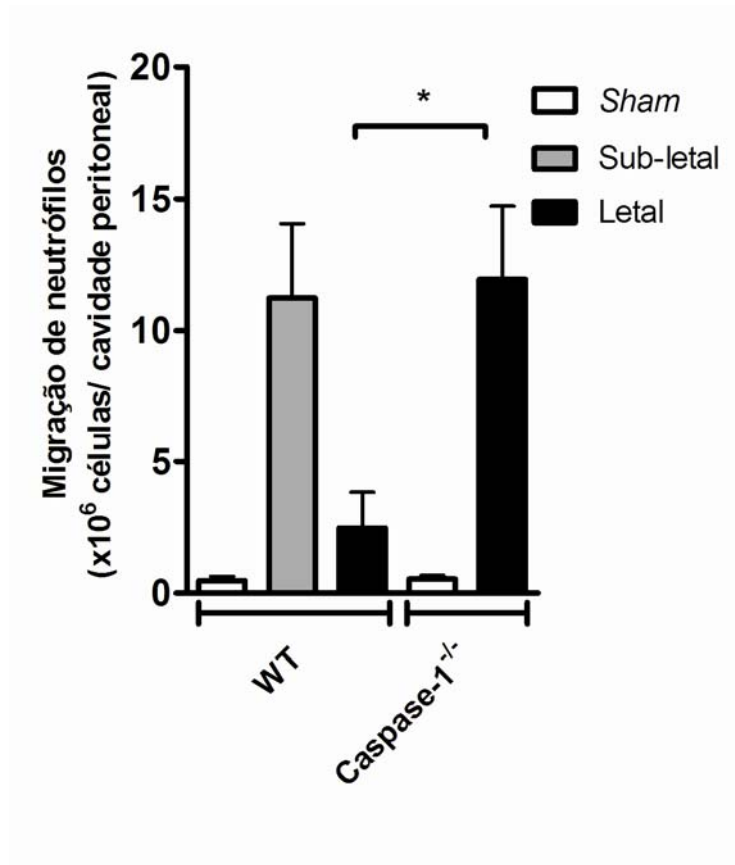


Figura 9: Avaliação da migração de neutrófilos para o foco infeccioso durante a sepse. Animais selvagens C57Bl/6 e deficientes para caspase-1 ($n=5$) foram submetidos à cirurgia de CLP para indução de sepse sub-letal ou letal. Após 6h, a cavidade peritoneal foi lavada e o número de neutrófilos foi registrado. Os resultados são expressos como número de neutrófilos $\times 10^6$ / cavidade peritoneal e foram analisados por ANOVA, seguida pelo teste de Bonferroni, considerando diferença significativa (*) quando $P < 0,05$.

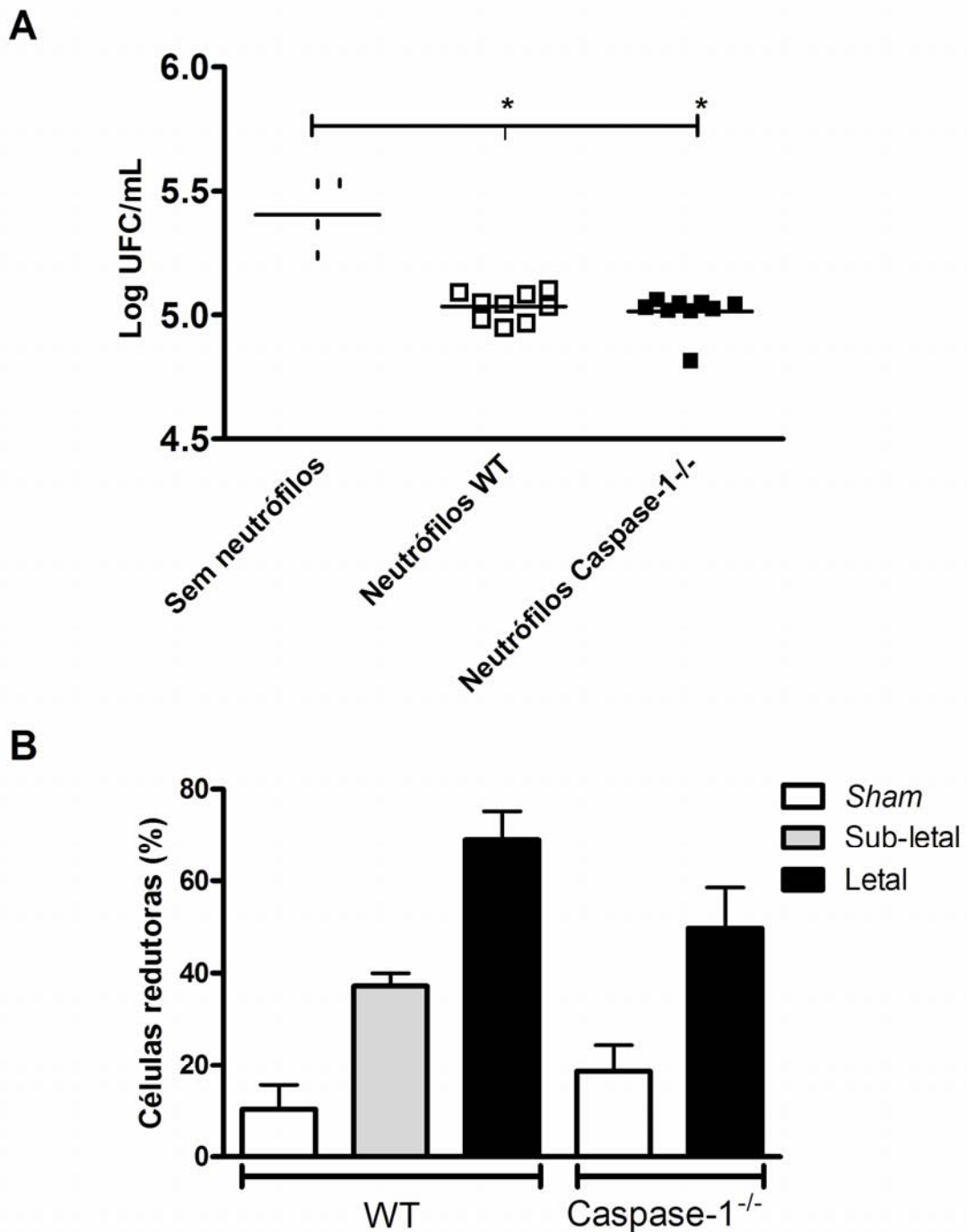


Figura 10: Avaliação da capacidade microbicida dos neutrófilos selvagens e deficientes para caspase-1. (A) Neutrófilos de animais selvagens C57Bl/6 ($n=5$) foram coletados após 6h de estímulo com tioglicolato 3%. Bactérias da flora intestinal opsonizadas foram incubadas ou não por 1,5h com os neutrófilos das duas fontes citadas. Em seguida, a suspensão foi semeada em placas contendo Mueller-Hunton e cultivadas por 18h. O número total de bactérias foi estimado e está expresso como Log do número de Unidades formadoras de colônia (UFC). (B) O sangue de animais foi coletado 6 horas após a indução de sepse sub-lethal e letal e adicionado a NBT. A quantidade de células redutoras foi estimada pela contagem de 100 células em microscópio óptico. Os resultados são expressos em porcentagem do número de células redutoras. Foram consideradas diferentes significativamente as análises com $P < 0,05$ (Mann-Whitney U test).

3.8. Neutrófilos deficientes para caspase-1 não apresentam diferença na viabilidade celular durante a sepse letal

Visto o aumento no número de neutrófilos na cavidade peritoneal nos animais deficientes para caspase-1, nos questionamos se a viabilidade celular dos neutrófilos circulantes poderia estar aumentada e com isso, aumentaria a habilidade para migrar para o foco infeccioso. Para isso, realizamos o ensaio de apoptose e necrose por citometria de fluxo. Para apoptose, usamos Anexina V que é uma proteína com propriedades de ligação aos fosfolípidos como a fosfatidilserina. Em células em estágio inicial de apoptose, a fosfatidilserina é translocada para a região externa da membrana, possibilitando a marcação pela anexina V. Para diferenciar células necróticas, que também expressam fosfatidilserina, das células apoptóticas, usamos o iodeto de propídeo (PI), que é um corante vital, empregado para marcação de células necróticas, que perdem a integridade da membrana (Vermes, Haanen *et al.*, 1995). Interessantemente, 6 horas após a indução da sepse, as porcentagens de apoptose e necrose dos neutrófilos circulantes, foi semelhante entre as células derivadas de animais deficientes ou não para caspase-1 submetidos à sepse sub-letal e letal (figura 11A). Conseqüentemente, a viabilidade celular entre os neutrófilos dos animais testados não foi diferente (figura 11B). Assim, podemos excluir a hipótese de que a ausência de caspase-1 possa alterar a viabilidade dos neutrófilos durante a sepse letal, favorecendo a migração para o foco infeccioso durante esta patologia.

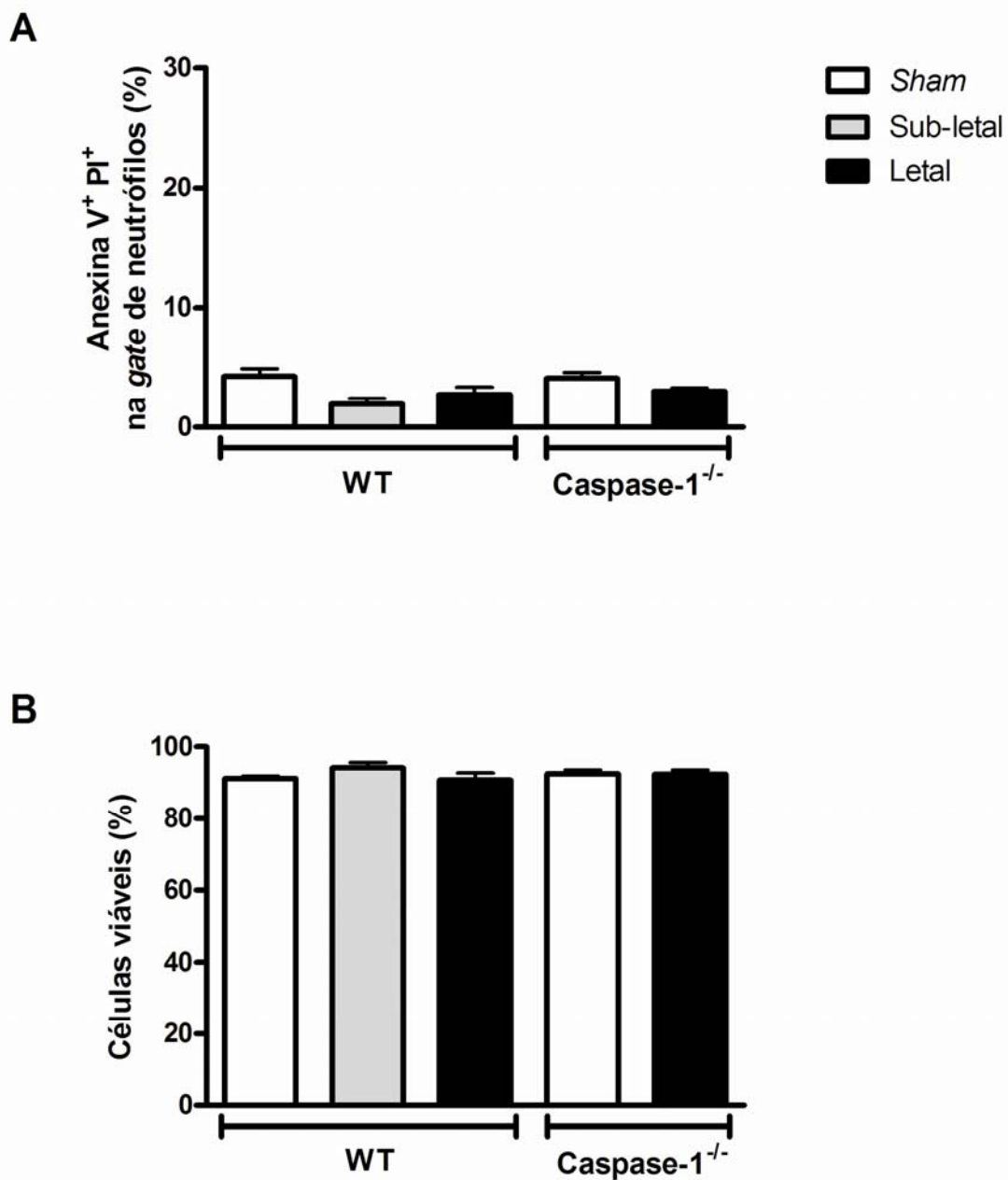


Figura 11: Avaliação da apoptose e necrose após indução de sepse em neutrófilos de animais selvagens e deficientes para caspase-1. Animais selvagens C57Bl/6 e deficientes para caspase-1 ($n=5$) foram submetidos à cirurgia de CLP para indução de sepse sub-letal e letal. Após 6h, o sangue foi coletado e incubado com Anexina V e Iodeto de propídeo e a porcentagem de (A) células apoptóticas e necróticas ou (B) células viáveis foi analisada por citometria de fluxo, na *gate* de neutrófilos. Os resultados são expressos como porcentagem de neutrófilos marcados com (A) Anexina V e Iodeto de propídeo ou (B) de células viáveis. ANOVA foi utilizada para analisar os resultados e foi seguida por *Bonferroni's test*.

3.9. Animais deficientes para caspase-1 apresentam aumento no número de rolamento e adesão de leucócitos em relação aos animais selvagens

Animais deficientes para caspase-1 apresentam maior controle do crescimento bacteriano em decorrência do maior número de neutrófilos que migram para a cavidade peritoneal. Para que a migração possa ocorrer, os leucócitos devem rolar e aderir ao endotélio vascular, permitindo a transmigração para o foco da lesão (Benjamim, Silva *et al.*, 2002). Portanto, avaliamos se estas etapas importantes estavam ocorrendo nos animais deficientes para caspase-1 e se estavam presentes em maiores proporções que nos animais selvagens. De fato, o número de leucócitos que rolam por minuto nos endotélio vascular é elevado nos animais deficientes em comparação aos selvagens submetidos à sepse letal (figura 12A). No entanto, o número de rolamentos nos animais deficientes aproxima-se do número de rolamentos nos animais selvagens submetidos à sepse sub-letal. O número de leucócitos aderidos por μm^2 nos animais deficientes para caspase-1 também foi maior que nos animais selvagens submetidos à sepse letal. No entanto, o número de adesões foi menor que aquele nos animais selvagens submetidos à sepse sub-letal (figura 12B). Este resultado está de acordo com o aumento no número de neutrófilos que migram para a cavidade peritoneal após o estímulo de indução da sepse.

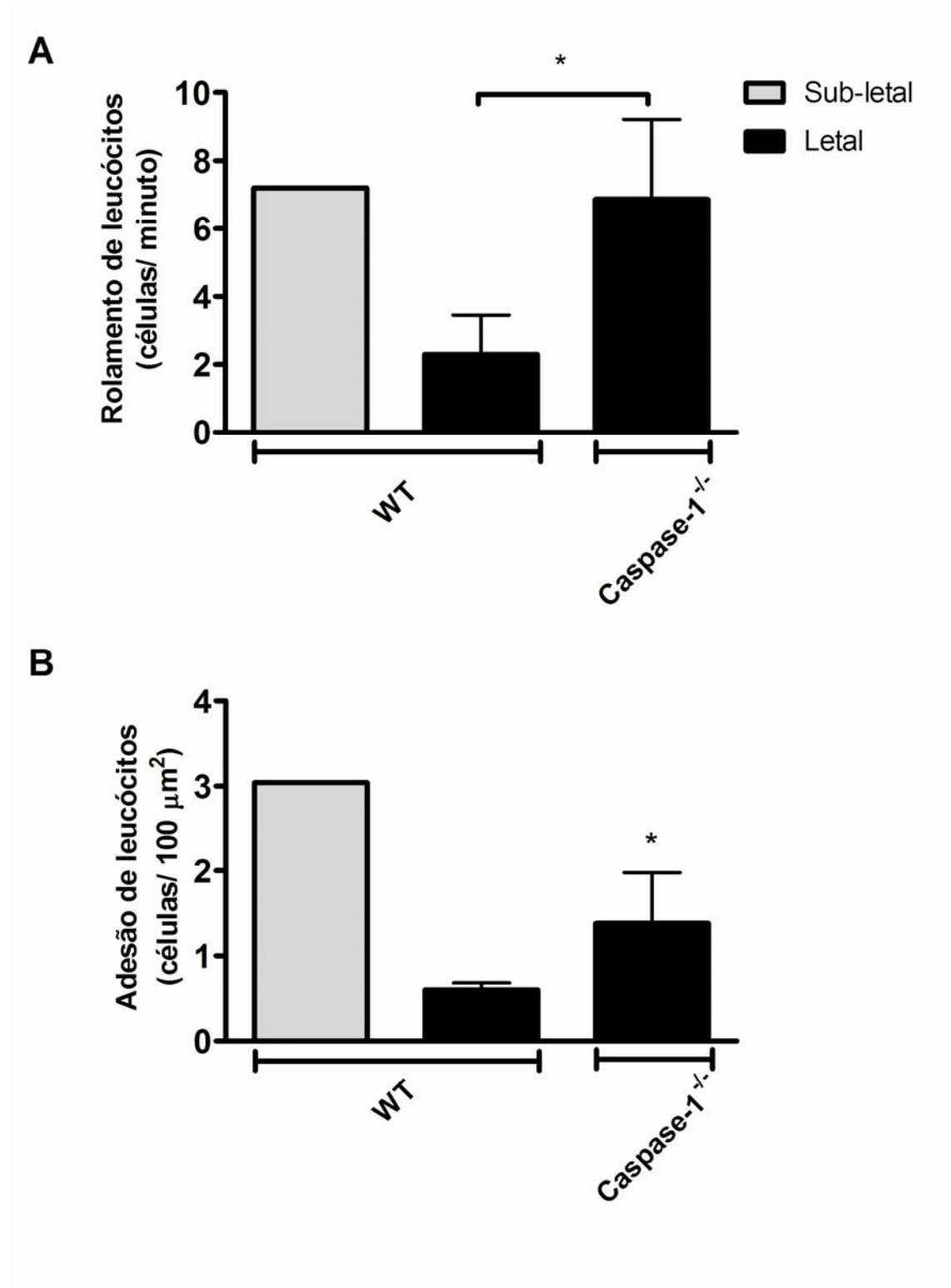


Figura 12: Avaliação do rolamento e adesão de leucócitos durante a sepse. Animais selvagens C57Bl/6 e deficientes para caspase-1 ($n=5$) foram submetidos à cirurgia de CLP para indução de sepse sub-lethal e letal. Após 6h, o mesentério foi exposto e analisado por microscopia intravital. Os resultados são expressos como (A) número de células que rolaram/ minuto ou número de células aderidas em 100 μm^2 (B). A análise estatística foi realizada por ANOVA seguida por *Bonferroni's test* (* $P<0,05$).

4 DISCUSSÃO

Neste trabalho demonstramos que animais deficientes para caspase-1 apresentam aumento na resistência à sepse letal. Reforçando nossos achados, existem dados na literatura demonstrando que animais deficientes para caspase-1 apresentam aumento de sobrevivência após sepse induzida por administração ip de *E.coli* e choque endotóxico por LPS (Li, Allen *et al.*, 1995; Sarkar, Hall *et al.*, 2006). Ainda, a administração de um inibidor de caspase-1 resultou em redução na mortalidade de animais submetidos à sepse induzida por CLP (Kalechman, Gafter *et al.*, 2002; Brodsky, Yosef *et al.*, 2007). Por outro lado, contrariamente aos nossos resultados, existem também demonstração na literatura que animais deficientes para caspase-1 apresentaram redução na resistência à infecção por *Salmonella Thyphimurium* (Raupach, Peuschel *et al.*, 2006) e por *E.coli* (Joshi, Kalvakolanu *et al.*, 2002). Joshi e colaboradores induziram sepse por *E.coli* com gravidade menor que a que induzimos por CLP. Por ser menos intensa e por utilizar apenas uma bactéria como agente etiológico, a resposta imune ativada durante a sepse induzida por eles pode não ter ativado as mesmas vias ativadas nos animais de nosso estudo. Além disso, o *background* dos animais do estudo de Raupach e colaboradores foi diferente do que usamos, podendo causar diferenças na análise de resultados.

Relatos da literatura mostram inequivocamente que caspase-1 é responsável pela ativação das citocinas IL-1 β , IL-18 e IL-33 (Dinarello, 2005). Ao contrário do esperado, a redução nas concentrações das citocinas IL-1 β , IL-18 e IL-33 parece não ser a responsável pela redução na taxa de mortalidade nos animais deficientes para caspase-1 submetidos à sepse letal. Isto é suportado no fato que o tratamento com antagonista do receptor da IL-1 não reduziu a mortalidade nos animais tratados. Ainda, animais deficientes para IL-18 e ST2, receptor de IL-33, submetidos à sepse,

também não apresentaram diferença na curva de mortalidade. Reforçando a hipótese de que a redução nas concentrações de IL-33 não seja responsável pelo aumento da resistência dos animais deficientes para caspase-1, observamos que a administração desta citocina antes da indução de sepse por CLP conferiu aos animais aumento na resistência a esta síndrome.

Intrigantemente, a determinação da concentração de IL-1 β no lavado peritoneal de animais deficientes para caspase-1 resultou em valores positivos, embora a concentração nestes animais seja a metade daquela encontrada em animais selvagens submetidos às mesmas condições. Por outro lado, esta detecção de IL-1 β no lavado peritoneal de animais deficientes para caspase-1 pode ser decorrente de reação cruzada no ensaio de ELISA, uma vez que o anticorpo utilizado interage com a pró-IL-1 β além da IL-1 β ativa. Ainda, estudo recente sugeriu que a ativação de IL-1 β em neutrófilos seja independente de caspase-1 e dependente de serino-proteases (Greten, Arkan *et al.*, 2007). De fato, animais submetidos à sepse letal apresentam neutrófilos na cavidade peritoneal e, portanto, a produção de IL-1 β nos animais deficientes para caspase-1 pode ocorrer nos neutrófilos, justificando assim, a presença de IL-1 β no lavado peritoneal destes animais.

Por outro lado, a produção local de citocinas como TNF- α e IL-6 e das quimiocinas MIP-2 e KC não foi alterada durante a sepse letal, indicando a capacidade inalterada em estabelecer a resposta inflamatória local em animais deficientes para caspase-1 na sepse letal. No entanto, a concentração sistêmica de TNF- α e IL-6 encontrada em animais deficientes para caspase-1 foi menor que a encontrada em animais selvagens submetidos à mesma gravidade de sepse. Estes resultados corroboram resultados anteriores de nosso laboratório, em que a redução

de níveis sistêmicos de TNF- α foi associado à redução na mortalidade de animais submetidos à sepse letal (Alves-Filho, De Freitas *et al.*, 2006).

Interessantemente, a redução na mortalidade observada nos animais deficientes para caspase-1 submetidos à sepse letal pode ser associada à prevenção da falência de migração de neutrófilos ao foco infeccioso, observada nos animais selvagens submetidos à mesma intensidade de sepse. De fato, o aumento na migração de neutrófilos ao foco infeccioso foi marcante nos animais deficientes para caspase-1 em relação aos animais selvagens submetidos à sepse letal, e pode ser comparada à migração neutrofílica em animais selvagens submetidos à sepse sub-letal, os quais não sucumbem à sepse. Estes dados corroboram observações anteriores de nosso laboratório, que são inequívocos em associar o aumento da migração de neutrófilos ao foco infeccioso à redução na mortalidade durante a sepse grave (Benjamim, Ferreira *et al.*, 2000; Alves-Filho, De Freitas *et al.*, 2006).

Como consequência do aumento da migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal, a carga bacteriana encontrada na cavidade peritoneal e na circulação de animais deficientes para caspase-1 foi consideravelmente reduzida em comparação aos animais selvagens também submetidos à sepse letal e atingiu quantidades próximas daquelas dos animais selvagens submetidos à sepse de gravidade menos intensa.

Além da quantidade de neutrófilos que migram para a cavidade peritoneal, o controle do crescimento bacteriano em animais submetidos à sepse também depende da capacidade microbicida destes neutrófilos que migraram (Soehnlein, Kenne *et al.*, 2008). Esta afirmação é também embasada em dados de nosso laboratório que indicam que o tratamento de animais selvagens com inibidor da iNOS ou utilização de animais deficientes para esta isoforma da NOS, quando

submetidos à sepse, não apresentam falência da migração de neutrófilos ao foco infeccioso. No entanto, estes animais apresentam aumento na mortalidade após a indução de sepse, pois não são capazes de matar o agente infeccioso (Benjamim, Silva *et al.*, 2002). É importante ressaltar que o restabelecimento na migração de neutrófilos nestes animais tratados ou deficientes para iNOS ocorre devido à redução na concentração de óxido nítrico, importante neste processo de falência da migração de neutrófilos ao foco infeccioso (Benjamim, Ferreira *et al.*, 2000; Rios-Santos, Alves-Filho *et al.*, 2007) (Dal Secco, Moreira *et al.*, 2006). Neste trabalho, a análise da capacidade microbicida dos neutrófilos deficientes para caspase-1 não diferiu daquela apresentada pelos neutrófilos de animais selvagens. De maneira a reforçar este resultado, a avaliação da produção de superóxido, importante para a morte bacteriana, não resultou em diferença entre os animais deficientes para caspase-1 e selvagens submetidos à sepse grave. Assim, o aumento no controle bacteriano observado no presente trabalho pode ser atribuído unicamente ao maior número de neutrófilos que migraram para a cavidade peritoneal de animais deficientes para caspase-1 em detrimento do aumento da capacidade microbicida dos neutrófilos destes animais.

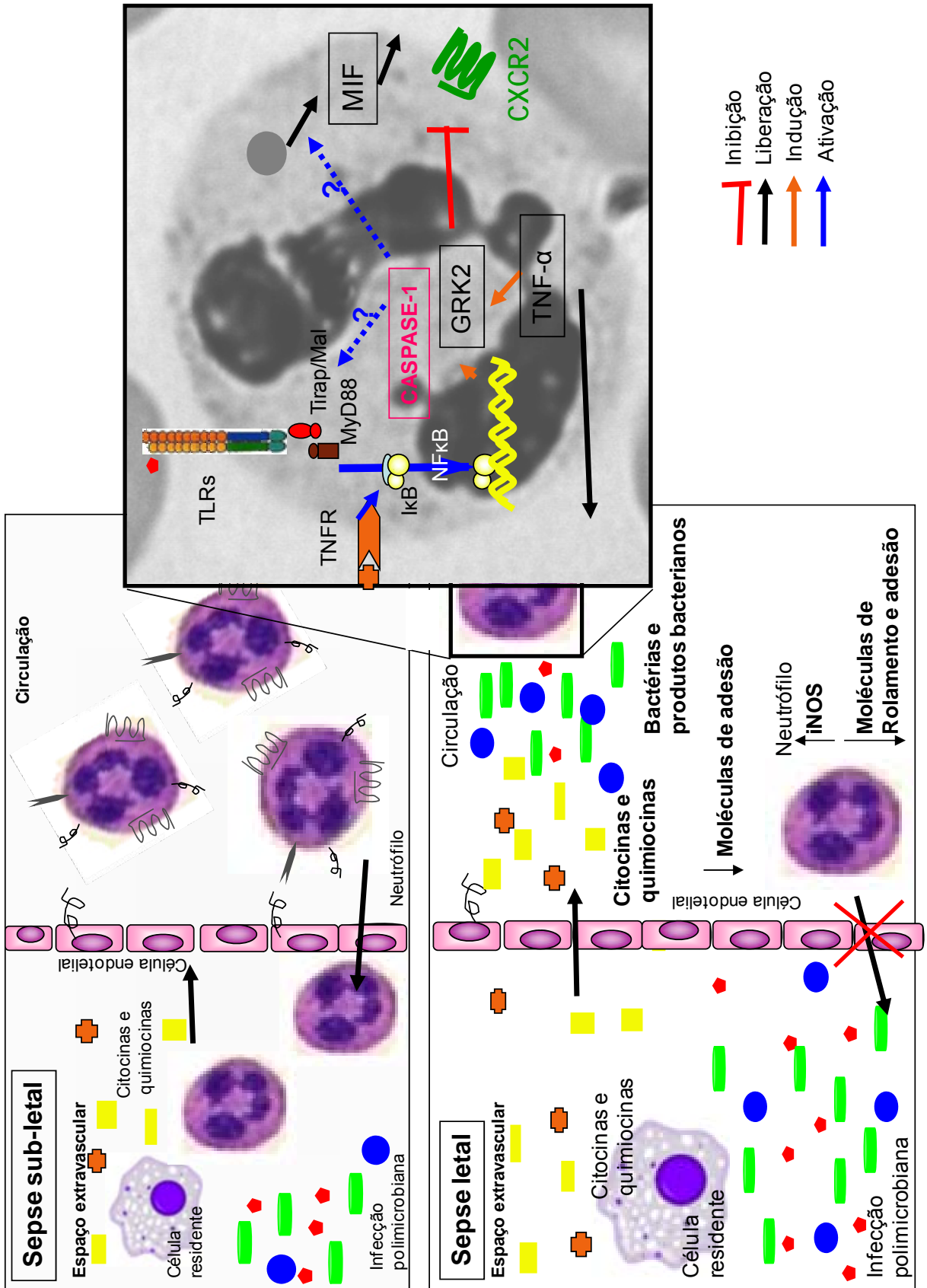
Embora a literatura vigente apresente relatos controversos sobre a participação ou não da caspase-1 na indução de apoptose (Mcintire, Yeretssian *et al.*, 2009), nossos dados são claros em demonstrar que caspase-1 não interfere na viabilidade de neutrófilos circulantes após indução de sepse letal, visto que neutrófilos circulantes isolados de animais deficientes para caspase-1 apresentaram porcentagem de células inviáveis semelhante à de neutrófilos de animais selvagens. Assim, é possível sugerir que o aumento da migração de neutrófilos ao foco infeccioso não ocorra por prevenção da perda de viabilidade dos neutrófilos

circulantes, e sim por mecanismos que favoreçam a migração dos neutrófilos durante a sepse. De fato, o número de rolamentos e de adesão de leucócitos ao endotélio foi maior em animais deficientes para caspase-1 do que em animais selvagens. Trabalhos anteriores do nosso laboratório demonstraram que animais selvagens submetidos à sepse letal apresentam número menor de leucócitos que rolam e aderem ao endotélio e que tratamentos que induzem aumento nesses parâmetros apresentam aumento na resistência à sepse letal (Benjamim, Silva *et al.*, 2002).

A análise conjunta destes dados levanta o questionamento sobre o mecanismo pelo qual a ausência da caspase-1 culmine no aumento da migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal em animais submetidos à sepse e consequentemente no aumento na resistência desta patologia. Almejando esclarecer o(s) mecanismo(s) pelo(s) qual(is) a caspase-1 possa interferir para aumentar a resistência à sepse grave, investigaremos a participação da citocina MIF, já que a secreção desta pode depender de caspase-1. Ainda, avaliaremos a possível interação entre caspase-1 e a via de sinalização dos TLRs durante a sepse grave.

5 CONCLUSÃO

Neste trabalho demonstramos que animais deficientes para caspase-1 apresentam maior resistência à sepse grave por um mecanismo associado ao aumento da migração de neutrófilos ao foco infeccioso. Isto nos permite sugerir que inibidores de caspase-1 possam ser importantes ferramentas farmacológicas para o tratamento da sepse grave.



6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alexander HR, Doherty GM, Venzon DJ, Merino MJ, Fraker DL, Norton JA. Recombinant interleukin-1 receptor antagonist (il-1ra): Effective therapy against gram-negative sepsis in rats. *Surgery* 1992;112:188-193; discussion 193-184.

Alves-Filho JC, de Freitas A, Russo M, Cunha FQ. Toll-like receptor 4 signaling leads to neutrophil migration impairment in polymicrobial sepsis. *Critical care medicine* 2006;34:461-470.

Alves-Filho JC, de Freitas A, Spiller F, Souto FO, Cunha FQ. The role of neutrophils in severe sepsis. *Shock* (Augusta, Ga 2008;30 Suppl 1:3-9.

Arend WP, Palmer G, Gabay C. Il-1, il-18, and il-33 families of cytokines. *Immunological reviews* 2008;223:20-38.

Arraes SM, Freitas MS, da Silva SV, de Paula Neto HA, Alves-Filho JC, Auxiliadora Martins M, Basile-Filho A, Tavares-Murta BM, Barja-Fidalgo C, Cunha FQ. Impaired neutrophil chemotaxis in sepsis associates with grk expression and inhibition of actin assembly and tyrosine phosphorylation. *Blood* 2006;108:2906-2913.

Benjamim CF, Ferreira SH, Cunha FQ. Role of nitric oxide in the failure of neutrophil migration in sepsis. *The Journal of infectious diseases* 2000;182:214-223.

Benjamim CF, Silva JS, Fortes ZB, Oliveira MA, Ferreira SH, Cunha FQ. Inhibition of leukocyte rolling by nitric oxide during sepsis leads to reduced migration of active microbicidal neutrophils. *Infection and immunity* 2002;70:3602-3610.

Beutler B, Rietschel ET. Innate immune sensing and its roots: The story of endotoxin. *Nat Rev Immunol* 2003;3:169-176.

Bokoch GM. Chemoattractant signaling and leukocyte activation. *Blood* 1995;86:1649-1660.

Bone RC, Grodzin CJ, Balk RA. Sepsis: A new hypothesis for pathogenesis of the disease process. *Chest* 1997;112:235-243.

Bone RC, Sibbald WJ, Sprung CL. The accp-sccm consensus conference on sepsis and organ failure. *Chest* 1992;101:1481-1483.

Bozza M, Satoskar AR, Lin G, Lu B, Humbles AA, Gerard C, David JR. Targeted disruption of migration inhibitory factor gene reveals its critical role in sepsis. *The Journal of experimental medicine* 1999;189:341-346.

Brodsky M, Yosef S, Galit R, Albeck M, Longo DL, Albeck A, Sredni B. The synthetic tellurium compound, as101, is a novel inhibitor of il-1beta converting enzyme. *J Interferon Cytokine Res* 2007;27:453-462.

Calandra T, Echtenacher B, Roy DL, Pugin J, Metz CN, Hultner L, Heumann D, Mannel D, Bucala R, Glauser MP. Protection from septic shock by neutralization of macrophage migration inhibitory factor. *Nature medicine* 2000;6:164-170.

Chowdhury I, Tharakan B, Bhat GK. Caspases - an update. *Comparative biochemistry and physiology* 2008;151:10-27.

Cummings CJ, Martin TR, Frevert CW, Quan JM, Wong VA, Mongovin SM, Hagen TR, Steinberg KP, Goodman RB. Expression and function of the chemokine receptors cxcr1 and cxcr2 in sepsis. *J Immunol* 1999;162:2341-2346.

Dal Secco D, Moreira AP, Freitas A, Silva JS, Rossi MA, Ferreira SH, Cunha FQ. Nitric oxide inhibits neutrophil migration by a mechanism dependent on icam-1: Role of soluble guanylate cyclase. *Nitric Oxide* 2006;15:77-86.

Dinarello CA. Proinflammatory and anti-inflammatory cytokines as mediators in the pathogenesis of septic shock. *Chest* 1997;112:321S-329S.

Dinarello CA. An il-1 family member requires caspase-1 processing and signals through the st2 receptor. *Immunity* 2005;23:461-462.

Dinarello CA, Fantuzzi G. Interleukin-18 and host defense against infection. *The Journal of infectious diseases* 2003;187 Suppl 2:S370-384.

Fan J, Malik AB. Toll-like receptor-4 (tlr4) signaling augments chemokine-induced neutrophil migration by modulating cell surface expression of chemokine receptors. *Nature medicine* 2003;9:315-321.

Granowitz EV, Porat R, Mier JW, Orencole SF, Callahan MV, Cannon JG, Lynch EA, Ye K, Poutsika DD, Vannier E, et al. Hematologic and immunomodulatory effects of an interleukin-1 receptor antagonist coinfusion during low-dose endotoxemia in healthy humans. *Blood* 1993;82:2985-2990.

Greten FR, Arkan MC, Bollrath J, Hsu LC, Goode J, Miething C, Goktuna SI, Neuenhahn M, Fierer J, Paxian S, et al. Nf-kappab is a negative regulator of il-1beta secretion as revealed by genetic and pharmacological inhibition of ikkbeta. *Cell* 2007;130:918-931.

Jean-Baptiste E. Cellular mechanisms in sepsis. *Journal of intensive care medicine* 2007;22:63-72.

Joshi VD, Kalvakolanu DV, Hebel JR, Hasday JD, Cross AS. Role of caspase 1 in murine antibacterial host defenses and lethal endotoxemia. *Infection and immunity* 2002;70:6896-6903.

Kalechman Y, Gafer U, Gal R, Rushkin G, Yan D, Albeck M, Sredni B. Anti-il-10 therapeutic strategy using the immunomodulator as101 in protecting mice from sepsis-induced death: Dependence on timing of immunomodulating intervention. *J Immunol* 2002;169:384-392.

Keller M, Ruegg A, Werner S, Beer HD. Active caspase-1 is a regulator of unconventional protein secretion. *Cell* 2008;132:818-831.

Khandaker MH, Mitchell G, Xu L, Andrews JD, Singh R, Leung H, Madrenas J, Ferguson SS, Feldman RD, Kelvin DJ. Metalloproteinases are involved in lipopolysaccharide- and tumor necrosis factor- α -mediated regulation of cxcr1 and cxcr2 chemokine receptor expression. *Blood* 1999;93:2173-2185.

Kuida K, Lippke JA, Ku G, Harding MW, Livingston DJ, Su MS, Flavell RA. Altered cytokine export and apoptosis in mice deficient in interleukin-1 beta converting enzyme. *Science* (New York, NY 1995;267:2000-2003.

Laudanna C, Kim JY, Constantin G, Butcher E. Rapid leukocyte integrin activation by chemokines. *Immunological reviews* 2002;186:37-46.

Lefkowitz RJ. G protein-coupled receptors. Iii. New roles for receptor kinases and beta-arrestins in receptor signaling and desensitization. *The Journal of biological chemistry* 1998;273:18677-18680.

Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S. Getting to the site of inflammation: The leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol* 2007;7:678-689.

Li P, Allen H, Banerjee S, Franklin S, Herzog L, Johnston C, McDowell J, Paskind M, Rodman L, Salfeld J, et al. Mice deficient in il-1 beta-converting enzyme are defective in production of mature il-1 beta and resistant to endotoxic shock. *Cell* 1995;80:401-411.

Mannel DN. Advances in sepsis research derived from animal models. *Int J Med Microbiol* 2007;297:393-400.

McIntire CR, Yeretssian G, Saleh M. Inflammasomes in infection and inflammation. *Apoptosis* 2009.

Miggin SM, Palsson-McDermott E, Dunne A, Jefferies C, Pinteaux E, Banahan K, Murphy C, Moynagh P, Yamamoto M, Akira S, et al. Nf-kappab activation by the toll-il-1 receptor domain protein myd88 adapter-like is regulated by caspase-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2007;104:3372-3377.

Moser B. Chemokines: Role in immune cell traffic. *European cytokine network* 2003;14:204-210.

Moreno SE, Alves-Filho JC, Alfaya TM, da Silva JS, Ferreira SH, Liew FY. Il-12, but not il-18, is critical to neutrophil activation and resistance to polymicrobial sepsis induced by cecal ligation and puncture. *J Immunol* 2006;177:3218-3224.

Mudter J, Neurath MF. Il-6 signaling in inflammatory bowel disease: Pathophysiological role and clinical relevance. *Inflammatory bowel diseases* 2007;13:1016-1023.

Opal SM, Fisher CJ, Jr., Dhainaut JF, Vincent JL, Brase R, Lowry SF, Sadoff JC, Slotman GJ, Levy H, Balk RA, et al. Confirmatory interleukin-1 receptor antagonist trial in severe sepsis: A phase iii, randomized, double-blind, placebo-controlled,

multicenter trial. The interleukin-1 receptor antagonist sepsis investigator group. *Critical care medicine* 1997;25:1115-1124.

Pierce KL, Premont RT, Lefkowitz RJ. Seven-transmembrane receptors. *Nature reviews* 2002;3:639-650.

Raupach B, Peuschel SK, Monack DM, Zychlinsky A. Caspase-1-mediated activation of interleukin-1beta (il-1beta) and il-18 contributes to innate immune defenses against salmonella enterica serovar typhimurium infection. *Infection and immunity* 2006;74:4922-4926.

Rios-Santos F, Alves-Filho JC, Souto FO, Spiller F, Freitas A, Lotufo CM, Soares MB, Dos Santos RR, Teixeira MM, Cunha FQ. Down-regulation of cxcr2 on neutrophils in severe sepsis is mediated by inducible nitric oxide synthase-derived nitric oxide. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2007;175:490-497.

Robertson CM, Perrone EE, McConnell KW, Dunne WM, Boody B, Brahmabhatt T, Diacovo MJ, Van Rooijen N, Hogue LA, Cannon CL, et al. Neutrophil depletion causes a fatal defect in murine pulmonary staphylococcus aureus clearance. *The Journal of surgical research* 2008;150:278-285.

Sarkar A, Hall MW, Exline M, Hart J, Knatz N, Gatson NT, Wewers MD. Caspase-1 regulates escherichia coli sepsis and splenic b cell apoptosis independently of interleukin-1beta and interleukin-18. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2006;174:1003-1010.

Shimaoka M, Park EJ. Advances in understanding sepsis. *European journal of anaesthesiology* 2008;42:146-153.

Silva E, Pedro Mde A, Sogayar AC, Mohovic T, Silva CL, Janiszewski M, Cal RG, de Sousa EF, Abe TP, de Andrade J, et al. Brazilian sepsis epidemiological study (bases study). *Critical care* (London, England); 2004. p. R251-260.

Soehnlein O, Kenne E, Rotzius P, Eriksson EE, Lindbom L. Neutrophil secretion products regulate anti-bacterial activity in monocytes and macrophages. *Clinical and experimental immunology* 2008;151:139-145.

Tavares-Murta BM, Zaparoli M, Ferreira RB, Silva-Vergara ML, Oliveira CH, Murta EF, Ferreira SH, Cunha FQ. Failure of neutrophil chemotactic function in septic patients. *Critical care medicine* 2002;30:1056-1061.

Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled annexin v. *Journal of immunological methods* 1995;184:39-51.

Vincent JL, Sakr Y, Sprung CL, Ranieri VM, Reinhart K, Gerlach H, Moreno R, Carlet J, Le Gall JR, Payen D. Sepsis in european intensive care units: Results of the soap study. *Critical care medicine* 2006;34:344-353.

Vincent JL, Slotman G, Van Leeuwen PA, Shelly M, Nasraway S, Tenailon A, Bander J, Friedman G. Il-1ra administration does not improve cardiac function in patients with severe sepsis. *Journal of critical care* 1999;14:69-72.

Viola A, Luster AD. Chemokines and their receptors: Drug targets in immunity and inflammation. *Annual review of pharmacology and toxicology* 2008;48:171-197.

West AP, Koblansky AA, Ghosh S. Recognition and signaling by toll-like receptors. *Annual review of cell and developmental biology* 2006;22:409-437.

Zarbock A, Ley K. Mechanisms and consequences of neutrophil interaction with the endothelium. *The American journal of pathology* 2008;172:1-7.

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](#)