UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
CENTRO BIOMÉDICO
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

INDUÇÃO DE POTENCIAL PROCOAGULANTE EM CÉLULAS ENDOTELIAIS HUMANAS PELA TOXINA ExoU DE *Pseudomonas aeruginosa*

Carla Freitas

Rio de Janeiro

2009

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

Indução de Potencial Procoagulante em Células Endoteliais Humanas pela Toxina ExoU de *Pseudomonas aeruginosa*

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade do Estado do Rio de Janeiro visando à obtenção do grau de Mestre em Microbiologia Médica Humana

Orientadora: Profª Drª Maria Cristina Maciel Plotkowski

Rio de Janeiro
2009

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

F866 Freitas, Carla.

Indução de potencial procoagulante em células endoteliais humanas pela toxina ExoU de *Pseudomonas aeruginosa* / Carla Freitas. - 2009.
xi, 53f. il.

Orientadores: Maria Cristina Maciel Plotkowski.

Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas. Pós Graduação em Microbiologia Médica Humana.

Bibliografia: f. 46-53

1. *Pseudomonas aeruginosa* - Teses. 2. Toxinas bacterianas -Teses. 3. Von Willebrand, Fator de - Teses. 4. Sangue - Coagulação - Teses. 5. Endotélio - Teses. I. Plotkowski, Maria Cristina Maciel. II.Universidade do Estado do Rio de Janeiro.Faculdade de Ciências Médicas. III.Título.

CDU 576.8

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese.

_____ _____

Assinatura Data

CARLA FREITAS

Indução de potencial procoagulante em células endoteliais humanas pela toxina ExoU de *Pseudomonas aeruginosa*

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade do Estado do Rio de Janeiro visando a obtenção do grau de Mestre em Microbiologia Médica Humana

Banca Examinadora:

_____

Profª. Drª. Maria Cristina Maciel Plotkowski (Orientador)
Faculdade de Ciência Médicas da UERJ

_____

Profª. Drª. Patrícia Torres Bozza
Departamento de Fisiologia e Farmacodinâmica da FioCruz

_____

Profª. Drª. Verônica Maria Morandi da Silva
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da UERJ

_____

Profª. Drª. Lucimar Gonçalves Milagres (Presidente)
Faculdade de Ciência Médicas da UERJ

_____

Profª. Drª. Ana Cláudia de Paula Rosa (Suplente)
Faculdade de Ciência Médicas da UERJ

Rio de Janeiro
2009

AGRADECIMENTOS

Como não poderia deixar de ser, primeiramente agradeço a Deus. Agradeço pela vida, saúde, força de vontade e tudo mais que Ele me dá. Agradeço por ter permitido que eu chegasse até aqui e por ter estado comigo nos bons e maus momentos.

Logicamente, em seguida, agradeço à minha família, principalmente minha mãe, Carminha, por todo o apoio que sempre me deu, por suportar meus dias de mau-humor, por cuidar de mim e por tudo mais.

Pessoa que esteve presente integralmente nesses dois anos de mestrado, meu namorado, Igor. Foi responsável por boa parte dos meus momentos de alegria e distração que me faziam esquecer as dificuldades do mestrado e do dia-a-dia. Sem sua paciência e seu infinito carinho o caminho teria sido bem mais difícil.

Minha fantástica orientadora, Cristina, que teve muita paciência, entendeu e me ajudou a resolver os problemas com experimentos. Ser sua aluna é uma honra que muitos queriam ter. Orientadora de mestrado e de vida. Não tenho muitas palavras para dizer o quanto sou grata e aprendi com você desde quando comecei no laboratório, na iniciação científica.

Aos meus amigos, que suportaram e entenderam minha ausência nesses dois anos.

À Cristina Assis pela amizade e pelo apoio intelectual e experimental.

Aos companheiros do laboratório 4 e do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia que, entre um experimento e outro, dividem a dificuldade de se fazer ciência no Brasil, principalmente na UERJ.

Agradeço ao apoio dado por pessoas que ajudaram na realização e no ensino de algumas técnicas utilizadas neste trabalho: Marcelo e Graziela da UFRJ pelos valiosos ensinos em relação à microscopia confocal; técnicos e biólogos do departamento de Bioquímica da UERJ, principalmente Beto, Gustavo, Cristina; ao pessoal do laboratório da profª Verônica Morandi, principalmente ela própria, Camila Figueiredo e Francisco Vardiero; e, na casa, agradeço à Alessandra Saliba pelas aulas de biologia molecular e aos técnicos e biólogos do departamento de Microbiologia, principalmente Angélica Pereira, Márcia Jones, Denilson Ferreira, Raquel Borges e Wagner Oliveira.

E por falar em UERJ, agradeço muito a ela. Sinto orgulho de ser formada nesta universidade, que luta para manter ensino e pesquisa de qualidade apesar das dificuldades e problemas. Afinal de contas, foi aqui que iniciei minha caminhada rumo ao mundo científico.

Por fim, agradeço ao CNPq pelo apoio financeiro.

A todos vocês, MUITO OBRIGADA!!

LISTA DE ABREVIATURAS

AA: ácido araquidônico

ADAMTS13: a desintegrin-like and metalloprotease with thrombospondin type 1 motifs

ADP: adenosina difosfato

AIDS: síndrome da imunodeficiência adquirida

AMPc: adenosina monofosfato cíclica

APC : proteína C ativa

ATP: adesosina trifosfato

BSA: soro albumina bovina

CD: cluster of differentiation

CFU: unidade formadora de colônia

DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole

cDNA: ácido desoxirribonucléico complementar

EDTA: ácido etileno diamino tetraacético dissódico

EGF: fator de crescimento epidérmico

ELISA: enzyme linked immuno sorbent assay

EPCR : receptor de proteína C endotelial

FACS: fluorescence activated cell sorter

FITC: isothiocyanate form

FT: fator tissular

FvW: fator de von Willebrand

GMP: guanosina monofosfato cíclica

GP: glicoproteína

asHFT: alternatively spliced human tissue factor

HIV: vírus da imunodeficiência humana

HMEC-1: célula endotelial de microcapilar humano

HMWK: cininogênio de alto peso molecular

HUVEC: célula endotelial de veia de cordão umbilical humano

ICAM-1: molécula de adesão intercelular

Ig: imunoglobulina

IL: interleucina

LB: Luria broth

LPS: lipopolissacarídeo

MCDB-131: medium complete with traces elements

MEC: matriz extracelular

MHC: complexo de histocompatibilidade principal

MP: micropartícula

mRNA: RNA mensageiro

NF-κB: fator nuclear kappa B

NO: óxido nítrico

eNOS: óxido nítrico sintase endotelial

dNTP: mistura de deoxinucleotídeos trifosfato

OPD: orto-fenilenodiamina

PAF: fator de ativação plaquetária

PBS: tampão salina-fosfato

PCR: reação em cadeia da polimerase

PECAM-1: molécula de adesão a célula endotelial de plaquetas

PGE_2: prostaglandina E_2

PGI_2: prostaglandina I_2

$cPLA_2$: fosfolipase A_2 citosólica

$iPLA_2$: fosfolipase A_2 independente de cálcio

PLC: fosfolipase C

PSGL-1: glicoproteína ligante de P-selectina

RNA: ácido ribonucléico

RT-PCR: reação em cadeia da polimerase por transcriptase reversa

SFB: soro fetal bovino

SSTT: sistema de secreção do tipo III

TFPI: inibidor da via do fator tissular

TNFα: fator de necrose tumoral α

TLR: receptor toll-like

TXA_2: tromboxano A_2

TXB_2: tromboxano B_2

VCAM-1: molécula de adesão celular vascular

VEGF: fator de crescimento epitelial vascular

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Mecanismos envolvidos na patogênese da sepse..... 6
Figura 2: Sepse e coagulação..... 7
Figura 3: Endotélio na sepse 8
Figura 4: Cascata de coagulação..... 9
Figura 5: Adesão de plaquetas à matriz subendotelial..... 10
Figura 6: Estrutura do fator de von Willebrand..... 11
Figura 7: Tabela ilustrando os principais ativadores e inibidores da exocitose de FvW..... 13
Figura 8: Mecanismos envolvidos na interação plaquetas-FvW..... 14
Figura 9: Fotomicrografia mostrando o brotamento de MPs (setas) em células endoteliais de veias de cordão umbilical humano estimuladas..... 17
Figura 10: Estrutura e composição das micropartículas..... 17
Figura 11: Liberação de micropartículas..... 18
Figura 12: Expressão do mRNA de fator tissular em células endoteliais controle não infectadas e infectadas pelas cepas PA103 e PA103Δ*exoU*, avaliado por RT-PCR..... 30
Figura 13: Expressão superficial ou total de FT em células endoteliais controle ou infectadas por PA103 e PA103Δ*exoU*, detectada através de citometria de fluxo..... 31/32
Figura 14: Expressão de FvW em células endoteliais em células endoteliais não-infectadas ou infectadas, detectada através de citometria de fluxo..... 33
Figura 15: Fotomicrografias obtidas com microscópio confocal, mostrando a expressão do FvW na superfície de células infectadas ou não..... 34
Figura 16: Expressão do mRNA de fator de von Willebrand em células endoteliais controle não infectadas e infectadas pelas cepas PA103 e PA103Δ*exoU*, detectados por RT-PCR..... 35
Figura 17: Níveis de FvW detectados nos sobrenadantes de culturas celulares infectadas por PA103 ou PA103Δ*exoU*..... 36
Figura 18: Níveis de FvW presente na matriz extracelular de células infectadas ou não infectadas..... 36
Figura 19: Percentual de células endoteliais com plaquetas aderentes após incubação

dos dois tipos celulares sob condições estáticas ou após perfusão das plaquetas sobre as células endoteliais..... 37
Figura 20: Fotomicrografias obtidas em microscópio óptico mostrando a presença de plaquetas aderentes às células endoteliais..... 37
Figura 21: Liberação de micropartículas por células endoteliais, detectados através de citometria de fluxo..... 38/39

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS..... v
LISTA DE ILUSTRAÇÕES..... vii
RESUMO..... x
ABSTRACT..... xi
INTRODUÇÃO..... 1
OBJETIVOS..... 21
MATERIAL E MÉTODOS..... 22
RESULTADOS..... 29
DISCUSSÃO..... 39
CONCLUSÕES..... 45
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 46

RESUMO

Devido à presença de domínios análogos aos sítios catalíticos de enzimas da família das fosfolipases A_2, a toxina ExoU produzida por *P. aeruginosa* possui importante atividade pró-inflamatória. Cepas de *P. aeruginosa* produtoras de ExoU são agentes de infecções graves, incluindo a sepse, em que, com freqüência, estão presentes distúrbios coagulatórios. Conhecendo a estreita correlação entre inflamação e a ativação da coagulação, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de ExoU na modulação da expressão, em células endoteliais, de duas moléculas implicadas na coagulação: os fatores tissular (FT), iniciador da via extrínseca da coagulação, e de von Willebrand (FvW), implicado na agregação plaquetária. Células endoteliais de microcapilares humanos da linhagem HMEC-1 foram infectadas com as cepas de *P. aeruginosa* PA103, produtora de ExoU, e sua mutante obtida por deleção do gene *exoU*. A infecção por PA103 resultou no aumento da transcrição gênica do FT, mas não teve efeito sobre a expressão da proteína FT. Quanto ao FvW, a infecção pelas duas cepas não alterou sua transcrição gênica, mas as duas aumentaram a expressão da proteína nas células infectadas. FvW é exocitado para o meio extracelular e, *in vivo*, é encontrado no plasma e na matriz extracelular (MEC) subendotelial de vasos sanguíneos lesados. Resultados preliminares sugerem que ExoU module positivamente a liberação do FvW para o meio extracelular porque suas concentrações, tanto no sobrenadante de HMEC-1 quanto em sua MEC, foram superiores às detectadas em culturas infectadas com a cepa mutante, embora as diferenças não tenham sido significativas. Culturas infectadas com a cepa PA103 e expostas a suspensões de plaquetas, sob condições estáticas e de fluxo, apresentaram um percentual de células com plaquetas aderentes significativamente superior ao detectado nos outros dois tipos de cultura, sugerindo que FvW expresso em HMEC-1 é capaz de garantir a adesão plaquetária. Células endoteliais ativadas ou em apoptose liberaram micropartículas (MPs) contendo em sua superfície componentes da membrana das células de que originaram e dotadas de potencial procoagulante. No sobrenadante de culturas infectadas pela cepa PA103 foi observado um aumento significativo no número de MPs totais liberadas, bem como no percentual de MPs com FT ou FvW em suas membranas. Pelo exposto, concluímos que *P. aeruginosa* e, em alguns eventos, ExoU, são capazes de interferir no caráter anticoagulante de células endoteliais de microvasos da linhagem HMEC-1.

Palavras-Chaves: *Pseudomonas aeruginosa*, ExoU, fator de von Willebrand, fator tissular, potencial procoagulante.

ABSTRACT

ExoU is a *P. aeruginosa* toxin with two blocks of homology with the catalytic domains of phospholipase A2 enzymes and with marked proinflammatory activity. ExoU-producing bacterial strains are associated with severe *P. aeruginosa* infections, including sepsis. Since disorders of coagulation are frequently observed during the course of sepsis, and inflammation and activation of the coagulation cascade are closely related to each other, the aim of this study was to evaluate the ability of ExoU to modulate the expression, by human endothelial cells, of two major proteins implicated in blood coagulation - tissue factor (TF) and von Willebrand factor (vWF), therefore modifying the endothelial cell antithrombogenic property. Cells from the HMEC-1 line were infected with the ExoU-producing PA103 strain or with an *exoU*-deficient mutant. PA103-infected cells exhibited increased levels of TF mRNA but neither PA103 nor its mutant modulated TF expression in infected cells. In contrast, both bacterial strain modulated positively the expression of vWF, but no change in vWF mRNA level could be detected. Since, i*n vivo,* vWF is also present in plasma and associated with the subendothelial extracellular matriz (ECM) from damaged blood vessels, we next investigated the effect of ExoU on vWF release into extracellular environment. Preliminary results showed increased concentrations of vWF in both supernatant and ECM from PA103-infected cultures. To ascertain whether vWF expressed by HMEC-1 would support platelet adherence, cultures infected with both bacteria were incubated with platelet suspensions under static and flow conditions. PA103-infected cultures exhibited increased percentages of cells with adherent platelet suggesting that ExoU-induced modulation of cell-associated vWF is implicated in platelet adhesion. Microparticles (MPs) are cell vesicles released from apoptotic and activated cells that express, on their membranes, proteins testifying the cell from which they were released. MPs are also endowed with procoagulant properties. Increased numbers of MPs were detected in the supernatant of PA103-infected HMEC-1 cultures, as well as increased percentages of MPs expressing TF or vWF on their membranes. Our findings demonstrate that ExoU may modify the antithrombogenic character of microvascular endothelial cells from the HMEC-1 line. Based on these results we speculate that this procoagulant activity of ExoU may contribute to the reported poor outcome of patients with severe infection by ExoU-producing *P. aeruginosa.*

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, ExoU, von Willebrand factor, tissue factor, procoagulant activity

INTRODUÇÃO

1. *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa é um bacilo gram-negativo, aeróbio, móvel, não fermentador, distribuído amplamente na natureza, que pode colonizar e infectar superfícies mucosas humanas. Em indíviduos imunocompetentes não chega a causar doenças pois é rapidamente combatido pelo sistema imunológico. É conhecido como patógeno oportunista por infectar indivíduos imunocomprometidos e causar-lhes sérios distúrbios, não raramente levando o paciente ao óbito.

P. aeruginosa é responsável por cerca de 10% das infecções nosocomiais em todo o mundo. Na América Latina, em estudo realizado em 2005, ocupou a primeira posição como agente causador de pneumonia, segunda em infecções de feridas, terceira em infecções urinárias e quarta em bacteremia (Nouér *et al.,* 2005). No Brasil, foi identificado como o principal agente etiológico de pneumonias nosocomiais (Gales *et al.,* 2003).

Uma característica relevante que contribui para a importância de *P. aeruginosa* como patógeno humano é sua resistência intrínseca a diversos antibióticos (Enouch *et al.,* 2007). Os mecanismos de resistência incluem: baixa permeabilidade da membrana, a presença de bombas de efluxo de drogas (tetraciclina, imipenem, fluoroquinolonas, aminoglicosídios) e a produção de enzimas modificadoras de antibióticos (aminoglicosídeos, β-lactamases). A resistência a antimicrobianos é maior em cepas prevalentes em ambiente hospitalar, local onde é mais provável a aquisição de infecção por este microrganismo.

Além desta sua conhecida e problemática resistência a antibióticos, diversos fatores de virulência desta bactéria contribuem para a patogênese das infecções. Podemos citar, entre estes, os fatores associados à estrutura bacteriana, como pili e outras adesinas, flagelo, lipopolissacarídeo e peptidoglicano da parede celular bacteriana, e fatores secretados para o meio extracelular, como proteases, hemolisinas e exotoxinas. A maior parte dos determinantes de virulência são secretados no ambiente ao redor das células bacterianas via sistemas de secreção tipo I ou II mas *P. aeruginosa,* após um contato íntimo com células eucarióticas, pode também lançar toxinas diretamente em seu citoplasma via sistema de secreção do tipo III (SSTT).

2. Sistema de secreção do tipo III e ExoU

O sistema de secreção do tipo III em *P. aeruginosa* depende da expressão de 3 grupos de produtos de genes distintos que codificam componentes do aparato secretório (ExsD, PscB-L e PscN-U), proteínas que medeiam a translocação das proteínas efetoras para o citoplasma da célula hospedeira (PcrV, PopB e PopD) e as proteínas efetoras (ExoS, ExoT, ExoY e ExoU) (Yahr *et al.*, 1998).

Dentre as proteínas efetoras, as duas primeiras são toxinas bifuncionais com atividade de ADP-ribosiltrasferase, em suas porções carboxiterminais, e de proteína ativadora de RhoGTPase, em suas porções aminoterminais. Atuam sobre pequenas proteínas G da célula hospedeira, alterando o citoesqueleto e vias de sinalização intracelular. ExoY é uma adenilato ciclase e ExoU, alvo de nosso estudo, tem atividade similar à de enzimas da família das fosfolipases A_2 (PLA_2). A expressão de todos os produtos gênicos do SSTT está sob controle do gene regulador transcricional central *exsA*, que responde a baixas concentrações de cálcio e sinais de contato celular.

A importância do sistema de secreção do tipo III como mecanismo de virulência em *P. aeruginosa* foi demonstrada em estudos *in vivo,* em modelos experimentais de pneumonia aguda e de infecção de córnea, em que a expressão do regulador transcricional *exsA* foi diretamente associada à gravidade dos processos infecciosos (Lee *et al*., 2003).

Quanto à presença do gene e à freqüência da expressão das quatro proteínas efetoras do SSTT por isolados clínicos de *P. aeruginosa,* em dois estudos utilizando coleções destes microrganismos, foi observado que 100% dos isolados apresentavam *exoT* e que 89% apresentavam *exoY.* Os percentuais de isolados que codificavam *exoS* variaram de 66 a 72% enquanto os que codificavam *exoU* variaram de 28 a 34% (Feltman *et al*., 2001; Schulert *et al*., 2003). É importante salientar que a presença dos genes não quer dizer que as proteínas serão, necessariamente, expressas: estudos com amostras isoladas de secreções respiratórias de pacientes com pneumonia mostraram que 77% das cepas secretaram alguma das toxinas do SSTT, apesar de 100% terem os genes que as codificam. Dos isolados que foram capazes de secretar, *in vitro*, estas proteínas, 37% produziram quantidades detectáveis de ExoU, 59% secretaram ExoS, 96% secretaram ExoT e 78% secretaram ExoY (Hauser *et al*., 2002).

Embora a produção de ExoU seja menos frequente que a das demais proteínas efetoras do SSTT, esta toxina tem sido relacionada a isolados clínicos procedentes de pacientes com quadros infecciosos graves, como sepse e pneumonia secundária ao uso de ventiladores mecânicos (Berthelot *et al.,* 2003; Schulert *et al.,* 2003).

ExoU é constituída por 687 aminoácidos, com massa molecular de aproximadamente 74kDa, e apresenta dois blocos funcionais homólogos a sítios catalíticos das enzimas fosfolipase A_2 independente de cálcio ($iPLA_2$) e citossólica dependente de cálcio ($cPLA_2$). Assim, ExoU desempenha atividade de acil hidrolase sobre uma larga gama de substratos, incluindo lipídios neutros e fosfolipídios abundantes na membrana plasmática de células eucarióticas.

As enzimas da família das PLA_2 hidrolisam a ligação éster *sn*-2 de fosfolipídios e liberam ácidos graxos livres, como ácido araquidônico, e lisofosfolipídios. Tem, também, um importante papel na regulação do metabolismo de lipídios, remodelamento de fosfolipídios, lise da membrana plasmática e transdução de sinais. Além disso, as $cPLA_2$ tem sido associadas a fenômenos intracelulares, como a formação de túbulos do complexo de Golgi e de endossomos e fusão de membranas em vias secretórias e endocíticas (Brown *et al*., 2003).

Quanto à citotoxicidade de ExoU, Allewelt *et al*. (2000) demonstraram que a aquisição do gene *exoU* por cepas de *P. aeruginosa* que não o possuiam conferiu-lhes um caráter citotóxico e aumentou a virulência bacteriana em um modelo de pneumonia aguda em camundongos, favorecendo, também, a disseminação sistêmica dos microrganismos a partir do foco primário de infecção. Em outro estudo utilizando o modelo de pneumonia aguda em murinos, Shaver e Hauser (2004) mostraram que cepas de *P. aeruginosa* que secretam ExoU foram responsáveis por elevados índices de mortalidade, persistência bacteriana no parênquima pulmonar dos animais e disseminação dos microrganismos, enquanto a produção de ExoS teve um efeito intermediário e a de ExoT, um efeito inferior.

Também em estudos *in vitro,* com cultura de células epiteliais brônquicas e macrófagos, a secreção de ExoU foi associada com importante atividade citolítica e capacidade de indução de morte celular por apoptose. Os resultados dos estudos *in vitro* e *in vivo* sugerem que a secreção de ExoU possa ser um marcador capaz de identificar cepas de *P. aeruginosa* altamente virulentas (Schulert *et al*., 2003).

Em 2003, Sato *et al.* e Phillips *et al.* mostraram que a citotoxicidade aguda de ExoU decorre de sua atividade lipásica que interfere na integridade das membranas plasmáticas. Trabalhos realizados em nosso laboratório mostraram que a atividade PLA_2 de ExoU confere, também à toxina importante atividade proinflamatória, decorrente da liberação de ácido araquidônico e produção de eicosanóides por células endoteliais humanas (Saliba *et al*., 2005). Mostraram, também, as implicações do estresse oxidativo de células endoteliais, decorrente da presença de ácido araquidônico livre, na citotoxicidade mediada por ExoU (Saliba *et al*., 2006).

Os trabalhos sobre os efeitos de ExoU sobre células endoteliais humanas são uma vertente adicional dos estudos que vem sendo realizados em nosso laboratório, desde 1994, para esclarecer o papel do endotélio vascular como alvo bacteriano no curso de infecções disseminadas por *P. aeruginosa* (Plotkowski *et al.,* 1994; Plotkowski e Meirelles, 1997; Assis *et al.,* 2000; Valente *et al.,* 2000; Saliba *et al.*, 2002; Assis *et al.* 2004 e 2006). Mais recentemente, foi pesquisada, também, a contribuição da toxina ExoU na patogênese da pneumosepse em modelo experimental murino (Machado, 2007). À semelhança de outros estudos (Kurahashi *et al.,* 1999; Shaver e Hauser, 2004), também em nosso laboratório foi mostrada a contribuição de ExoU na gravidade da sepse experimental. No entanto, embora seja conhecida a importância tanto da lesão quanto da ativação de células endoteliais no desencadeamento e evolução clínica da sepse, nos estudos de Machado (2007) não foram pesquisados os efeitos diretos de ExoU sobre as células endoteliais.

3. Células endoteliais e sua participação nos distúrbios da coagulação na sepse

O corpo humano contém cerca de 10^{13} células endoteliais, que se colocadas juntas pesariam cerca de 1kg e cobririam uma superficie de cerca de 1-7 m^2. Estas células compõem o endotélio vascular que está estratégicamente localizado na interface entre os tecidos e o sangue e tem fundamental importância como formadoras de barreiras para conter o fluxo sanguíneo e na manutenção da fluidez do sangue. Exercem, também, importantes funções fisiológicas que incluem, entre outros, o controle do tráfego celular e de nutrientes através do endotélio, a regulação do tônus vasomotor, o controle da hemostasia e a formação de novos vasos sanguíneos (Aird, 2003b). No entanto, células procedentes de vasos sanguíneos da macro e microcirculação diferem quanto ao exercício destas funções (Aird, 2003a).

Também de uma perspectiva estrutural, células endoteliais de vasos e órgãos distintos diferem entre si em tamanho, formato, espessura e orientação nuclear. Tem havido um crescente interesse quanto à importância do ambiente local na determinação do fenótipo das células endoteliais, sua heterogeneidade e atividade funcional. A interação entre o meio ambiente e as células pode envolver mediadores solúveis (incluindo citocinas inflamatórias, quimiocinas, fatores de crescimento, endotoxinas etc), diferentes níveis de oxigenação e das forças hemodinâmicas, comunicação célula-célula, síntese e organização das proteínas da matriz extracelular. Esses fatores ambientais, associados a fatores genéticos, exercem efeito modulador da expressão gênica pelas células endoteliais, resultando na heterogeneidade do endotélio (Aird, 2003a). Essa heterogeneidade existe mesmo dentro de diferentes segmentos

de um mesmo órgão. No pulmão, por exemplo, a proteína inibidora da via do fator tissular (TFPI) é expressa predominantemente em células de microvasos, enquanto a enzima óxido nítrico sintase é expressa, predominantemente, em células de artérias (Aird, 2001).

As células endoteliais são altamente ativas, sentindo e respondendo a alterações no ambiente extracelular. Em outras palavras, a ativação de células endoteliais ocorre como uma resposta adaptativa normal, com natureza e duração dependente não somente do estímulo, mas também do local onde ocorreu o estímulo. Essa ativação as leva a desempenhar papéis importantes em processos inflamatórios e infecciosos, na angiogênese e coagulação, entre outros, em decorrência da exibição de propriedades diferentes daquelas exibidas por células em repouso. Basicamente, existem dois tipos de resposta à ativação celular: tipo I (rápida), que ocorre independentemente de nova expressão gênica, e tipo II (lenta), que envolve nova expressão gênica. Histamina é um exemplo de agonista da ativação tipo I enquanto o fator de necrose tumoral alfa (TNFα) e interleucina-1 (IL-1) são os principais mediadores resultantes da ativação de célula endoteliais tipo II (Pober & Sessa., 2007).

Sob condições normais, o endotélio tem importante função inibitória da ativação da cascata de coagulação, decorrente da expressão de moléculas de superfície com propriedades anticoagulantes. Além disso, secreta prostaciclina e óxido nítrico, potentes inibidores da ativação de plaquetas e monócitos e agentes vasodilatadores.Os mais importantes mecanismos endoteliais de inibição da coagulação são a produção de antitrombina, do inibidor da via do fator tissular (TFPI) e a via da proteína C (Schouten *et al*., 2008).

Ao contrário da natureza antitrombótica do endotélio em repouso, células endoteliais ativadas, no curso da sepse, podem apresentar atividade trombogênica, decorrente da diminuição dos mecanismos acima mencionados mas também da maior expressão de moléculas protrombóticas, como os fatores tissular (FT) e de von Willebrand (FvW), como será mostrado adiante.

Sepse é a denominação dada à síndrome caracterizada pela presença de processo infeccioso e de intensa resposta inflamatória sistêmica na qual as manifestações clínicas dependem mais da reatividade exacerbada do organismo hospedeiro que da natureza do patógeno, embora estes sejam capazes de modular a intensidade da resposta inflamatória (figura 1).

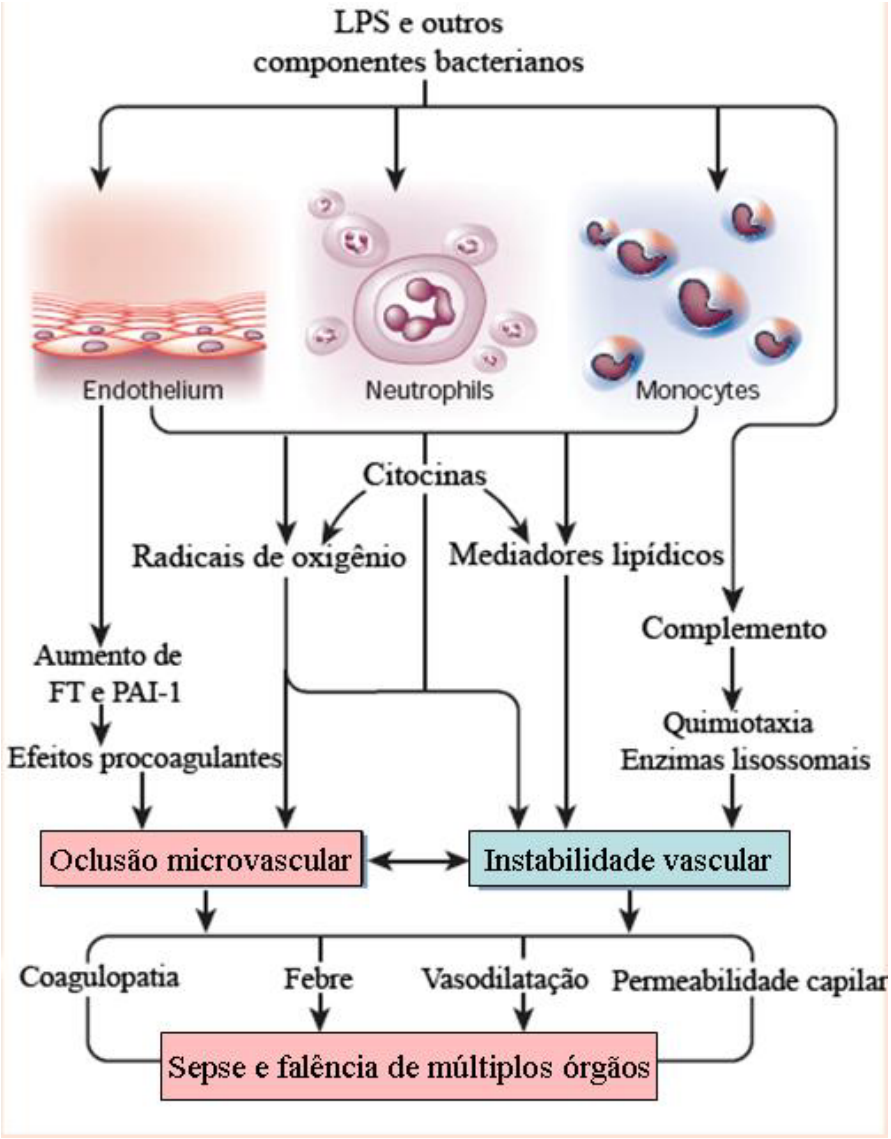


Figura 1: Mecanismos envolvidos na patogênese da sepse. LPS e outros componentes microbianos ativam simultaneamente múltiplas cascatas paralelas que contribuem para a patofisiologia da sepse. A combinação de baixa contratilidade do miocárdio, tônus vascular periférico prejudicado e oclusão microvascular leva à hipoperfusão nos tecidos e inadequada oxigenação e, assim, falência dos órgãos (Cohen, 2002).

Virtualmente, todos os pacientes com sepse tem algum distúrbio trombótico (figura 2), que pode variar de discreto prolongamento no tempo de coagulação até um quadro grave conhecido como coagulação intravascular disseminada (Aird, 2003b). Isso porque citocinas e outros mediadores proinflamatórios são capazes de ativar a cascata da coagulação. Por sua vez, produtos da ativação desta cascata, como a trombina, tem atividade proinflamatória (Schouten *et al*., 2008). Além disso, na sepse observa-se uma disfunção de mecanismos anticoagulantes e da via fibrinolítica dos pacientes. Finalmente, a ativação de diferentes tipos celulares, como as endoteliais, leucócitos e plaquetas, resulta na liberação de micropartículas procoagulantes, como será detalhado posteriormente.

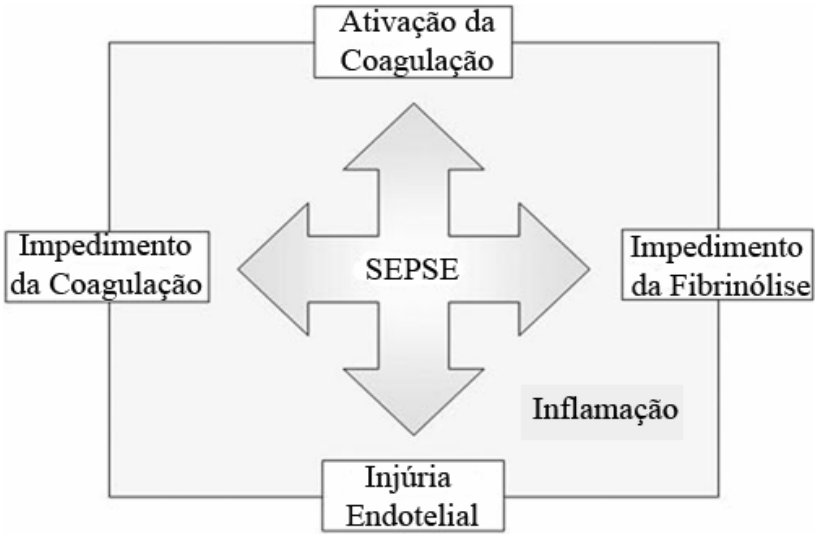


Figura 2: Sepse e coagulação. Existe uma forte ligação entre coagulação e inflamação durante a sepse, caracterizada pela ativação da coagulação induzida pela inflamação com concomitante disfunção dos sistemas anticoagulantes, fibrinólise e das funções endoteliais. Além disso, durante a sepse, mediadores da coagulação que são ativados pela resposta inflamatória contribuem para amplificar a inflamação (Schouten *et al*., 2008).

A modulação do fenótipo do endotélio de anti-coagulante para procoagulante, no curso da sepse, pode decorrer de vários mecanismos diferentes. Em alguns casos, os patógenos podem infectar diretamente as células endoteliais. Mais comumente, componentes da parede bacteriana ativam receptores de reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (exemplos são os receptores da família *toll-like receptors*, os TLRs) expressos na superfície do endotélio. Finalmente, vários fatores derivados do hospedeiro, como componentes do sistema complemento, citocinas, quimiocinas, serino-proteases, fibrina, plaquetas e leucócitos ativados, entre outros, podem ativar o endotélio (Aird, 2003b).

Na sepse, as células endoteliais respondem a citocinas expressas e liberadas por leucócitos ativados, mas elas também produzem e secretam citocinas. Além disso, são capazes de expressar moléculas de adesão e fatores de crescimento que podem não somente promover a resposta inflamatória, mas também afetar os eventos trombóticos (figura 3). Em um desses mecanismos, células endoteliais passam a expressar, em sua superfície, duas moléculas envolvidas na coagulação: FvW e FT. Células endoteliais podem, também, interferir diretamente na deflagração, regulação da formação e remoção de fibrina. Sendo assim, células endoteliais desempenham um importante papel nas três principais vias associadas a coagulopatias na sepse: geração de trombina mediada por fator tissular, disfunção das vias anticoagulantes e da fibrinólise (Levi *et al*., 2003).

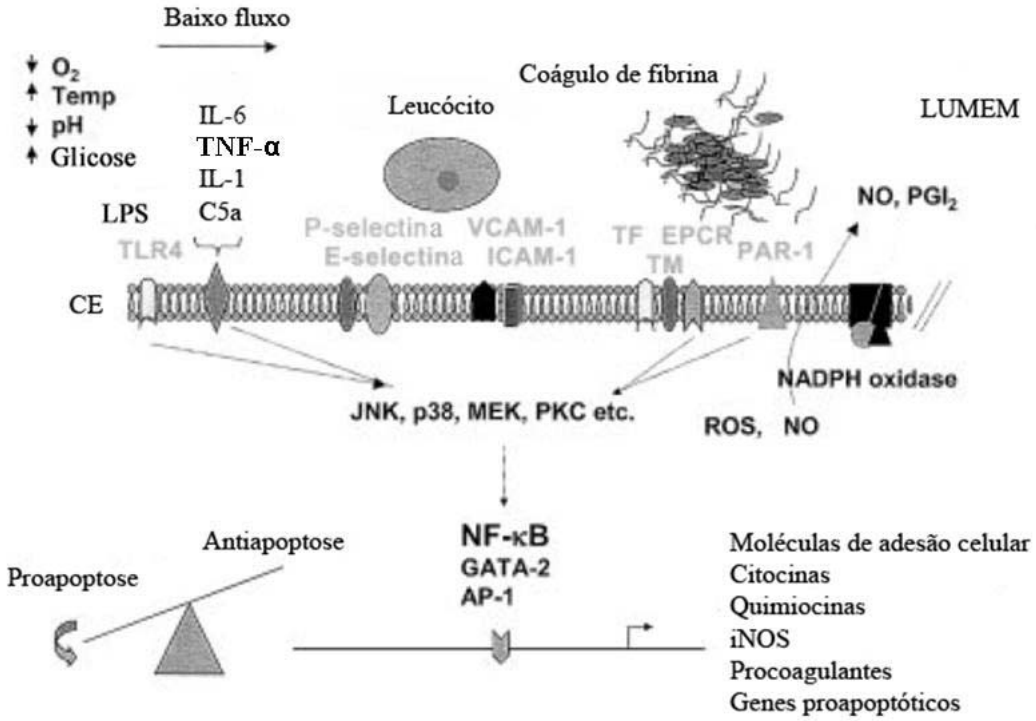


Figura 3: Endotélio na sepse. Na sepse, o endotélio é ativado por ligação do LPS ao receptor TLR4 ou pela interação de mediadores inflamatórios (IL-6, TNFα, IL-1 etc) com seus respectivos receptores. Ao mesmo tempo o endotélio pode ser condicionado por outros fatores ambientais, tais como hipóxia, baixo fluxo sanguíneo, mudanças na temperatura etc. A interação dos mediadores extracelulares com seus respectivos receptores leva a ativação de cascatas de sinalização intracelulares (incluindo MAPK e PKC) que podem promover alterações gênicas através de reguladores transcricionais (NF-κB, por exemplo). O aumento da expressão de moléculas de adesão celular na superfície do endotélio (como ICAM-1, P-selectina, entre outros) promove aderência, rolamento e transmigração dos leucócitos circulantes. A interação entre leucócitos e endotélio é capaz de modular o fenótipo desta última. A liberação de citocinas pelo endotélio resulta em ativação adicional de monócitos e células endoteliais. Aumentada expressão de moléculas procoagulantes (como fator tissular) e/ou expressão reduzida de moléculas anticoagulantes (trombomodulina, EPCR) promove aumentada geração de trombina e formação de fibrina. Durante o processo de ativação, NADPH oxidase pode induzir a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS), NO é liberado e aumenta a permeabilidade vascular (Aird, 2003b).

4. Coagulação

Em indivíduos normais, a coagulação é iniciada em cerca de 20 segundos após uma lesão vascular, pela formação do tampão plaquetário decorrente da agregação de plaquetas no local da lesão. Essa é a chamada hemostasia primária. A hemostasia secundária acontece quando componentes do plasma - os fatores da coagulação - iniciam uma cascata de reações que culmina com a formação da rede de fibrina, que fortalece o tampão plaquetário.

Didaticamente, a coagulação sanguínea tem sido descrita como sendo decorrente da ativação de duas vias (figura 4). A intrínseca, tem início com a exposição de determinadas proteínas de coagulação a cargas negativas do vaso sanguíneo lesado (via desencadeada pelo

contato). Esse processo envolve os fatores XI e XII, calicreína plasmática e cininogênio de alto peso molecular (HMWK). A partir do contato e com a participação destas proteínas, uma série de reações acontece e culmina com ativação do fator X. Na via extrínseca, após lesão vascular, o fator tissular liga-se ao fator VII ativado (FVIIa) formando um complexo que ativa os fatores IX e X. O fator X ativado (FXa) é o ponto de convergência das vias intrínseca e extrínseca. Na presença do fator V ativado (FVa), FXa converte a protrombina em trombina, que converte o fibrinogênio em fibrina, formando assim o trombo. O fator IX ativado (FIXa), na presença do fator VIIIa também pode ativar fator X e resultar na geração do coágulo de fibrina.

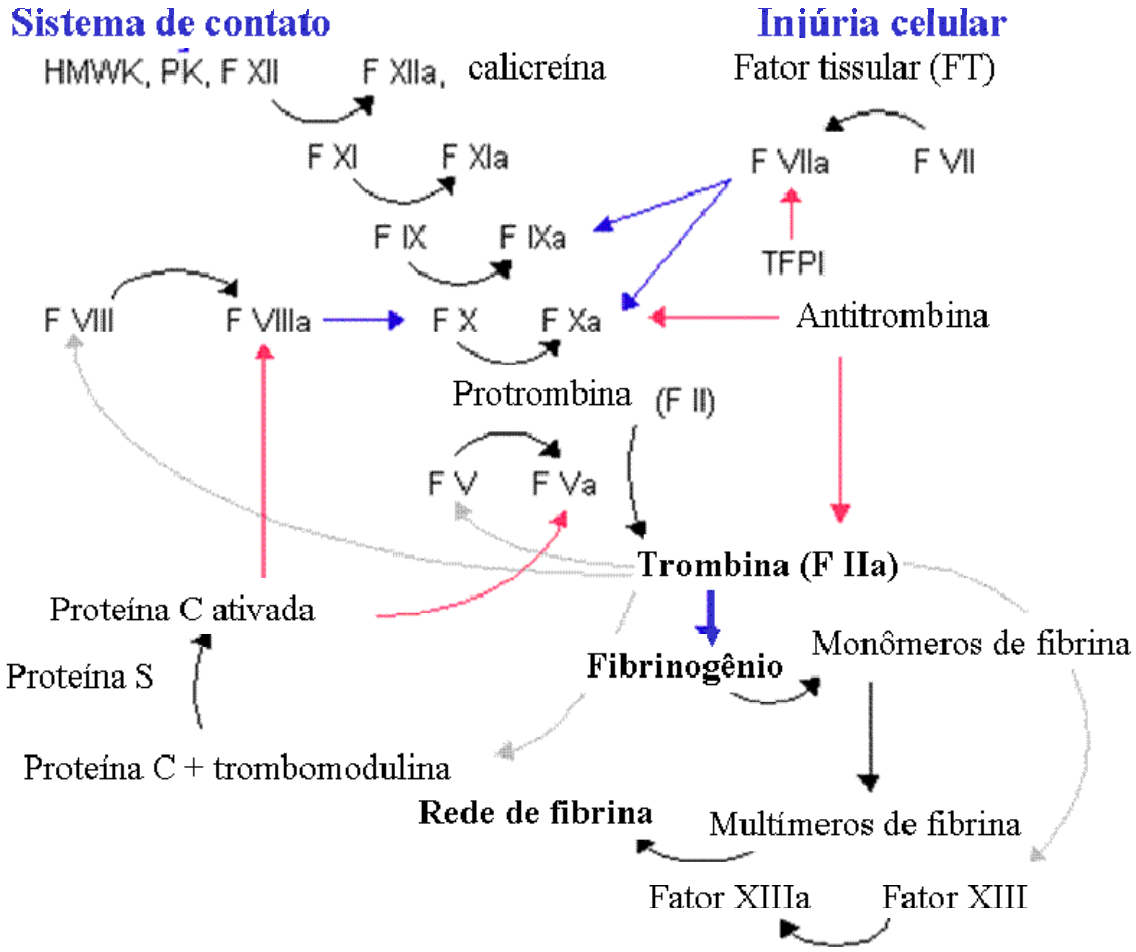


Figura 4: Cascata de coagulação. Setas pretas indicam ativação/conversão de fatores. Setas vermelhas indicam ação de inibidores. Setas azuis indicam reações catalizadas por fatores ativados. Setas cinzas indicam as várias funções da trombina (www.wikipedia.com.br).

A formação do trombo, resultante da agregação de fibrina com o tampão plaquetário, além de ser fundamental para a hemostasia, é uma importante etapa da resposta inflamatória aguda, servindo como uma barreira em um tecido infectado para limitar a disseminação do patógeno.

5. Plaquetas e sua participação na hemostasia e resposta inflamatória

Plaquetas são fragmentos de megacariócitos, anucleados, com vários tipos de grânulos (lisossomos, corpúsculos densos - contendo ADP, ATP, serotonina, histamina, e cálcio - e grânulos α - contendo fibrinogênio, fator V, vitronectina, trombospondina, FvW, entre outros). Expressam inúmeros ligantes e receptores em suas membranas plasmáticas que desempenham papel fundamental na coagulação sanguínea. Seu contato com o endotélio vascular lesado resulta na adesão à superfície subendotelial através da interação entre o complexo de glicoproteínas GPIb-V-IX presente na superfície das plaquetas e o colágeno exposto no endotélio lesado, sendo essa ligação mediada pelo FvW presente na matriz subendotelial (figura 5). Essa interação permite a ligação do receptor de colágeno GPVI a seus ligantes, iniciando assim a ativação plaquetária. Uma vez ativadas, as plaquetas são induzidas a mudar a expressão, em sua superfície, de integrinas de baixa afinidade para as de elevada afinidade, proporcionando uma adesão firme ao colágeno, capaz de sustentar o crescimento do trombo. A ativação plaquetária favorece, também, a liberação de mediadores preformados presentes em seus grânulos, como ADP e FvW, bem como a síntese e liberação de mediadores neo-formados, como tromboxano A_2 (TXA_2), produzido a partir do ácido araquidônico pela via das cicloxigenases, e fator de ativação plaquetária (PAF). Essas moléculas tanto promovem a interação plaqueta-plaqueta (agregação) quanto as ativam, tornando-as substrato para recrutamento e aderência de outras plaquetas (Ruggeri, 2007).

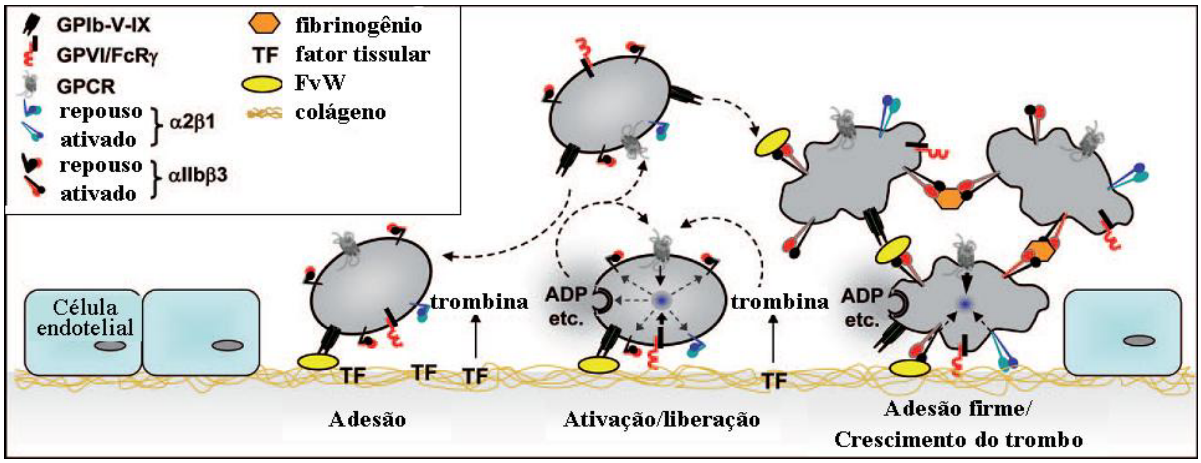


Figura 5: Adesão de plaquetas à matriz subendotelial. A interação entre GPIb-V-IX e FvW media a adesão das plaquetas, favorecendo a ligação de GPVI ao colágeno exposto. Isso desencadeia a mudança do estado de baixa para alta afinidade das integrinas e a liberação de ADP e TxA_2. Em parelelo, fator tissular induz localmente a formação de trombina, o qual também contribui para ativação das plaquetas, favorecendo sua adesão e agregação firme e, consequentemente, a formação do trombo (Varga-Szabo *et al*., 2008).

Além da formação do tampão plaquetário, a superfície das plaquetas ativadas, rica em fosfolipídios aniônicos, é crucial para a ativação dos fatores de coagulação e formação de trombina, fenômenos envolvidos no processo trombótico (Wu & Thiagarajan., 1996).

Além de liberar mediadores estocados em seus grânulos, plaquetas ativadas são também capazes de sintetizar fator tissular a partir de transcritos primários pré-existentes (revisado por Weyrich *et al*., 2003). Alternativamente, estudos mostraram que as plaquetas podem adquirir moléculas de fator tissular expressas em micropartículas, após a fusão das membranas destes dois tipos de estruturas (Wohner, 2008).

6. Fator de von Willebrand

FvW é uma glicoproteína adesiva produzida majoritariamente por células endoteliais, onde fica estocada nos corpúsculos de Weibel-Palade, mas também, em baixas quantidades, por plaquetas, onde se encontra nos grânulos α. Uma vez liberado de seus grânulos, FvW pode ser encontrado associado à superfície de células endoteliais e à matriz extracelular, bem como no plasma.

A estrutura protéica básica do FvW (também chamada de protômero), formada no retículo endoplasmático, é composta por 2050 aminoácidos e tem massa de 220 kDa. No aparato de Golgi, números variáveis dos protômeros se unem formando multímeros, com massa molecular entre cerca de 500 a 10.000 kDa que, quando observados em microscópio eletrônico, aparecem como fitas de 1-3μm de extensão (aproximadamente o diâmetro de uma plaqueta), frouxamente enroladas (Wagner DD, 1990) (figura 6).

A presença de multímeros é importante porque aumenta o potencial trombogênico de FvW, uma vez que multiplica os sítios de interações para componentes da parede vascular e das plaquetas, resultando em propriedades adesivas mais eficientes.

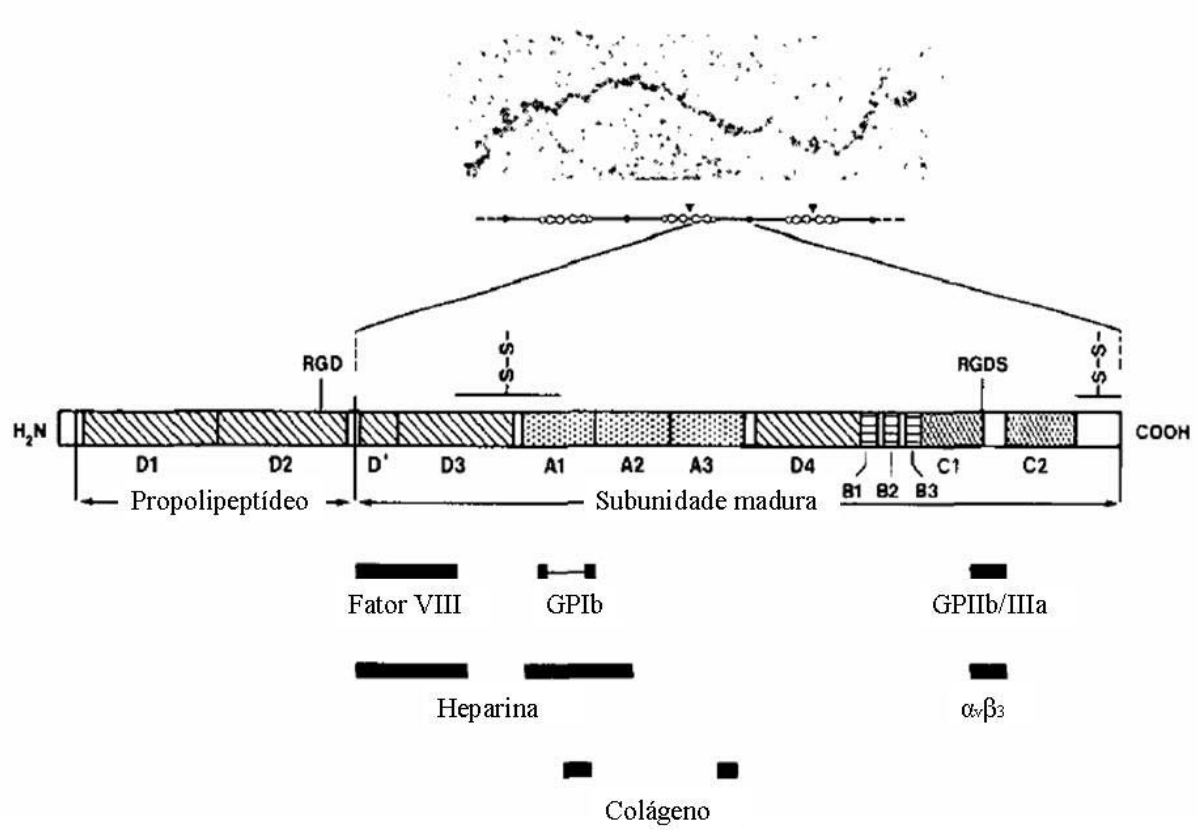


Figura 6: Estrutura do fator de von Willebrand. A imagem no topo da figura representa uma micrografia eletrônica de um multímero de FvW. Na imagem de baixo os sítios de ligação das moléculas são indicados pelos retângulos pretos (Wagner DD, 1990).

As etapas de síntese do FvW por células endoteliais e plaquetas são similares. Essa proteína sofre modificações pós transcricionais que incluem glicosilação, multimerização, clivagem endoproteolítica e então são secretados ou estocados nos grânulos específicos destes dois tipos celulares (Wagner DD, 1990). A existência dos corpúsculos de Weibel-Palade nas células endoteliais, mas não dos grânulos α de plaquetas e megacariócitos, é dependente da existência de FvW. Além disso, células endoteliais que não expressam FvW não podem estocar outras proteínas, como P-selectina, IL-8 e endotelina, normalmente também encontradas nos corpúsculos de Weibel-Palade (Zaverio *et al*., 2003).

O FvW é o mediador central da adesão de plaquetas à matriz subendotelial e contém sítios de ligação para colágeno, assim como para os dois principais receptores plaquetários, as glicoproteínas GPIb e GPIIb/IIIa (também chamada integrina αIIbβ3). Suas subunidades apresentam quatro domínios repetidos (A-D; figura 6). O domínio A1 liga-se ao colágeno tipo VI bem como ao receptor plaquetário GP Ib-IX-V, garantindo a ligação das plaquetas ao colágeno subendotelial (Varga-Szabo *et al*., 2008). O domínio A3 do FvW garante sua ligação aos colágenos tipo I e III, que são os principais constituintes da matriz extracelular de vasos

sanguíneos. O domínio C1 contém sequências arginina-glicina-aspartato (conhecidas como sequências RGD) e são sítio de ligação para as integrinas αIIbβ3, da superfície plaquetária, e αvβ3. Os domínios D'-D3 formam sítio de ligação para o fator VIII da coagulação, protegendo-o da degradação proteolítica no plasma e estabilizando sua atividade (figura 6).

Como acima mencionado, o FvW também é encontrado sob forma solúvel no plasma. A ligação de FvW solúvel a plaquetas não ativadas é finamente regulada para prevenir a agregação das células circulantes, mas FvW imobilizado em uma superfície é altamente reativo com plaquetas circulantes. Além deste mecanismo de proteção, os multímeros de FvW circulam em uma conformação enrolada que protege o domínio A1 (Wohner, 2008).

A liberação do FvW dos corpúsculos de Weibel-Palade ocorre através de exocitose induzida por diversos agonistas, como pode ser visto na figura 7, onde aparecem, também, dois agentes antagonistas (Lowenstein *et al*., 2005).

Figura 7: Tabela ilustrando os principais ativadores e inibidores da exocitose de FvW.

Classe	**Agonistas**
Físicos	Hipoxia Radiação Trauma
Químicos endógenos	ATP ADP Ânion superóxido Leucotrienos Histamina Epinefrina Serotonina
Polipeptídeos	Trombina Fibrina VEGF Complemento (C5-9)
Classe	**Antagonistas**
Radicais	NO H_2O_2

Multímeros de FvW liberados por células endoteliais ligam-se às membranas plaquetárias através do receptor GPIb-IX-V e iniciam sinais que levam à ativação plaquetária.

Esse processo envolve a ativação de PLA_2, liberação de ácido araquidônico, influxo de cálcio celular (Francesconi *et al.,*1995), ativação de fosfolipase C (PLC), reorganização do citoesqueleto e interação de muitas moléculas de sinalização com filamentos de actina, entre outros eventos. Alguns desses eventos, como a ativação de PLC, parecem decorrer da ação secundária de TXA_2 , molécula que desempenha papel central na ativação de plaquetas por FvW (Canobbio *et al*., 2001).

Após a indução da secreção dos estoques endoteliais, multímeros de grande massa molecular do FvW podem ser detectados transitoriamente no plasma. No entanto, o processo mais comum é sua clivagem em unidades menores e menos ativas, antes da sua liberação, quando ainda estão ancorados à membrana das células endoteliais, por uma metaloprotease conhecida como ADAMTS13 (*a desintegrin-like and metalloprotease with thrombospondin type 1 motifs*), enzima esta que limita a formação do trombo plaquetário e, portanto, contribui para a manutenção da homeostasia.

ADAMTS13 é produzida principalmente pelas próprias células endoteliais, mas também por plaquetas (Liu *et al*., 2005). A clivagem do FvW gera fragmentos de 176kDa e 140kDa que são encontrados normalmente na circulação (Bernardo *et al*., 2004).

Foi visto que a diminuição das concentrações de ADAMTS13 ocorre no curso da coagulação intravascular disseminada, quadro frequentemente observado em pacientes com sepse. Além disso, mutações em ADAMTS13 foram identificadas em pacientes com púrpura trombocitopênica trombótica crônica (Levy *et al*, 2001), uma descoberta que estabelece uma relação direta entre o processamento proteolítico alterado dos multímeros de FvW no sangue e as complicações trombóticas típicas dessa patologia.

Outra forma de regular o tamanho dos multímeros do FvW é através da atividade redutase de ligações dissulfídicas creditada à trombospondina-1. Esse processo envolve um rearranjo das ligações dissulfídicas das subunidades do FvW que causa a despolimerização dos multímeros, revertendo a reunião realizada durante a biossíntese (Zaverio & Ruggeri, 2003).

Níveis aumentados de FvW no plasma foram observados em diversos estados patológicos, como algumas infecções bacterianas (Kayal *et al*., 1998) ou virais (Tzavara *et al*, 1997), lesão pulmonar aguda pós-traumática (Siemiatkowski *et al*, 2000), doenças autoimunes (Porta *et al*., 1999; McEntegart *et al*, 2001) e doenças coronarianas e arteriais (Jager *et al*., 1999; Nielsen *et al*., 2000).

Estímulos inflamatórios, como a produção de IL-8 e TNF-α, favorecem a liberação de FvW e podem levar ao recrutamento local de plaquetas. Já IL-6 inibe a clivagem dos

multímeros de FvW, resultando em acúmulo desses multímeros no plasma e na superfície das células endoteliais para induzir adesão no endotélio vascular e agregação plaquetária (Bernardo *et al*., 2004). Esse eventos mostram, mais uma vez, a ligação existente entre inflamação e coagulação.

Outra situação que ilustra a interação entre os fenômenos inflamatórios e trombóticos é a recente descoberta de que FvW possibilita a ligação de duas moléculas adesivas presentes na superfície de leucócitos: glicoproteína ligante de P-selectina (PSGL-1) (envolvida no rolamento de leucócitos sobre o endotélio) e β2 integrina (envolvida na adesão firme dos leucócitos no endotélio). Uma possível explicação para isso é a semelhança estrutural entre PSGL-1 e GPIbα plaquetária, possibilitando sua ligação ao domínio A1 e a demonstração de que β2 integrina é capaz de se ligar à múltiplas regiões do FvW (Pendu *et al*., 2006).

Estudos mostraram que estímulos infecciosos são capazes de modular os níveis plasmáticos de FvW (Tsao *et al*., 2006). Também o estresse oxidativo é capaz de modular a secreção de FvW. O ânion superóxido, por exemplo, induz uma potente e rápida liberação de FvW por células endoteliais, com aumento da concentração de cálcio intracelular (Visher *et al*., 1995). Trombina e histamina, dois conhecidos agentes indutores da exocitose de FvW, também atuam aumentando os níveis de cálcio intracelular e esse aumento ativa a enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) que, então, aumenta a produção de óxido nítrico (NO). Este, por sua vez, funciona como sinalizador autócrino e inibe a secreção de FvW por inativar proteínas associadas a fusão do grânulo (corpúsculos de Weibel-Plade) à membrana, da mesma forma que H_2O_2 (Matsushita *et al*., 2005; Zarei *et al*., 2006).

7. Fator tissular

FT é uma glicoproteína transmembrana de 46 kDa que pertence à superfamília de receptores de citocinas, e que inicia a cascata de coagulação pela via extrínseca (vide item 4).

Vários tipos de células que não estão em contato direto com os fatores da coagulação presentes no sangue, são capazes de sintetizar e expressar FT de forma constitutiva. Em outros tipos de células, como as endoteliais, sua síntese é induzida por estímulos proinflamatórios, como citocinas e componentes da parede celular bacteriana. Veltrop *et al*. (1999) mostraram que IL-1, bem como a infecção por *Staphylococcus aureus*, induziram o aumento do RNA mensageiro (mRNA) e a síntese de FT por células endoteliais, que passaram, assim, a exercer atividade protrombótica.

Assim como *S. aureus,* outros patógenos são capazes de induzir a expressão do mRNA e a síntese do FT por células endoteliais, macrófagos e células de músculo liso vascular (Dechend *et al*., 1999, Ettelaie *et al*., 2007). Quanto à regulação transcricional de FT, parece que depende do tipo de célula envolvida e do estímulo que as mesmas recebem, podendo variar entre NF-κB, AP-1, Sp-1 e Egr-1 (Bea *et al*., 2003).

Além de citocinas e produtos microbianos, também o ácido araquidônico e metabólitos gerados pela enzima cicloxigenase 1 são capazes de induzir, em leucócitos mononucleados, a expressão de FT e a atividade procoagulante dele dependente (Cadroy *et al*., 1998).

Além da isoforma associada às membranas plasmáticas de células diversas, o FT pode também ser encontrado na circulação sanguínea, tanto numa forma de proteína solúvel quanto associado a micropartículas (MPs). Trabalhos de Bogdanov *et al* (2003) mostraram que o transcrito primário do RNA de FT sofre *splicing* alternativo, excluindo o exon 5 e gerando uma proteína solúvel, circulante, conhecida como asHFT (alternatively spliced human tissue factor), que possui a maior parte do domínio extracelular de FT mas que não apresenta um domínio transmembrana. Segundo alguns autores, esta proteína só exibe atividade procoagulante quando exposta a fosfolipídios mas pode ser incorporada no trombo, contribuindo, assim, para seu crescimento por criar uma superfície que auxilia a propagação da coagulação. Em 2005, Szotowski *et al* mostraram o potencial das citocinas pró-inflamatórias IL-6 e TNFα de induzir o aumento dos níveis de mRNA de asHTF e de FT em células endoteliais de veias umbilicais humanas, bem como a presença das proteínas nos sobrenadantes de células cultivadas *in vitro*. Os autores sugeriram que a presença da isoforma asHTF no plasma de pacientes possa servir como um marcador indicativo de suscetibilidade a eventos trombóticos.

8. Micropartículas

Micropartículas (MP) são vesículas de 0,05 a 1μm de diâmetro, liberadas por brotamento de regiões da membrana plasmática de virtualmente todos os tipos celulares, denominadas de "*rafts* de lipídios", quando as células são ativadas por estímulos diversos ou entram em apoptose (figura 8). Números elevados de MPs circulantes são encontrados em pacientes com várias doenças com envolvimento vascular e trombótico, como coagulação intravascular disseminada (Nieuwland *et al*., 2000), síndrome coronariana aguda, doenças arteriais periféricas, diabetes melitus e doença inflamatória sistêmica.

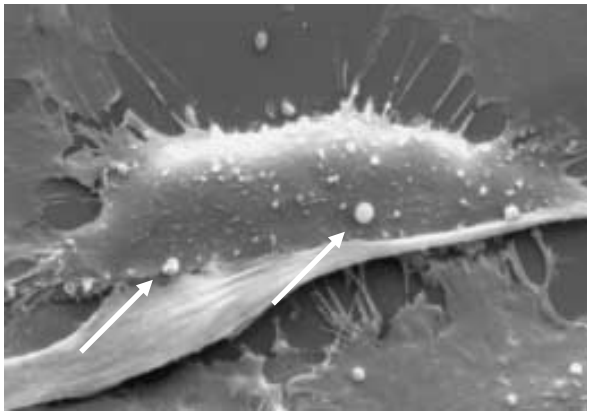


Figura 8: Fotomicrografia mostrando o brotamento de MPs (setas) em células endoteliais de veias de cordão umbilical humano estimuladas (Diamant *et al*., 2004).

MPs contém, em sua superfície, proteínas presentes nas membrana das células que lhe deram origem e também resíduos de fosfatidilserina (além de fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina e esfingomielina), que sofreram transposição dos folhetos internos das membranas plasmáticas para os folhetos externos quando as células foram ativadas ou entraram em processo de apoptose (figura 9) (Diamant *et al*., 2004).

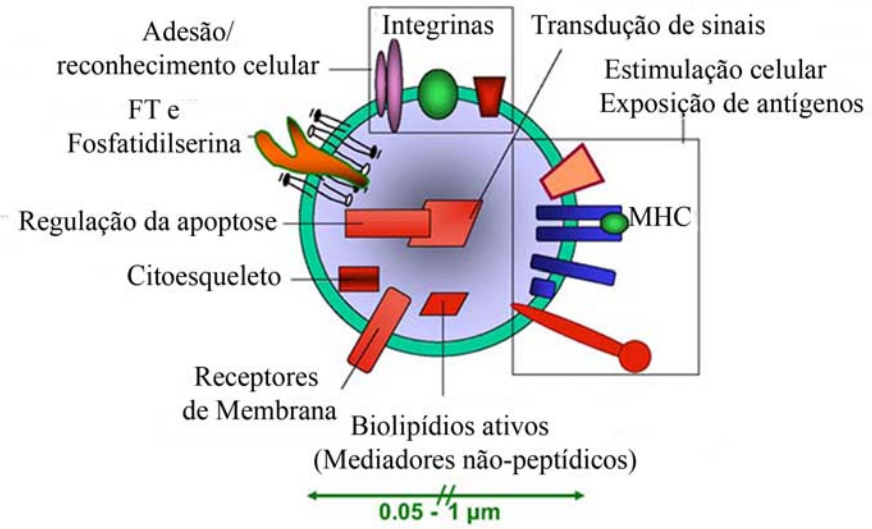


Figura 9: Estrutura e composição das micropartículas. Em função de sua origem celular e do estímulo inicial MPs podem transportar citoadesinas (integrinas principalmente), moléculas de MHC, lipídios bioativos, proteínas implicadas na regulação da apoptose, enzima biologicamente ativas (NADPH oxidase, por exemplo) e fator tissular (Morel *et al*., 2006).

Três enzimas principais estão envolvidas nos processos dinâmicos que regulam a composição lipídica das membranas plasmáticas: flipase, que traz aminofosfolipídios para o folheto interno da membrana, flopase, que favorece a externalização desses fosfolipídios e translocase, que permite a passagem de fosfolipídios específicos. O aumento de cálcio citosólico em resposta à estimulação ou apoptose celular é acompanhado de uma diminuição

da atividade flipase e ativação da flopase e translocase, que levam à externalização precoce de fosfatidilserina. Simultaneamente, observa-se a proteólise dependente de cálcio do citoesqueleto. Sob efeito combinado da sobrecarga lipídica transitória, decorrente da externalização de fosfatidilserina, e da proteólise do citoesqueleto (ruptura das pontes de ancoragem), a membrana plasmática brota e libera micropartículas (figura 10) (Morel *et al*., 2006).

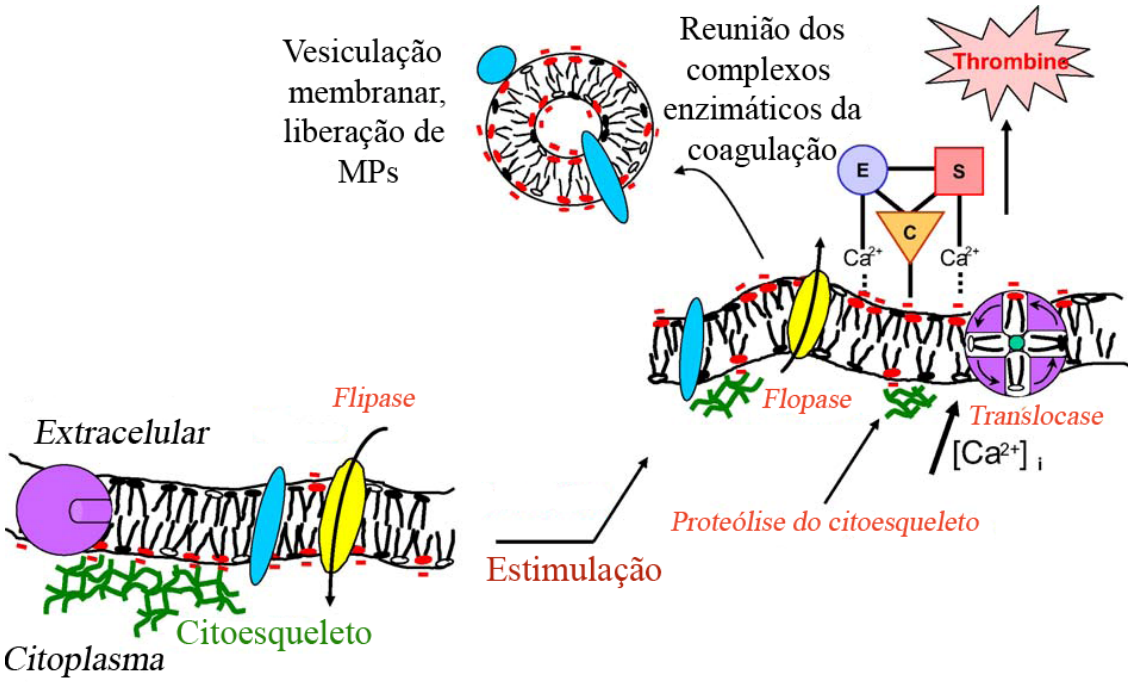


Figura 10: Liberação de micropartículas. A ativação celular e a apoptose são acompanhadas de um aumento de cálcio citossólico conduzindo à proteólise do citoesqueleto. Paralelamente, a atividade flipase é inibida, permitindo que a atividade flopase e translocase aumentem. Os aminofosfolipídios procoagulantes (fosfatidilserina) são translocados para o folheto externo da membrana plasmática. A membrana brota e libera as MPs nos fluidos biológicos (Morel *et al*., 2006).

A presença de fosfatidilserina, dotada de carga negativa, na superfície de MPs favorece a reunião das proteínas envolvidas na coagulação. Por conta disso e da presença de proteínas da cascata da coagulação ancoradas em suas membranas, como o FT, MPs tem sido implicadas em fenômenos trombóticos. Em decorrência de seu pequeno diâmetro, MPs tem grande facilidade se difundir rapidamente pelos fluidos biológicos, podendo, assim, exercer sua atividade procoagulante em sítios distintos daqueles em que tiveram origem. Além disso, MPs podem modificar funções biológicas de células alvo através da transferência de moléculas presentes em seu interior ou de receptores de membrana, por adsorção ou fagocitose. A exemplo, MPs liberadas de células endoteliais foram implicadas na adesão de monócitos ao endotélio, ativação de neutrófilos, formação de trombina, degradação de matriz e angiogênese (Diamant *et al*., 2004). Estudos mostraram, ainda, que, no curso da *AIDS*, a

transferência do receptor CXCR4 funcional, presente em MPs de megacariócitos, pode contribuir para a disseminação do vírus (Rozmyslowicz *et al*., 2003).

MPs parecem estar, também, envolvidas em fenômenos inflamatórios através do transporte de ácido araquidônico para membrana endotelial, induzindo o aumento da expressão de ICAM-1. Além disso, esse ácido araquidônico poderia induzir a expressão de cicloxigenase 2 e a produção de prostaciclina, implicada na vasodilatação e inibição da ativação plaquetária (Tesse *et al*, 2005). MPs de origem plaquetária ou leucocitária induzem a liberação de várias citocinas endoteliais (IL-1β, IL-6, IL-8) ou monocitária (IL-1β, IL-8, TNFα). No curso da sepse, as MPs geradas participam da modulação do estresse oxidativo, por conterem NADPH oxidase, que aumenta a produção das espécies reativas de oxigênio (revisado por Morel *et al*., 2006).

A população de MPs presente em fluidos corpóreos é bastante heterogênea, diferindo na origem celular, número, tamanho, composição antigênica e propriedades funcionais. Como as MPs carregam em sua superfície moléculas das células que lhes deram origem, estas moléculas são utilizadas para identificar sua origem. Assim, por exemplo, MPs procedentes de plaquetas em repouso contém a glicoproteína GP Ib, PECAM-1 e integrina αIIbβ3 (receptora de fibrinogênio), enquanto MPs de plaquetas ativadas contem P-selectina. (Diamant *et al*., 2004). A composição das moléculas de superfície das MPs depende, também, do estímulo ao qual a célula foi submetida. MPs revelam ainda o estado funcional das células. MPs liberadas pelo endotélio ativado expressam predominantemente CD54 e CD62 enquanto MPs do endotélio apoptótico expressam CD31 e CD105. De qualquer forma, independente de serem decorrentes de apoptose ou ativação, MPs tem sido apontadas como marcadores de disfunção endotelial, além de serem consideradas mensageiros extracelulares difusíveis, mediando interação e ativação celular (Jy *et al*., 2005).

Estudos mostraram que MPs endoteliais apresentam sítios de ligação para FvW e expressam inúmeros multímeros desta proteína com potencial de promover a formação de agregados de plaquetas e aumentar sua estabilidade, contribuindo para seu potencial procoagulante (Jy *et al*., 2004). Outro mecanismo capaz de modular este potencial procoagulante de MPs é a presença do FT associado às suas membranas, como evidenciado, em estudos experimentais, no plasma de pacientes tratados com endotoxina bacteriana (Aras *et al*., 2004).

9. Potencial indução de atividade procoagulante em células endoteliais por ExoU

Como anteriormente mencionado, no curso da sepse, a característica anti-trombogênica das células endoteliais pode ser revertida em decorrência, entre outros, da expressão de FT e FvW em suas membranas.

Estudos mostraram a indução da expressão de FT em monócitos pelo ácido araquidônico e seus metabólitos (Cadroy *et al*., 1998). Sabendo que ExoU, por sua atividade PLA_2, induz a liberação de ácido araquidônico e a síntese de eicosanóides por células endoteliais e epiteliais respiratórias (Saliba *et al*., 2005; Plotkowski *et al*., 2008a), nosso grupo pesquisou, recentemente, a modulação da expressão do FT em células epiteliais respiratórias humanas infectadas por cepa selvagem de *P. aeruginosa* produtora de ExoU. Nossos resultados mostraram o potencial protrombótico de ExoU decorrente do aumento da expressão do RNA mensageiro do FT e da síntese da proteína funcionalmente ativa, comprovada pela maior atividade pró-coagulante de células infectadas com a cepa selvagem de *P. aeruginosa*, quando comparadas com aquelas infectadas com cepa mutante com deleção do gene *exoU* ou não infectadas. Células infectadas com a cepa selvagem também liberaram maior concentração de micropartículas contendo FT (Plotkowski *et al*., 2008b).

Nada se sabe sobre a participação de *P. aeruginosa* ou de ExoU na modulação dos fatores envolvidos na coagulação em células endoteliais da microvasculatura, que é o local de ocorrência dos principais fenômenos envolvidos na sepse. Sendo assim, neste estudo tentamos contribuir para um melhor entendimento dos mecanismos pelos quais ExoU contribui para a gravidade das infecções por *P. aeruginosa* pesquisando seu efeito sobre a expressão do FT e do FvW por células endoteliais da microvasculatura humana. A escolha do FvW como indicador de atividade protrombótica das células infectadas foi motivada pelo potencial de indução, por ExoU, do aumento da concentração de cálcio citoplasmático (Jacob *et al*., 2002), um dos mecanismos responsáveis pela exocitose do FvW por células endoteliais.

OBJETIVO GERAL

- Avaliar a capacidade de *Pseudomonas aeruginosa* e de sua toxina ExoU de modular a expressão, em células endoteliais humanas, de duas moléculas envolvidas na coagulação: FT e FvW.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a modulação da expressão gênica de FT e FvW em células infectadas por cepas de *P. aeruginosa* produtora e não produtora da toxina ExoU;
- Avaliar a modulação da expressão das proteínas FT e FvW em células endoteliais por ExoU;
- Pesquisar a capacidade de células endoteliais de microcapilares humanos de secretar FvW (para o sobrenadante das culturas e para matriz extracelular) e a participação de ExoU neste fenômeno;
- Avaliar a funcionalidade do FvW expresso nas membranas celulares, através da aderência plaquetária em condições estáticas e sob fluxo;
- Pesquisar o efeito de ExoU na liberação de MPs por células endoteliais infectadas e a presença de FT e FvW em suas membranas.

MATERIAL E MÉTODOS

- **Cepas bacterianas e condições de cultivo**

Neste trabalho utilizamos duas cepas de *P. aeruginosa*: PA103, cepa selvagem, citotóxica, produtora de ExoU e ExoT e PA103Δ*exoU*, mutante obtida por deleção do gene *exoU* (Saliba *et al.,* 2005). As bactérias foram cultivadas em meio de cultura LB (Luria Broth) a 37°C por 16-18 horas sob agitação a 200 rpm. Em seguida, as culturas foram centrifugadas (3000 x g por 10 minutos), os sobrenadantes descartados e os sedimentos foram ressuspensos em meio MCDB-131 (Sigma-Aldrich) contendo 10% de soro fetal bovino (SFB) e glutamina. As concentrações das suspensões bacterianas foram ajustadas em espectrofotômetro de forma a atingir a A_{660nm}= 0,1, correspondente a 10^8 unidades formadoras de colônia (UFC) / mL.

- **Cultura de células e condições de infecção**

Para a realização de nossos experimentos, foram utilizadas células endoteliais de microcapilares de derme humana (linhagem HMEC-1; Ades *et al*., 1992) cultivadas em garrafas de cultura de células de 25cm^2 ou de 75cm^2 em meio MCDB-131 completo, ou seja, contendo 10% de SFB (Invitrogen), glutamina (250µg/mL; Isofar), EGF (10ng/mL; Sigma-Aldrich), hidrocortizona (1 µg/mL; Sigma-Aldrich) e suplementado com os antibióticos gentamicina (50µg/mL – Hipolabor) e fungisona (Anfotericina B - 2,5µg/mL – Bristol-Myers Squilb). As culturas foram incubadas a 37ºC em atmosfera de 5% de CO_2 e, quando confluentes, foram tratadas com solução de tripsina (0,1%) e EDTA (0,01%) em solução salina tampão Dulbeco sem cálcio e magnésio contendo 1% de vermelho de fenol. Após dissociação, as células foram ressuspensas em meio de cultura completo. Alíquotas das suspensões celulares na concentração de 1,5 x 10^5/mL foram distribuídas em microplaca de 6 poços (3mL/poço), 24 poços (1mL/poço) ou 96 poços (200µL/poço) ou ainda em garrafas de cultura de células de 25cm^2 (3mL/garrafa). Seguiu-se a incubação por 48 horas, até a obtenção de culturas confluentes.

Para a realização dos testes, culturas de células confluentes foram expostas a diferentes volumes das suspensões bacterianas e as microplacas ou garrafas foram centrifugadas (1000 x g por 10 minutos a 4^{o}C) para favorecer o contato entre as bactérias e as células hospedeiras, bem como a injeção de ExoU. Seguiu-se a incubação por 1 hora a 37^{o}C

em atmosfera contendo cerca de 5% de CO_2, lavagem das culturas com salina tampão fosfato, pH7.4 (PBS) e adição de meio de cultura contendo 300 μg/mL de gentamicina por diferentes períodos, para eliminação dos microrganismos extracelulares. Assim, na descrição dos protocolos utilizados ao longo deste estudo, a referência a períodos de infecção de 1 hora significa contato com as bactérias por 1 hora e ausência de tratamento com o meio contendo antibiótico enquanto a referência a período de infecção por outros períodos significa 1 hora de contato com os microrganismos, seguida pela incubação, durante o restante do tempo, em presença de meio com gentamicina.

- **Detecção da expressão do mRNA de FvW e FT pela Reação em Cadeia da Polimerase por Transcriptase Reversa (RT-PCR)**

1- Extração de RNA total e síntese de DNA complementar (cDNA)

O RNA total das células cultivadas em garrafas de cultura de células de 25cm^2 foi isolado de culturas não-infectadas (controle) ou infectadas por 1 ou 3 horas, usando o kit RNeasy (Qiagen), seguindo as recomendações do fabricante. Em seguida, foi determinada a concentração do RNA total por espectrofotometria ($A_{260\eta m}$) e seu grau de pureza através da relação entre as absorbâncias obtidas com as leituras em 260 e 280 nm.

O cDNA foi sintetizado a partir do RNA total utilizando o kit SuperScript III RT (Invitrogen) seguindo as recomendações do fabricante.

2- PCR para FvW, FT e β-actina

O cDNA foi diluído em água milliQ e 5μL foram adicionados ao *master mix* juntamente com o tampão da enzima 10X (2,5μL), 50mM $MgCl_2$ (1,5μL), dNTPs 5mM (0,5μL), 10pmol de cada primer (0,5μL cada), 1 unidade da enzima *Taq* DNA polimerase (Promega) (0,25μL) e água para completar o volume para 25μL. A amplificação por PCR ocorreu após uma etapa inicial de desnaturação (2 minutos a 94°C) e 37 (FT) ou 33 (FvW) ciclos de desnaturação (94°C por 45 segundos), anelamento (50ºC para FT ou 55°C para FvW por 45 segundos) e alongamento (72°C por 45 segundos). Um passo adicional de extensão de 5 minutos a 72°C foi realizado após o último ciclo. O gene que codifica a β-actina (considerado um *housekeeping gene*) foi utilizado para normalizar a expressão dos genes em estudo. Para as reações de amplificação por PCR para β-actina foram realizados 23 ciclos de desnaturação (94°C por 45 segundos), anelamento (52°C por 45 segundos) e alongamento (72°C por 45 segundos), além de um passo adicional de extensão de 5 minutos a 72°C. Os

primers usados nas reações foram: 5'- CCC GAA CAG TTA ACC GGA AGA -3' (FT senso); 5'- GCT CCA ATG ATG TAG AAT ATT TCT CTG A -3' (FT antisenso); 5'-AGT TCA TGG AGG AGG TGA TTC AGC-3' (FvW senso); 5'- AGC CAT CCA GGA GAA GGA TCA CG-3' (FvW antisenso); 5'-CCT CGC CTT TGC CGA TCC -3' (β-actina senso) e 5'-GGA TCT TCA TGA GGT AGT CAG TC-3' (β-actina antisenso). Os produtos do PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose, a 1% para FvW (539bp) e 3% para FT (100bp), em tampão SB (Soda-Borato), e corados com brometo de etídeo (10μg/mL). A densitometria foi realizada usando o "software" LabImage (Kaplan GmbH, Germany).

- **Detecção da expressão das proteínas FvW e FT em células endoteliais**

1. Citometria de fluxo

Após infecção de culturas confluentes por 3 e 6 horas (na pesquisa de FT) ou 6 e 20 horas (na pesquisa de FvW) com ambas as cepas de *P. aeruginosa*, células HMEC-1 foram dissociadas pela ação da tripsina (para FvW) ou EDTA 0,05% pH 7.2 (para FT), lavadas em PBS, fixadas em solução contendo 4% de paraformaldeído e 4% de sacarose em PBS 0,01M por 20 minutos a temperatura ambiente e permeabilizadas ou não com 0,05% de Triton X-100 por 5 minutos, também a temperatura ambiente. A etapa de permeabilização ou não das células se deve ao fato de estudarmos a expressão da proteína na superfície celular (situação em que foram utilizadas células não permeabilizadas) ou sua expressão total, ou seja, superficial e citoplasmática (células permeabilizadas). Seguiu-se a centrifugação (1000 x g por 10 minutos a 15°C), lavagem das células com PBS 0,01M e com PBS contendo 3% de albumina sérica bovina (PBS-BSA 3%) e ressuspensão dos sedimentos em solução de anticorpo primário anti-FvW humano (rabbit anti-human FvW factor; 22μg/mL - Dako) ou anti-FT (goat anti-human tissue factor IgG; 4μg/mL - American Diagnostica Inc.) em PBS contendo 1% de albumina sérica bovina (PBS-BSA 1%). Após incubação por 1 hora a 4°C, as células foram centrifugadas, lavadas com PBS 0,01M e incubadas com solução de anticorpo secundário goat anti-rabbit IgG-FITC (Santa Cruz Biotechnology) em PBS 0,01M (5 μg/mL) por 1 hora a 4°C, para a detecção do FvW, ou anticorpo rabbit anti-goat IgG - Cy3 Conjugate (Invitrogen) diluído 1/200 para detecção do FT, nas mesmas condições. Seguiram-se novas lavagens e centrifugações, ressuspensão dos sedimentos em 250μL de PBS-BSA 1% e análise de 5 000 células em citômetro de fluxo (FACScalibur, BD). Células controle não infectadas foram submetidas a igual tratamento.

2. Microscopia confocal

Suspensões celulares na concentração de 1,0 x 10^5 células/mL foram cultivadas sobre lamínulas de vidro colocadas nos poços de microplacas de 24 poços, de modo a serem obtidas, após 48 horas a 37^{o}C, culturas celulares semi confluentes. Seguiu-se a infecção ou não com suspensões das cepas PA103 e PA103Δ*exoU* por 3 horas (para FT) ou 6 horas (para FvW), lavagem com PBS e fixação com solução contendo 4% de paraformaldeído e 4% de sacarose em PBS 0,01M. Após três lavagens com PBS 0,01M por 5 minutos cada, as células foram tratadas com soro normal do animal onde foi feito o anticorpo secundário a 5% em PBS (soro de cabra para pesquisa do FvW e de coelho, para pesquisa do FT) por 1 hora de forma bloquear os sítios de ligação inespecífica dos anticorpos. As culturas foram, então, incubadas com solução de anticorpo primário anti-FvW ou anti-FT "overnight" a 4ºC. Seguiram-se novas lavagens com PBS 0,01M, incubação com anticorpo secundário goat anti-rabbit IgG-Cy3 conjugate diluído a 1/100 para FvW e anticorpo rabbit anti-goat IgG-Cy3 conjugate diluído a 1/100 para FT por 2 horas em câmara úmida. Seguiu-se a incubação com marcador nuclear DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole/ 1/200 em PBS 0,01M) por 5 minutos em câmara úmida, lavagens, montagem das lamínulas sobre lâminas de microscopia com N-propilgalato e observação em microscópio confocal (Zeiss) com aumento de 63 vezes.

- **Determinação da presença de FvW nos sobrenadantes e na matriz extracelular de células endoteliais**

Culturas de células foram infectadas com as suspensões de PA103 ou PA103Δ*exoU* por uma hora, lavadas e incubadas com meio contendo gentamicina por período adicional de 71 horas. Culturas não infectadas sofreram igual tratamento. Após 72 horas, os sobrenadantes foram recuperados e concentrados 20 vezes em Speed Vac Plus (Savant). Poços de microplacas de 96 poços do tipo PolySorp (Nunc) foram incubados com 50µL/poço de solução do anticorpo anti-FvW humano (10µg/mL / Dako) diluído em tampão carbonato pH 9,6. Após incubação "overnight" a temperatura ambiente, os poços foram lavados três vezes com PBS-0,05% Tween e bloqueados com PBS-1% BSA por uma hora. Após três lavagens, 50µL de cada amostra dos sobrenadantes concentrados foram aplicados nos poços e seguiu-se incubação por duas horas. Novamente os poços foram lavados e incubados por uma hora com solução do complexo anticorpo anti-FvW-peroxidase (Dako) diluído 1/2000 em PBS-0,05% Tween-0,1% BSA. Seguiram-se novas lavagens, incubação por 30 minutos com solução de

OPD (Orto-fenilenodiamina; Sigma-Aldrich) em tampão citrato contendo 5μL/mL de peróxido de hidrogênio. A reação foi interrompida pela adição de solução de parada (H_2SO_4 2N). A absorbância dos diferentes poços foi determinada em espectrofotômetro tipo leitor de microplacas em 290nm. A concentração do FvW em cada tipo de sobrenadante foi estimada pela utilização de uma curva feita com diferentes diluições de pool de plasma humano normal, tendo sido a concentração do FvW no plasma não diluído arbitrada como sendo de 1 unidade/mL.

Em paralelo, culturas infectadas por uma hora com as duas cepas bacterianas, bem como culturas controle não infectadas, foram tripsinizadas e submetidas à contagem da concentração de células em cada poço das microplacas, a fim de normalizar a concentração de FvW secretado por 10^5 células. Isto porque, como ExoU tem atividade citotóxica importante, a concentração de células viáveis presentes nas culturas tratadas com a cepa selvagem, após 1 hora de infecção, é significativamente inferior à concentração detectada nos outros tipos de culturas.

Para avaliação da presença de FvW na matriz extracelular produzida por HMEC-1, células cultivadas em placas de 96 poços, infectadas ou não por 72 horas, foram lavadas quatro vezes com PBS, lisadas por 20 minutos a temperatura ambiente com solução contendo 0,1M de NH_4OH e 0,1% triton X-100 (Bonnefoy *et al.*, 2001). A matriz extracelular foi, então, lavada três vezes com PBS-0,05% Tween, fixada com solução contendo 4% de paraformaldeído e 4% de sacarose em PBS 0,01M por 20 minutos a temperatura ambiente, lavada, bloqueada com PBS-BSA 1% por uma hora, lavada e incubada com solução do complexo anticorpo anti-FvW-peroxidase. Seguiu-se a incubação com solução contendo OPD e peróxido de hidrogênio e interrupção da reação pela adição de H_2SO_4 2N. A absorbância dos poços das microplacas foi determinada em leitor de microplacas em 290nm e a concentração relativa de FvW na matriz foi estimada como descrito acima.

- **Avaliação da funcionalidade de FvW expresso nas células endoteliais**

1. Preparo da suspensão de plaquetas

Plaquetas humanas foram isoladas de 50mL de plasma humano normal acrescido de 10% do volume de solução ACD (130mM ácido cítrico; 153mM citrato trissódico e 111mM glicose; pH6,5) contendo PGE_1 (1U/mL; Sigma-Aldrich). Após centrifugação da mistura a 1500 x g por 10 minutos a temperatura ambiente, o sobrenadante foi descartado e as plaquetas presentes nos sedimentos foram lavadas três vezes com tampão de lavagem de plaquetas

(36mM ácido cítrico, 5mM glicose, 5mM KCl, 2mM $CaCl_2$, 1mM $MgCl_2$, 103mM NaCl; pH 6.4). Entre cada lavagem a suspensão de plaquetas foi centrifugada a 3500 x g por 15 minutos a temperatura ambiente. Seguiu-se a determinação de sua concentração e preparo de suspensão contendo 1,0 x 10^7 plaquetas/mL em tampão de lavagem.

2. Possível papel de FvW na adesão plaquetária

Para realização destes testes, 1,0 x 10^5 células endoteliais foram cultivadas sobre lamínula em placas de 24 poços por 48 horas, infectadas ou não por 6 horas, lavadas e incubadas por 30 minutos com a suspensão de plaquetas. As lamínulas foram, então, fixadas com 4% de paraformaldeído e 4% de sacarose em PBS 0,01M por 20 minutos, lavadas, coradas com corante de Giemsa, secas e montadas em lâminas de microscopia com Entellan (Merck).

Em outros experimentos, as suspensões de plaquetas foram perfundidas sobre as lamínulas com auxílio de uma bomba peristáltica (Pump-1/ Pharmacia Biotech) com débito de 10mL/minuto durante 5 minutos. Após a perfusão as lamínulas foram coradas, montadas como descrito acima, observadas e fotografadas em microscópio óptico (Zeiss) com objetiva de imersão. Nos dois tipos de ensaios, foram observados no mínimo 10 campos microscópicos distintos em cada lamínula e determinado o percentual de células endoteliais com plaquetas aderentes por campo.

- **Pesquisa de micropartículas no sobrenadante de células infectadas e controle**

Os sobrenadantes de culturas infectadas por 21 horas foram recolhidos e centrifugados a 5000 x g por 15 minutos a 20°C para remoção de eventuais debris celulares. Os sobrenadantes obtidos foram então centrifugados a 17000 x g por 30 minutos a 20°C para sedimentar as micropartículas. Os sedimentos obtidos foram lavados em PBS, centrifugados e ressuspenssos em solução de anticorpo primário anti-FvW ou anti-FT, como descrito anteriormente, no item "citometria de fluxo". Após incubação por 1 hora a 4ºC, realizou-se nova centrifugação, lavagem dos sedimentos em tampão anexina, centrifugação e incubação simultânea, por 30 minutos, com solução dos anticorpos secundários (como descrito anteriormente) e com o complexo anexina V-alexa fluor 647 (Invitrogen). Após nova centrifugação e lavagem, os sedimentos foram ressuspenssos em PBS-BSA 1% e submetidos à análise em citômetro de fluxo. A região a ser analisada foi previamente determinada com a

utilização de pool de esferas fluorescentes com diâmetros de 0,5, 0,9 e 3 μm (Megamix/BioCytex/Nalgene), tendo sido considerados como micropartículas os eventos fluorescentes com diâmetros iguais ou inferiores a 0,9 μm detectados pelo citômetro de fluxo durante o intervalo de leitura de 1 minuto.

Os resultados da pesquisa de micropartículas expressando FT ou FvW foram expressos como o produto do percentual de eventos positivos para cada uma das duas proteínas pela média da intensidade de fluorescência, como proposto por Leytin *et al*. (2000).

- **Análise estatística**

Os resultados representam as médias ± erros padrões (SEM) das médias dos valores obtidos nos diferentes testes. As diferenças estatísticas foram determinadas por análise de variância (ANOVA) e pelos testes de comparação múltipla de Bonferroni e Dunnett, sendo o valor de $P<0,05$ tomado como estatisticamente significante.

RESULTADOS

1. A infecção de células endoteliais pela cepa de *P. aeruginosa* produtora de ExoU por 1 hora resultou no aumento do nível do mRNA do FT

A expressão de uma proteína pode ser alterada pelo aumento ou diminuição da tradução de seu mRNA e pela modificação da transcrição do gene que a codifica.

Para avaliarmos o potencial de ExoU de interferir na transcrição do gene do FT, os níveis de seu mRNA em células não infectadas ou infectadas por uma e três horas foram comparados por RT-PCR.

Como mostrado na figura 11, a infecção pela cepa de *P. aeruginosa* produtora de ExoU por uma hora resultou no aumento significativo dos níveis do mRNA do FT. Embora os níveis detectados nas células infectadas pela cepa mutante tenham sido superiores aos presentes nas células controle, as diferenças não foram estatisticamente significativas. O aumento na expressão do mRNA em células infectadas pela cepa produtora de ExoU não foi mantido após três horas de infecção.

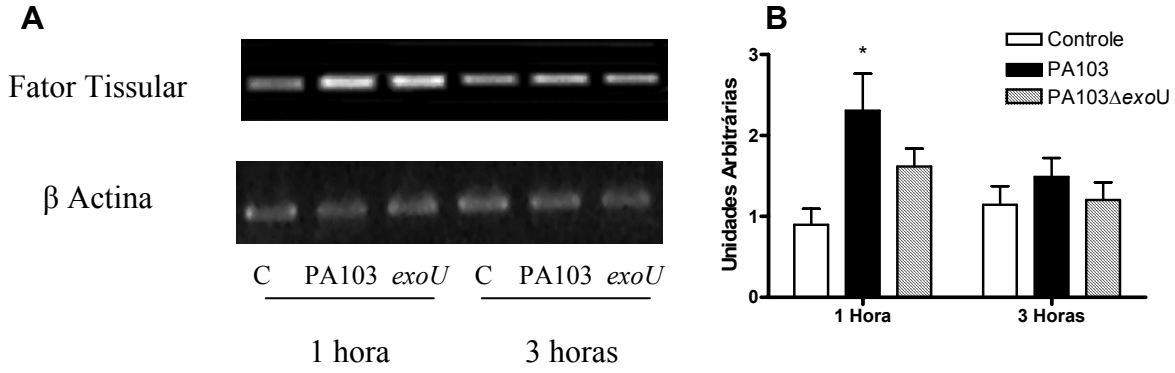


Figura 11: Expressão do mRNA de FT em células endoteliais controle (C) não infectadas e infectadas pelas cepas PA103 e PA103Δ*exoU* por 1 e 3 horas, avaliada por RT-PCR. A expressão do gene constitutivo β actina foi utilizada para normalizar a expressão do gene em estudo. **(A)** Figuras ilustrativas dos géis de agarose mostrando os amplicons do FT e β actina. **(B)** Histograma representativo dos resultados da normalização da expressão do mRNA do FT, quantificada por densitometria, pela expressão do mRNA da β actina. Os dados representam as médias ± SEM dos resultados obtidos em 3 experimentos. *, $p<0,05$ quando células infectadas com PA103 foram comparadas com células não infectadas.

2. A produção de ExoU não interferiu na expressão da proteína FT

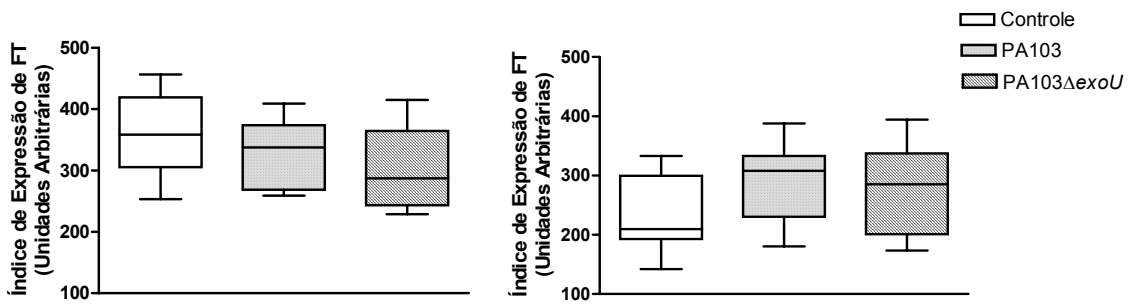
Células endoteliais controle e infectadas pelas duas cepas bacterianas por 3 e 6 horas foram comparadas quanto à expressão de FT por citometria de fluxo e microscopia confocal.

Os resultados apresentados nas figuras 12A mostraram que, nas condições de cultivo utilizadas, as células endoteliais da linhagem HMEC-1 não permeabilizadas expressam FT. Mostraram, também, que nenhuma das duas cepas bacterianas foi capaz de alterar essa expressão.

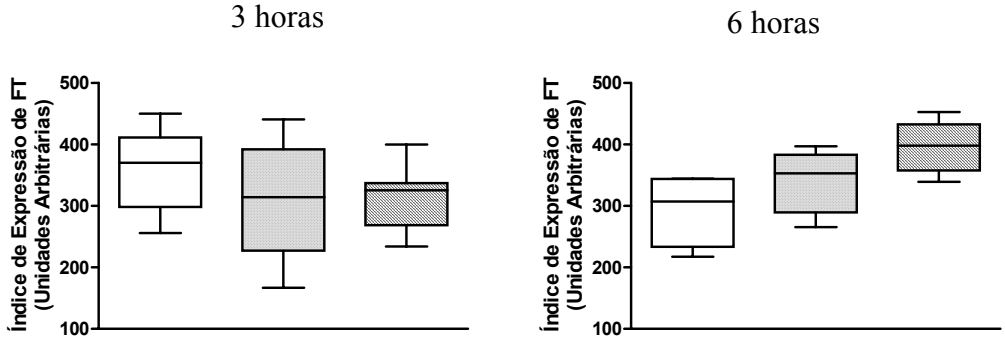
Estímulos infecciosos podem induzir a síntese de proteínas sem que, necessariamente, ocorra aumento de sua secreção. Nestes casos, as proteínas neossintetizadas permanecem nos estoques citoplasmático das células infectadas. Na tentativa de avaliarmos o efeito potencial de ExoU na modulação da síntese do FT, pesquisamos sua presença no citoplasma de células endoteliais previamente permeabilizadas, para permitir a reação dos anticorpos específicos com as moléculas de FT presentes nos estoques citoplasmáticos, além de com aquelas expressas nas superfícies celulares. Os resultados apresentados na figura 12B mostram a ausência de efeito significativo da toxina, ou da infecção bacteriana, na expressão total (superfície + citoplasmática) de FT por células da linhagem HMEC-1.

A fotomicrografia apresentada na figura 12C ilustra e corrobora os resultados apresentados nas figura 12 A e B.

A Expressão de FT em células endoteliais não permeabilizadas após infecção por:



B Expressão de FT em células endoteliais permeabilizadas após infecção por:



C

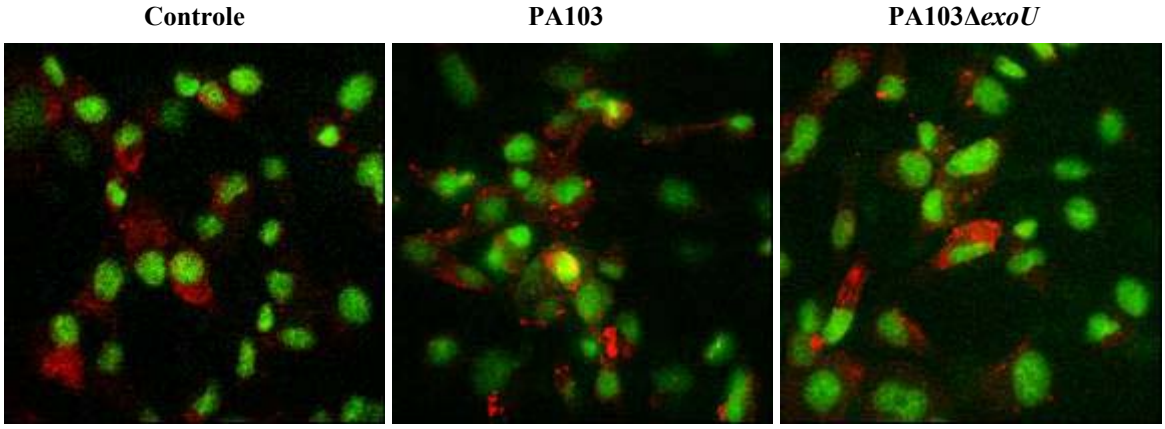


Figura 12: Expressão de FT em células endoteliais não permeabilizadas **(A)** ou permeabilizadas **(B)** controle e após 3 ou 6 horas de infecção, detectada através de citometria de fluxo. As colunas delimitam 25 e 75% dos valores encontrados, as barras delimitam os valores extremos e o traço no interior das colunas informa a mediana dos resultados obtidos em 4 experimentos realizados em triplicata. **(C)** Fotomicrografia obtida com microscópio confocal mostrando a expressão de FT em células controle ou infectadas por *P. aeruginosa* por 3 horas e não permeabilizadas antes da imunomarcação. Em verde, o núcleo das células e, em vermelho, o FT (pseudo cor).

3. *P. aeruginosa* contribuiu para o aumento na expressão de FvW em células endoteliais, mas não teve efeito sobre a transcrição gênica

É conhecido que células endoteliais expressam constitutivamente FvW, estocado nos corpúsculos de Weibel-Palade. Os resultados apresentados na figura 13A mostram a presença de FvW nas células endoteliais da linhagem HMEC-1 não infectadas e não permeabilizadas. Mostram, ainda, que a infecção por 6 e 20 horas, pelas duas cepas bacterianas, resultou no aumento significativo da expressão de FvW, quando células infectadas foram comparadas com as controle. Embora nas culturas infectadas pela cepa selvagem por 6 horas o percentual de células com marcação positiva frente ao anticorpo anti-FvW tenha sido superior ao percentual detectado nas culturas infectadas pela cepa mutante, essa diferença não foi estatisticamente significativa. Nenhum efeito significativo da infecção foi observado em células infectadas e permeabilizadas com triton X-100, antes da imunomarcação com o anticorpo anti-FvW (figura 13B).

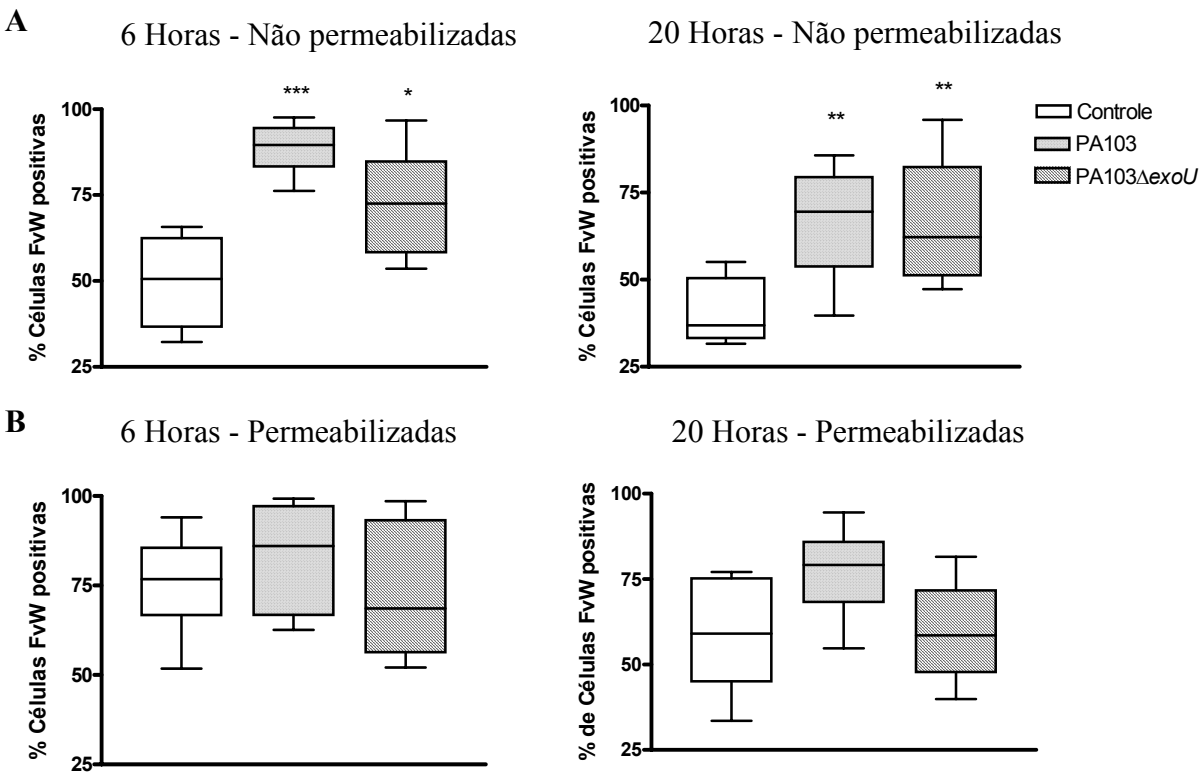


Figura 13: Expressão de FvW em células endoteliais não permeabilizadas **(A)** ou permeabilizadas **(B)**, infectadas ou não, detectada por citometria de fluxo. As colunas delimitam 25 e 75% dos valores encontrados, as barras delimitam os valores extremos e o traço no interior das colunas informa a mediana dos resultados obtidos em 4 experimentos realizados em triplicata. *, p<0,05, **, p<0,01, ***, p<0,001 quando células infectadas foram comparadas com células não infectadas.

A figura 14 apresenta fotomicrografias de células endoteliais controle e infectadas por 6 horas, não permeabilizadas, marcadas com anticorpo anti-FvW, obtidas com microscópio confocal. As figuras A-C correspondem ao plano inferior das células, em contato com as lamínulas. As figuras D-F correspondem ao plano médio enquanto as figuras G-I correspondem ao plano superior. Finalmente, as figuras J-L representam o somatório da marcação de todos os planos celulares. Nestas fotomicrografias merecem destaque: i) a presença de marcação puntiforme apenas nas lamínulas em que foram cultivadas as células infectadas com a cepa produtora de ExoU (asteriscos) (K), sugestiva da presença de FvW relargado das células e aderente à superfície suporte; ii) a marcação de FvW no citoplasma das células controle e infectadas (D-F), apesar da imunomarcação não ter sido precedida pela permeabilização das células; iii) a maior expressão de FvW nas células infectadas pela cepa PA103 (K) e iv) a heterogeneidade da marcação das células infectadas com a cepa mutante (L) vista pela observação da presença de células com marcação intensa (seta sólida) ao lado de outras pouco marcadas (seta tracejada).

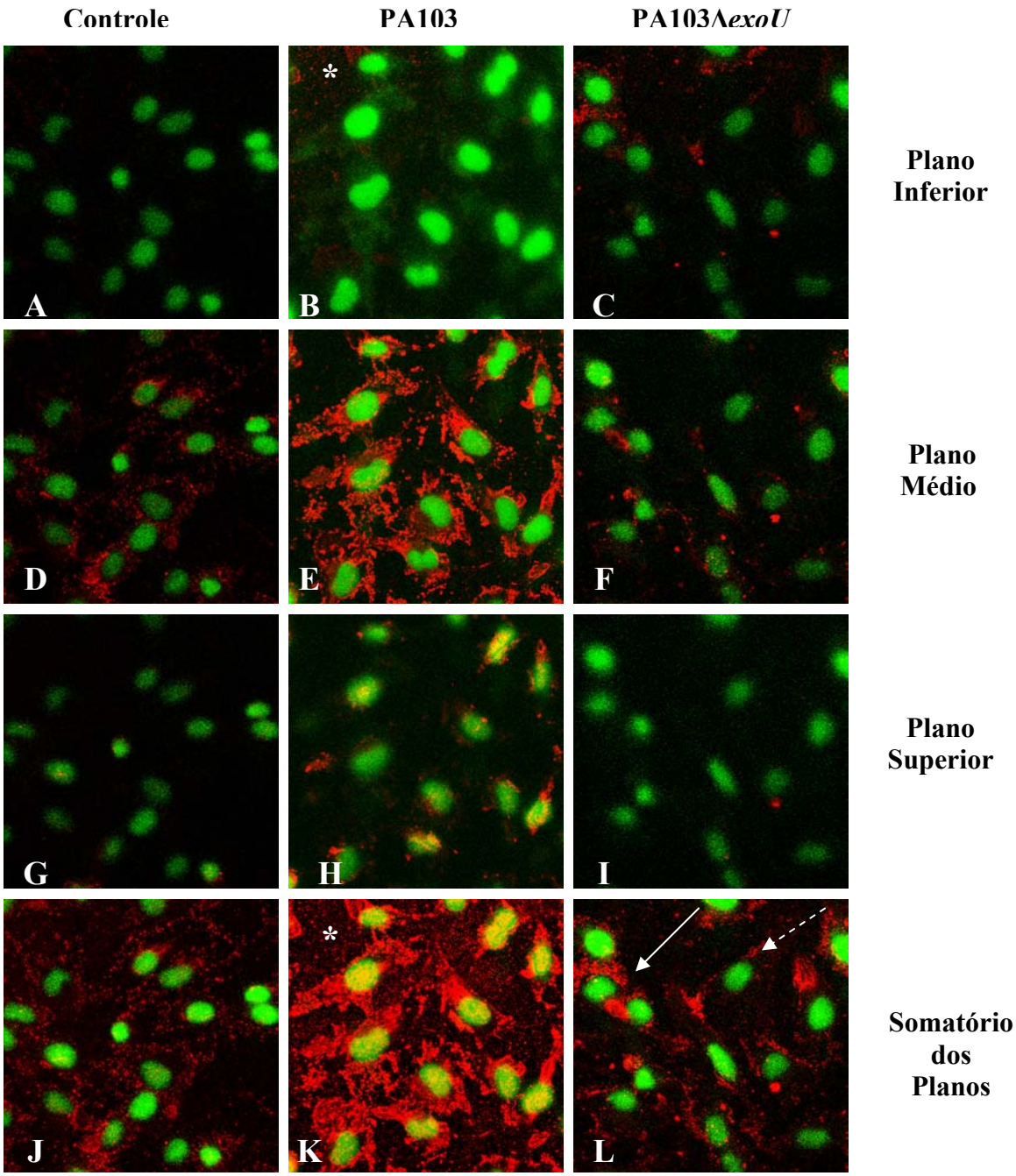


Figura 14: Fotomicrografias obtidas com microscópio confocal, mostrando a expressão do FvW (marcado em vermelho; pseudo cor) em células controle e infectadas pelas duas cepas bacterianas por 6 horas, não permeabilizadas. Em verde, os núcleos das células marcados com DAPI (pseudo cor). Os asteriscos em B e K correspondem a sítios da lamínula com marcação positiva para FvW enquanto as setas em L apontam para células com muita e pouca expressão do FvW.

Os dados obtidos com a citometria de fluxo e com a microscopia confocal sugerem a indução, por *P. aeruginosa,* de maior expressão de FvW pelas células infectadas, mas não esclarecem se houve modulação da transcrição gênica, o que nos motivou a pesquisar o nível

do mRNA do FvW em HMEC-1. A ausência de diferenças entre células controle e infectadas por 3 horas nos resultados do RT-PCR mostrou a inexistência de modulação gênica induzida pelas cepas bacterianas ou por ExoU, em particular (figura 15).

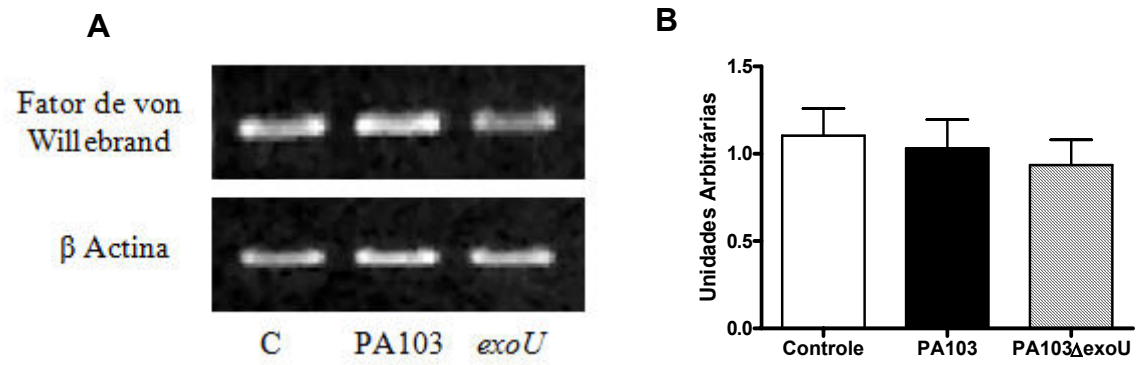


Figura 15: Expressão do mRNA do fator de von Willebrand em células endoteliais controle (C) e infectadas pelas cepas PA103 e PA103Δ*exoU*, por 3 horas, avaliada por RT-PCR. A expressão do gene constitutivo β actina foi utilizada para normalizar a expressão do gene em estudo. **(A)** Figuras ilustrativas das bandas obtidas nos géis. **(B)** Histograma representativo dos resultados da normalização da expressão do mRNA do FvW, quantificada por densitometria, pela expressão do mRNA da β actina. Os dados representam as médias ± SEM dos resultados obtidos em 3 experimentos.

4. Efeito de ExoU na liberação do FvW para o meio extracelular

In vivo, o FvW é secretado pelas células endoteliais para o plasma de forma constitutiva e essa exocitose tem efeito protetor sobre o fator VIII da coagulação, evitando sua clivagem (Zaverio *et al*., 2003). O FvW circulante tem também grande afinidade pelo colágeno da matriz subendotelial, a que adere prontamente, quando ocorrem lesões no endotélio, dando início à agregação de plaquetas e formação do trombo plaquetário (Varga-Szabo *et al*., 2008). Como a infecção bacteriana modulou positivamente a expressão do FvW, acreditávamos encontrar, também, concentrações aumentadas do FvW tanto no sobrenadante quanto na matriz extracelular produzida por estas células. Resultados preliminares obtidos em dois ensaios realizados em duplicata sugerem a veracidade de nossa hipótese, já que os níveis de FvW detectados no sobrenadante de células infectadas por PA103 foram superiores aos detectados no sobrenadante das culturas infectadas pela cepa mutante, embora a diferença não tenha sido estatisticamente significativa (figura 16).

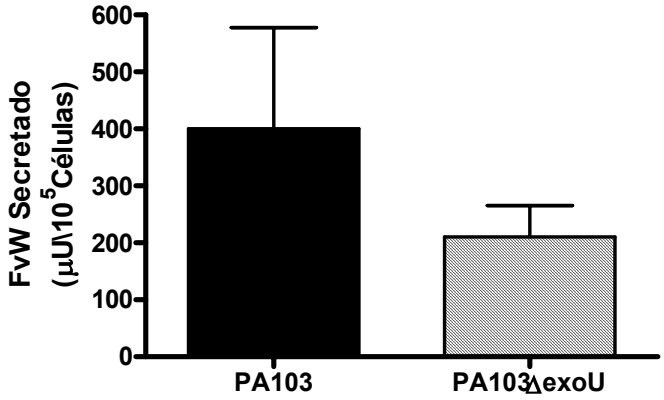


Figura 16: Níveis de FvW detectados nos sobrenadantes de culturas celulares infectadas por PA103 ou PA103Δ*exoU*. Os dados representam as médias ± SEM dos resultados obtidos em 2 experimentos realizados em duplicata.

Quanto à presença de FvW associado à matriz subendotelial, não foram detectadas diferenças estatisticamente significativas entre culturas controle ou infectadas pelas duas cepas, apesar de haver uma tendência de maior expressão de FvW na matriz de células infectadas pelas duas cepas que na matriz de células não infectadas (figura 17).

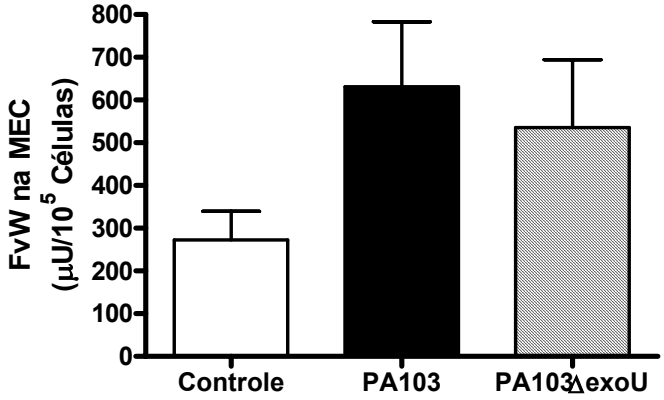


Figura 17: Níveis de FvW presente na matriz extracelular de células não infectadas ou infectadas. Os dados obtidos representam as médias ± SEM dos resultados obtidos em 4 experimentos realizados em quadruplicata.

5. Culturas infectadas pela cepa produtora de ExoU, expostas a suspensões de plaquetas, apresentaram maior percentual de células com plaquetas aderentes

Uma das funções de FvW é ligar-se às plaquetas, favorecendo sua agregação e a estabilização do trombo plaquetário. Uma vez detectada a modulação positiva da expressão de

FvW na superfície de células infectadas, avaliamos a funcionalidade desta proteína através da comparação da aderência de plaquetas a células não infectadas ou infectadas pelas duas cepas bacterianas.

Culturas infectadas pela cepa selvagem, PA103, apresentaram um percentual de células com plaquetas aderentes significativamente superior ao detectado em culturas não infectadas ou infectadas pela cepa mutante, após incubação dos dois tipos celulares (células endoteliais e plaquetas) sob condições estáticas (figura 18A) ou após a perfusão da suspensão de plaquetas sobre as células endoteliais (figura 18B), para simular o fluxo sanguíneo.

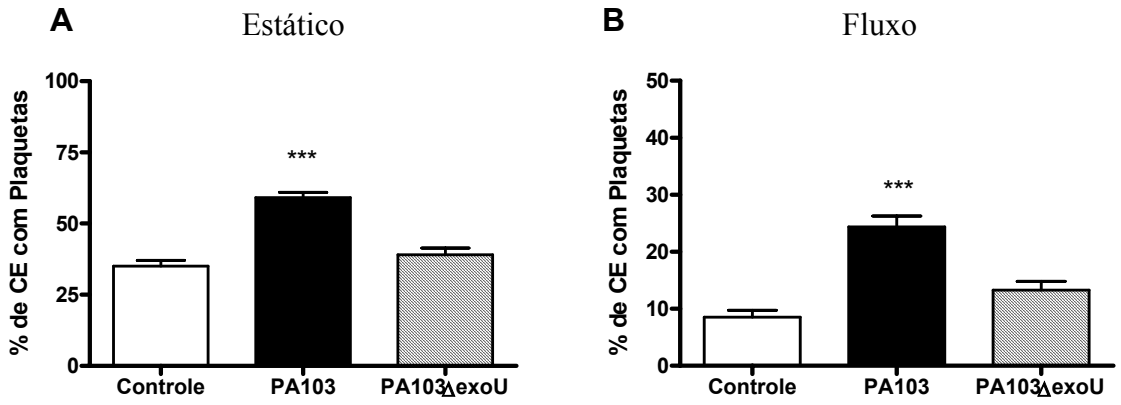


Figura 18: Percentual de células endoteliais com plaquetas aderentes após incubação dos dois tipos celulares sob condições estáticas **(A)** ou após perfusão das plaquetas sobre as células endoteliais **(B).** Os dados representam as médias ± SEM dos resultados obtidos em 2 experimentos realizados em triplicata. ***, $p<0,001$ quando culturas infectadas pela cepa selvagem foram comparadas com culturas não infectadas ou infectadas pela cepa mutante.

A figura 19 ilustra o resultado descrito acima e mostra a presença de pequenos grumos plaquetários associados às células infectadas pela cepa selvagem, grumos estes não detectados nos outros dois tipos de cultura.

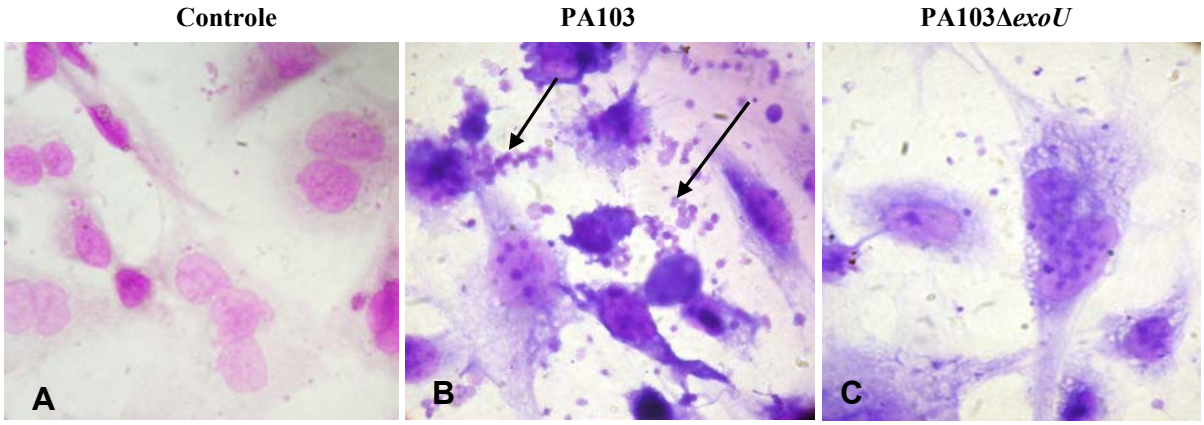


Figura 19: Fotomicrografias obtidas em microscópio óptico mostrando a presença de plaquetas aderentes às células endoteliais, após incubação dos dois tipos celulares em condições estáticas. Note, em **B**, a presença de pequenos grumos de plaquetas (setas), ausentes em **A** e **C**.

6. ExoU induziu aumento no número de MPs liberadas pelas células endoteliais e no percentual de MPs com expressão de FT ou FvW

Células endoteliais são conhecidas por liberar MPs após ativação ou quando em apoptose. Resultados anteriores obtidos em nosso laboratório, mostrando a indução, por ExoU, da apoptose de células endoteliais, em decorrência do estresse oxidativo gerado pelo acúmulo de ácido araquidônico livre (Saliba *et al.*, 2005), nos levaram à pesquisa da capacidade de ExoU de induzir a liberação de MPs. Além disso, os resultados obtidos no presente estudo, sobre a expressão de FT e FvW na superfície de células HMEC-1, nos levaram à pesquisa da expressão destas proteínas na MPs liberadas.

A figura 20A mostra claramente que células infectadas pela cepa PA103, produtora de ExoU, liberam mais MPs que células não infectadas ou infectadas pela cepa não produtora, mostrando a participação de ExoU neste fenômeno. Mostra, também, que o percentual de MPs liberadas por células infectadas pela cepa PA103 com expressão de FT ou FvW em suas superfícies é superior ao percentual liberado de células não infectadas ou infectadas pela cepa mutante (figura 20 B e C, respectivamente).

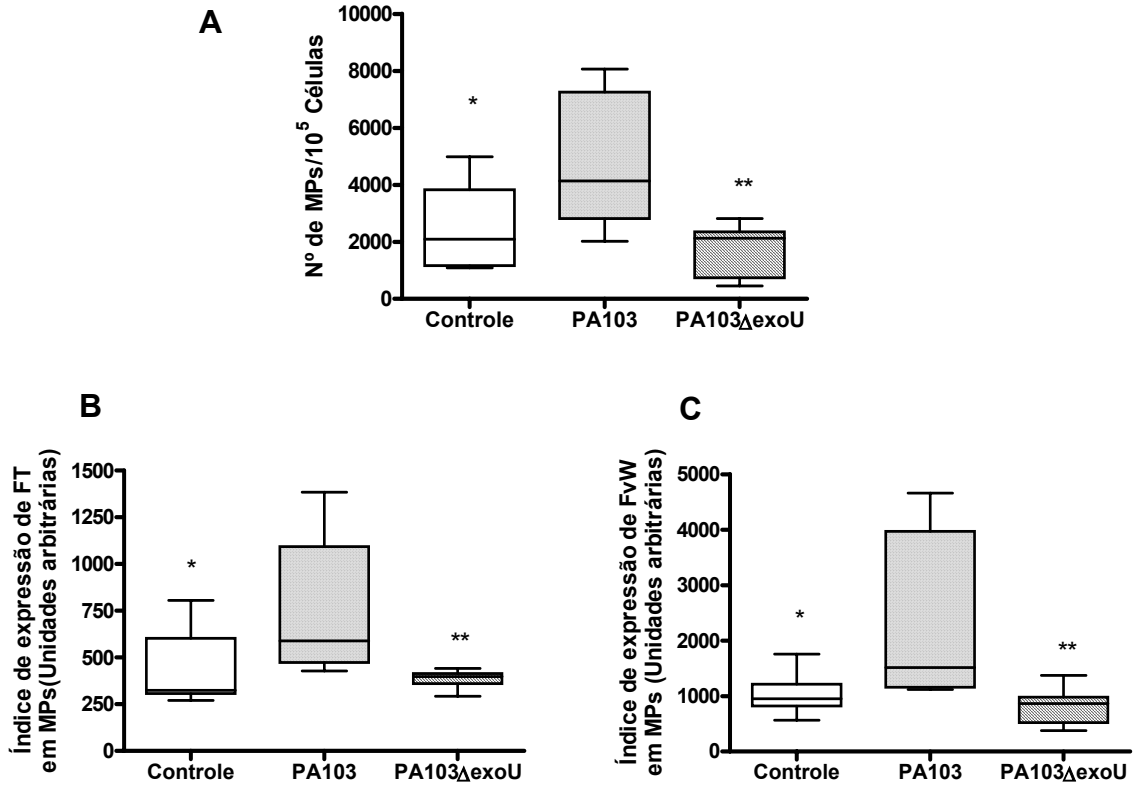


Figura 20: Liberação de micropartículas por células endoteliais, detectados através de citometria de fluxo. **(A)** Número de MPs liberadas por células não infectadas ou infectadas. **(B)** Micropartículas com expressão de FT ou **(C)** de fator de von Willebrand. As colunas delimitam 25 e 75% dos valores encontrados, as barras delimitam os valores extremos e o traço no interior das colunas informa a mediana dos resultados obtidos em 3 experimentos realizados em triplicata. *, $p<0,05$, **, $p<0,01$ quando células não infectadas e infectadas por PA103Δ*exoU* foram comparadas com células infectadas por PA103.

DISCUSSÃO

Em infecções graves, como a sepse, os sistemas de coagulação e fibrinólise são alvo de modulação por parte de bactérias ou produtos bacterianos. Esses sistemas são normalmente ativados após lesão tecidual e/ou dos vasos sanguíneos e o desequilíbrio entre eles pode ter como consequência alterações coagulatórias graves.

A geração do trombo ao fim da cascata de coagulação pode ter consequências positivas e negativas tanto para o hospedeiro quanto para os patógenos. A formação da rede de fibrina no sítio da infecção favorece o hospedeiro porque o confinamento dos patógenos nos trombos tende a diminuir a magnitude da disseminação bacteriana. Por outro lado, pode beneficiar os patógenos por protegê-los de mecanismos de defesa do hospedeiro, como a fagocitose e a ação de proteínas do complemento ou anticorpos. Além disso, dentro do coágulo, os microrganismos continuam a proliferar.

Pouco se sabe sobre a interferência de *P. aeruginosa* nas vias de coagulação e fibrinólise. Trabalhos publicados na década de 90 sugeriram o envolvimento de proteases extracelulares desta bactéria na ativação de plasminogênio e geração de plasmina (Ullberg *et al*., 1990; Engel *et al*., 1998), uma proteína chave do sistema fibrinolítico. Em estudo comparativo da aderência ao plasminogênio, da Silva *et al.* (2004) mostraram que isolados clínicos procedentes do sangue de pacientes com bacteremia e de fezes de portadores assintomáticos apresentaram índices similares de aderência ao plasminogênio. Mostraram, também, a ativação do plasminogênio associado às células bacterianas em plasmina e a participação da plasmina no aumento significativo da capacidade dos microrganismos de invadir géis de fibrina e uma membrana basal reconstituída. Os autores sugeriram que a capacidade de *P. aeruginosa* de capturar o plasminogênio confere vantagens para a invasividade dos microrganismos através das barreiras tissulares do hospedeiro.

Além da possibilidade de modulação do sistema fibrinolítico por *P. aeruginosa,* estudos recentemente realizados em nosso laboratório mostraram o envolvimento de *P. aeruginosa,* dependente da produção de ExoU, na atividade protrombogênica de células epiteliais respiratórias, em decorrência da modulação positiva da expressão de FT (Plotkowski *et al*., 2008b).

Sabe-se que as cepas de *P. aeruginosa* produtoras de ExoU, uma das toxinas do sistema de secreção do tipo III, são particularmente capazes de induzir choque séptico em modelos de infecção pulmonar (Kurahashi *et al.*, 1999; Allewelt *et al*, 2000). Entre as cepas

estudadas, PA103, é conhecida por sua citotoxicidade e virulência. Estudos realizados em nosso laboratório mostraram o envolvimento da cepa PA103, e de ExoU em particular, na patogênese da pneumosepse em modelo experimental murino (Machado, 2007). No entanto, em nenhum estudo foi pesquisado o efeito de ExoU sobre células endoteliais, apesar do papel central destas células no controle de fenômenos hemostáticos e na patogênese da sepse. Nesse sentido, este trabalho visou pesquisar a participação de *P. aeruginosa* e ExoU nos fenômenos trombóticos através do estudo da modulação de duas moléculas que participam de eventos essenciais à coagulação, FT e FvW, em células do endotélio de microcapilares humanos. A escolha de células de capilares para alvo de nosso estudo decorreu da certeza da maior probabilidade de interação de microrganismos com estes tipos celulares, *in vivo*, que com células de vasos sanguíneos de grande calibre.

Sendo FT o principal iniciador da via extrínseca da coagulação, e o leito da microvasculatura um dos locais de formação do trombo, muito nos surpreendeu o fato de *P. aeruginosa* não modular a expressão dessa proteína em células endoteliais. Esses resultados vão de encontro ao relato recente, por nosso laboratório, do aumento, dependente de ExoU, da expressão de FT em células epiteliais respiratórias humanas (Plotkowski *et al*., 2008b). Além disso, a literatura já demonstrou a modulação da expressão de FT em células endoteliais por bactérias Gram positivas, como *S. aureus* (Veltrop *et al*., 1999), *Streptococcus pyogenes* (Bryant *et al.,* 2003), e Gram negativas, como *Haemophilus somnus* (Behling-Kelly *et al*., 2007), além de outros patógenos como *C. pneumoniae* (Ettelaie *et al*., 2007), fungos (Lopes Bezerra e Filler, 2004) e vírus (Jiang *et al.*, 2007).

Apesar da ausência de alteração na expressão da proteína, ExoU foi capaz de aumentar os níveis de RNA mensageiro de FT em células endoteliais infectadas por 1 hora. É possível que a ausência de aumento da tradução da proteína, apesar do aumento da transcrição gênica, tenha sido decorrente da atividade inibitória de produto(s) liberado(s) pelas células hospedeiras em resposta à infecção. Outra hipótese, formulada com base em nosso achado da maior liberação de MPs contendo FT em suas membranas por células infectadas pela cepa PA103, é que ExoU tenha, efetivamente, modulado positivamente a expressão de FT mas este aumento não foi detectado nas células porque as proteínas sintetizadas foram liberadas, ancoradas nas membranas das MPs.

Os resultados encontrados quanto à outra molécula envolvida na coagulação e também objeto deste estudo, FvW, foram bem diferentes. Vimos que a infecção pelas cepas de *P. aeruginosa* produtora e não produtora de ExoU induziu aumento da expressão de FvW nas células endoteliais, mas não modificou a transcrição gênica.

No início de nosso estudo, a pesquisa comparativa da expressão do FvW em células endoteliais permeabilizadas com triton X100 ou não permeabilizadas visava discriminar se o aumento da expressão do FvW era decorrente do aumento na síntese da proteína ou apenas de sua maior expressão nas membranas plasmáticas. Se ocorresse aumento de síntese, não acompanhado da maior exteriorização das proteínas, esperávamos encontrar maior expressão apenas nas células permeabilizadas. Ao contrário, se ocorresse apenas aumento da exteriorização, o esperado seria a maior expressão apenas nas células não permeabilizadas. Com base neste raciocínio, nossos resultados relativos à expressão do FvW obtidos por citometria de fluxo, associados àqueles obtidos por RT-PCR, sugeririam que *P. aeruginosa* altera cascata(s) de sinalização intracelular que culminam com a exocitose de FvW de seus estoques citoplasmáticos para a membrana celular, mas essa(s) cascata(s) não ativa (ativam) fatores transcricionais responsáveis pela transcrição ou repressão de genes para que houvesse neosíntese da proteína. O raciocínio descrito, no entanto, foi perturbado pela visualização, na microscopia confocal, de marcação citoplasmática em células não permeabilizadas, marcação esta muito mais intensa em células infectadas pela cepa produtora de ExoU.

É sabido que ExoU é capaz de aumentar a concentração de cálcio citoplasmático em células de epitélio respiratório (Jacob *et al*., 2002). Como o aumento de cálcio é a via de indução da exocitose de FvW que ocorre para boa parte dos agonistas (a outra via é a do AMPc) (revisado por Rondaij *et al*., 2006), esperávamos um aumento da expressão de FvW em células infectadas pela cepa bacteriana produtora de ExoU. De fato este aumento foi detectado, por citometria de fluxo, em células não permeabilizadas após 6 horas de infecção, e foi documentado nas fotografias obtidas em microscópio confocal.

ExoU também modulou positivamente a expressão de FvW, além de FT, em MPs. Esta observação, associada à detecção de número aumentado de MPs liberadas por células infectadas, demonstra o potencial protrombótico da toxina de *P. aeruginosa*. Isso porque, além da presença destas duas moléculas muito importantes para a coagulação, MPs contém fosfatidilserina em sua superfície, o que favorece a reunião e ativação dos fatores de coagulação. Além disso, resíduos de fosfatidilserina também tem outra importante função: a de promover a fusão de membranas em processos fisiológicos, como aqueles que culminarão na fertilização de óvulos, bem como em processos patológicos, com a fusão do envelope do vírus HIV (que é rico em fosfatidilserina) com as membranas de suas células alvo. Nesse sentido, del Conde *et al*. (2005) mostraram a participação de resíduos de fosfatidilserina na fusão de MPs contendo FT às membranas de plaquetas ativadas, fusão esta que resultou na expressão de FT pelas plaquetas.

Nieuwland *et al* (2000) mostraram, no plasma de pacientes com coagulação intravascular disseminada, uma síndrome clínica que pode ocorrer no curso da sepse, a presença de grande número de MPs contendo FT. Mostraram, também, que essas MPs eram funcionais na medida em que possibilitaram a geração de trombina. Com base nestes resultados, sugeriram que a patogênese da coagulação intravascular disseminada está fortemente ligada à circulação de MPs contendo FT. É possível que MPs contendo FT também participem da patogênese de episódios de ativação excessiva da coagulação observados em outras patologias.

A participação de MPs, liberadas de células endoteliais, contendo FvW na formação do trombo plaquetário foi documentada em outros estudos. Jy *et al*. (2005) mostraram seu envolvimento na agregação plaquetária e no aumento da estabilidade dos agregados assim formados, em decorrência da presença, na superfície das MPs, de outras moléculas adesivas, como ICAM-1, VCAM-1, E-selectina, P-selectina, PECAM-1 ou receptor de vitronectina, que podem contribuir para a interação entre MPs endoteliais e plaquetas.

Os resultados de Jy e colaboradores mostram ser urgente o estudo dos possíveis papéis funcionais das MPs encontradas em nosso trabalho, bem como da participação do FvW e de outras moléculas superficiais por elas carreadas em fenômenos trombóticos e inflamatórios, entre outros.

Em nosso trabalho, observamos que a liberação de FvW para o meio extracelular, por células endoteliais da linhagem HMEC-1, é fraca uma vez que suas concentrações, tanto nos sobrenadantes quanto na matriz extracelular, foram baixas. Estes resultados estão de acordo com os de Ribeiro *et al.* (1995) que compararam a expressão de FvW em HMEC- 1 e em células endoteliais das veias de cordões umbilicais humanos (HUVEC) *in vitro*. Ribeiro e colaboradores mostraram que células da linhagem HMEC-1 liberam muito menos FvW em seus sobrenadantes que HUVECs. Cabe ressaltar que a metodologia em nosso estudo foi similar à descrita pelos autores: dosagem de FvW por ELISA, utilização de grande número de células cultivadas por períodos prolongados e concentração dos sobrenadantes das culturas. Ao contrário de nossos resultados e dos de Ribeiro *et al.* (1995), Bonnefoy *et al.*(2001), ao utilizar metodologia distinta para comparar a produção de FvW pelos mesmos tipos celulares, não encontraram FvW nos sobrenadantes nem na matriz subendotelial de HMEC-1, mas sim nos de HUVECs.

A baixa concentração de FvW no meio extracelular de culturas de HMEC-1 poderia ser explicada pela baixa expressão da proteína pelas células, o que nossos resultados mostraram não ser verdadeiro. Outra possível explicação seria a de que as proteínas

secretadas ficariam ancoradas nas membranas celulares, devido à redução na atividade da enzima responsável por clivar os multímeros de FvW, ADAMTS-13 (Dong *et al.,* 2002). Trabalhos de Ruiz-Torres *et al* (2005) sugerem que a linhagem de célula endotelial utilizada em nosso trabalho, HMEC-1, é deficiente de ADAMTS-13. Em nosso trabalho, não pesquisamos a modulação da produção desta enzima nem de sua atividade por ExoU ou *P. aeruginosa*, embora este seja um assunto que merece ser estudado.

Não está claro na literatura se o FvW encontrado na matriz subendotelial é derivado da síntese local pelo endotélio, se decorre da deposição do FvW presente no plasma ou daquele liberado por plaquetas. No nosso modelo, pela ausência de plasma ou plaquetas, concluímos que, apesar de em baixas quantidades, HMEC-1 secreta FvW para o meio e para sua matriz extracelular.

Ainda em relação à discordância entre as concentrações de FvW no sobrenadante de culturas de HMEC-1 e HUVEC, cabe lembrar os estudos de Yamamoto *et al.* (1998), realizados com tecidos animais, que mostraram que o FvW não é igualmente expresso em todos os tipos de células endoteliais. Pesquisando a expressão do mRNA e da proteína FvW, os autores mostraram que existem níveis significativamente maiores, tanto do mRNA quanto da proteína, em células endoteliais de vasos de grande calibre quando comparados com microvasos, assim como maiores níveis em células de veias que de artérias. Yamamoto *et al.* (1998) também mostraram a heterogeneidade na expressão de FvW em diferentes órgãos murinos. Estes resultados podem refletir a adaptação local de células endoteliais para realizar distintas funções em tecidos específicos ou pode resultar de diferenças nas condições ambientais locais (isto é, fluxo, pressão sanguínea e oxigenação) que alteram os padrões de expressão gênica de células endoteliais.

Apesar de conscientes de que, em sua imensa maioria, as informações disponíveis sobre a exocitose de FvW foram obtidas em estudos em que foram utilizadas células endoteliais de veias de grande calibre, como as HUVECs (Bernardo *et al*., 2004; Visher *et al*., 1995; Zarei *et al*., 2006), nosso modelo experimental pretendeu simular os sítios de ocorrência da maioria dos fenômenos trombóticos detectados na sepse, qual seja, a microvasculatura.

Estudos realizados por Rahbar *et al*. (2005) mostraram o aumento da adesão plaquetária dependente de FvW a células endoteliais infectadas por citomegalovírus mas, que seja de nosso conhecimento, nada se conhece sobre a capacidade de *P. aeruginosa* de induzir essa capacidade adesiva. Com a detecção da presença de FvW associado às HMEC-1, avaliamos sua funcionalidade através da pesquisa da adesão de plaquetas em condições

estáticas ou sob fluxo. Observamos um aumento do percentual de plaquetas associadas à células infectadas pela cepa produtora de ExoU em ambas as situações (estática e fluxo), mostrando que o FvW expresso em células endoteliais após ativação pela infecção é capaz de suportar a adesão plaquetária.

Quando algum estímulo induz a exocitose de FvW dos corpúsculos de Weibel-Palade, outras moléculas estocadas neste grânulos citoplasmáticos, como a P-selectina, são também liberadas. P-selectina é uma proteína de membrana envolvida na adesão de neutrófilos (Lowenstein *et al*., 2005) normalmente presente nos corpúsculos de Weibel-Palade e nos grânulos α de plaquetas. Além de ligar-se a seus contra-receptores presentes nas membranas de leucócitos, sítios de ligação para P-selectina também estão presentes nas membranas de plaquetas. Embora, em nosso estudo, não tenhamos pesquisado a modulação da expressão de P-selectina em células endoteliais infectadas por *P.* aeruginosa, não podemos descartar sua participação na aderência de plaquetas às células endoteliais.

O consenso atual sobre o envolvimento de FvW na adesão e posterior agregação plaquetária é de que FvW é indispensável para iniciar a adesão em situações de rápido fluxo sanguíneo. Já em uma velocidade reduzida, FvW é menos relevante pois outras moléculas adesivas como colágeno, fibronectina e fibrinogênio podem formar ligações capazes de suportar as forças hemodinâmicas (Ruggeri, 2003). Em nossos experimentos vimos que o percentual de plaquetas associadas a células HMEC-1 em condições de fluxo foi menor que em condições estáticas. Esse resultado nos levou a questionar a possível participação de outras moléculas adesivas na interação entre células endoteliais e plaquetas.

Em resumo, nosso dados sugerem que *Pseudomonas aeruginosa* e sua toxina ExoU podem regular fenômenos trombóticos em células endoteliais da microcirculação através da modulação da expressão do FvW.

CONCLUSÕES

- *P. aeruginosa* e ExoU não foram capazes de modular a expressão de fator tissular em células endoteliais da linhagem HMEC-1;
- Apesar da não alteração na expressão da proteína, ExoU foi capaz de aumentar os níveis de mRNA de FT;
- *P. aeruginosa* aumentou a expressão de fator de von Willebrand em células endoteliais;
- Nenhuma das cepas bacterianas utilizadas foi capaz de alterar a expressão do mRNA de FvW, mostrando a participação de *P. aeruginosa* na síntese e exocitose de FvW e não na transcrição gênica;
- ExoU foi determinante no aumento do número de MPs liberadas por HMECs;
- ExoU também foi determinante na expressão de FT e de FvW na superfície das MPs, sugerindo o potencial dessas MPs de envolverem-se em fenômenos trombóticos;
- Apesar de em baixas quantidades, HMEC-1 secreta FvW para o meio e para sua matriz extracelular;
- Células endoteliais com maior expressão de FvW apresentaram, também, maiores índices de adesão plaquetária sugerindo a existência de relação causal entre estes dois fenômenos e a funcionalidade do FvW exocitado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ades EW, Candal FJ, Swerlick RA, George VG, Summers S, Bosse DC, Lawley TJ. HMEC-1: Establishment of an immortalized human microvascular endothelial cell line. J Invest Dermatol 1992; 99: 683-690.

Aird WC. Vascular bed-specific hemostasis: role of endothelium in sepsis pathogenesis. Crit Care Med 2001; 29: S28-S35.

Aird WC. Endothelial cell heterogeneity. Crit Care Med 2003a; 31: S221-S230.

Aird WC. The role of the endothelium in severe sepsis and multiple organ dysfunction syndrome. Blood 2003b; 101: 3765-3777.

Alleewelt M, Coleman FT, Grout M, Priebe GP, Pier GB. Acquisition of expression of the *Pseudomonas aeruginosa* ExoU cytotoxin leads to increased bacterial virulence in a murine model of acute pneumonia and systemic spread. Infect Immun 2000; 68(7): 3998-4004.

Aras O, Shet A, Bach RR, Hysjulien JL, Slungaard A, Hebbel RP, Escolar G, Jilma B, Key NS. Induction of microparticles- and cell-associated intravascular tissue factor in human endotoxemia. Blood 2004; 103: 4545-4553.

Assis MC, Costa AO, Barja-Fidalgo TC, Plotkowski MC. Human endothelial cells are activated by INF-γ plus TNF-α to kill intracellular *Pseudomonas aeruginosa*. Immunol 2000; 101: 271-278.

Assis MC, Saliba AM, Vidipó LA, Salles JB, Plotkowski MC. *Pseudomonas aeruginosa*-induced production of free radicals by INFγ plus TNFα-activated human endothelial cells: mechanism of host defense or of bacterial pathogenesis? Immunol Cell Biol 2004; 82: 383-392.

Assis MC, Freitas C, Saliba AM, Carvalho APD'A, Simão TA, Albano RM, Plotkowski MC. Up-regulation of Fas expression by *Pseudomonas aeruginosa*-infected endothelial cells depends on modulation of iNOS and enhanced production of NO induced by bacterial type III secreted proteins. Int J Mol Med 2006; 18(2):355-63.

Bea F, Puolakkainen MH, McMillen T, Hudson FN, Mackman N, Kuo CC, Campbell, Rosenfeld ME. *Chlamydia pneumoniae* induces tissue factor expression mouse macrophages via activation of Egr-1 and the MEK-ERK1/2 pathway. Circ Res 2003; 92: 394-401.

Behling-Kelly E, Kim KS, Czuprynski CJ. *Haemophilus somnus* activation of brain endothelial cells: potential fro local cytokine production and thrombosis in central nervous system infection. Thromb Haemost 2007; 98: 823-830.

Bernardo A, Ball C, Nolasco L, Moake JF, Dong JF. Effects of inflammatory cytokines on the release and cleavage of the endothelial cell-derived ultralarge von Willebrand factor multimers under flow. Blood 2004; 104: 100-106.

Berthelot P, Attree I, Plesiat P. Genotypic and phenotypic analysis of the type III secretion system in a cohort of *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia isolates: evidence for a possible association between O serotypes and exo genes. J Infect Dis 2003; 188: 512-518.

Bogdanov VY, Balasubramanian V, Hathcock J, Vele O, Lieb M, Nemerson Y. Alternatively spliced human tissue factor: a circulating, soluble, thrombogenic protein. Nat Med 2003; 9 (4): 458-462.

Bonnefoy A, Harsfalvi J, Pfliegler G, Fauvel-Lafève F, Legrand C. The subendothelium of the HMEC-1 cell line supports thrombus formation in the absence of von Willebrand factor and collagen types I, III and VI. Thromb Haemost 2001; 85:552-9.

Bryant AE, Hayes-Schroer SM, Stevens DL. M type 1 and 3 group A streptococci stimulate tissue factor-mediated procoagulant activity in human monocytes and endothelial cells. Infect Immun 2003; 71: 1903-1910.

Brown WJ, Chambers K, Doody A. Phospholipase A_2 (PLA_2) enzymes in membrane trafficking: mediators of membrane shape and function. Traffic 2003; 4: 214-221.

Cadroy Y, Dupouy D, Boneu B. Arachidonic acid enhances the tissue factor expression mononuclear cells by the cyclo-oxygenase-1 pathway: beneficial effects of n-3 fatty acids. J Immunol 1998; 160: 6145-6150.

Canobbio I, Bertoni A, Lova P, Paganini S, Hirsch E, Sinigaglia F, Balduini C, Torti M. Platelet activation by von Willebrand factor requires coordinated signaling through thromboxane A2 and Fc gamma IIA receptor. J Biol Chem 2001; 276(28): 26022-26029.

Cascata de coagulação [homepage na internet]. Acesso em 2009 Jan 9. Disponível em: http://www.wikipedia.com.br.

Cohen J. The immunopathogenesis of sepsis. Nature 2002; 885-891.

Dechend R, Maass M, Gieffers J, Dietz R, Scheidereit C, Leutz A, Gulba DC. *Chlamydia pneumoniae* infection of vascular smooth muscle and endothelial cells activates NF-

κB and induces tissue factor and PAI-1 expression: a potential link to accelerated arteriosclerosis. Circulat 1999; 100: 1369-1373.

del Conde I, Shrimpton CN, Thiagarajan P, López JA. Tissue-factor-bearing microvesicles arise from rafts and fuse with activated platelets to initiate coagulation. Blood 2005; 106: 1604-1611.

Diamant M, Tushuizen ME, Sturk A, Nieuwland R. Cellular microparticles: new players in the field of vascular disease? Eur J Clin Invest 2004; 34(6): 392-401.

Dong J, Moake JL, Nolasco L, Bernardo A, Arceneaux W, Shrimpton CN, Schade AJ, Mclntire LV, Fujikawa K, López JÁ. ADAMTS-13 rapidly cleaves newly secreted ultralarge von Willebrand factor multimers on the endothelial surface under flowing conditions. Blood 2002; 100: 4033-4039.

Engel LS, Hill JM, Caballero AR, Green LC, O'Callaghan RJ. Protease IV, a unique extracellular protease and virulence factor from *Pseudomonas aeruginosa*. J Biol Chem 1998; 273: 16792-16797.

Enouch DA, Birkett CI, Ludlam HA. Non-fermentative Gram-negative bacteria. Int J Antimicrob Agents 2007; 29(3): S33-S41.

Ettelaie C, Collier MEW, James NJ, Li C. Induction of tissue factor expression and release as microparticles in ECV304 cell line by *Chlamydia pneumoniae* infection. Atheroscler 2007; 190: 343-351.

Feltman H, Schulert G, Khan S, Jain M, Peterson L, Hauser AR. Prevalence of type III secretion genes in clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. Microbiol 2001; 147:2659–2669.

Francesconi M, Casonato A, Pontara E, Dalla Via L, Girolami A, Deana R. Type IIB von Willebrand factor induces phospholipase A2 activation and cytosolic Ca^{2+} increase in platelets. Biochem Biophys Res Commun 1995; 214(1): 102-9.

Gales, AC, Menezes, LC, Silbert, S & Sader, HS. Dissemination in distinct Brazilian regions of an epidemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM metallo-β-lactamase. J Antimicrob Chemother 2003; 52: 699-702.

Hauser AR, Cobb E, Bodí M, Mariscal D, Valle´s J, Engel JN, Rello J. Type III protein secretion is associated with poor clinical outcomes in patients with ventilator-associated pneumonia caused by *Pseudomonas aeruginosa*. Crit Care Med 2002; 30:521–528.

Jacob T, Lee RJ, Engel JN, Machen TE. Modulation of cytosolic Ca^{2+} concentration in airway epithelial cells by *Pseudomonas aeruginosa*. Infect Immun 2002; 70(11): 6399-408.

Jager A, van Hinsbergh VW, Kostense PJ. Von Willebrand factor, C-reactive protein, and 5-year mortality in diabetic and nondiabetic subjects: the Hoorn Study. Arterioscler Thromb Vasc Biol 1999; 19: 3071-3078.

Jiang Z, Tang X, Xiao R, Jiang L, Chen X. Dengue virus regulates the expression of hemostasis-related molecules in human vein endothelial cells. J Infect 2007; 55: 23-28.

Jy W, Jimenez JJ, Cheng PY, Mauro LM, Horstman LL, Ahn ER, Bidot CJ, Ahn YS. Endothelial microparticles (EMP) bind and complex with unusually-large multimers of von Willebrand factor (ULvWf) and act as potent inducers of platelet adhesion and aggregation. Blood 2004; 997A-998A.

Jy W, Jimenez JJ, Mauro LM, Horstman LL, Cheng P, Ahn ER, Bidot CJ, Ahn YS. Endothelial microparticles induce formation of platelet aggregates via a von Willebrand factor/ristocetin dependent pathway, rendering them resistant to dissociation. J Thromb Haemost 2005; 3: 1301-1308.

Kayal S, Jais JP, Aguini N, Chaudiere J, Labrousse J. Elevated circulating E-selectin, intercellular adhesion molecule 1, and von willebrand factor in patients with severe infection. Am J Respir Crit Care Med 1998; 157: 776-784.

Kurahashi K, Kajikawa O, Sawa T, Ohara M, Gropper MA, Frank DW, Martin TR, Wiener-Kronish JP. Pathogenesis of septic shock in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. J Clin Invest 1999; 104: 743–750.

Lee EJ, Cowell BA, Evans DJ, Fleiszig1 SMJ. Contribution of ExsA–regulated factors to corneal infection by cytotoxic and invasive *Pseudomonas aeruginosa* in a murine scarification model. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2003; 44: 3892-3898.

Levi M, de Jonge E, van de Poll T. Sepsis and disseminated intravascular coagulation. J Thromb and Thrombol 2003; 16(1/2): 43-47.

Levy GG, Nichols WC, Lian EC. Mutations in a member of the ADAMTS gene family cause thrombotic thrombocytopenic purpura. Nat 2001; 413: 488-494.

Leytin V, Mody M, Semple JW, Freedman J. Flow cytometric parameters for characterizing platelet activation. Biochem and Bioph Res Comm. 2000; 269: 85-90.

Liu L, Choi H, Bernardo A, Nolasco L, Ruan C, Moake JL, Dong JF. Platelet-derived vWF-cleaving metalloprotease ADAMTS-13. J Thromb Haemost 2005; 3(11): 2536-44.

Lopes Bezerra LM, Filler SG. Interactions of *Aspergillus fumigatus* with endothelial cells: internalization, injury, and stimulation of tissue factor activity. Blood 2004; 103: 2143-2149.

Lowenstein CJ, Morrell CN, Yamakuchi M. Regulation of Weibel-Palade boby exocytosis. Trends Cardiovasc Med 2005; 15: 302-308.

Machado GBS. ExoU, uma proteína do sistema de secreção do tipo III, contribui para a gravidade da pneumosepse por *Pseudomonas aeruginosa* em camundongos [Dissertação]. Rio de Janeiro: Universidade do Estado do Rio de Janeiro; 2007.

Matsushita K, Morrell CN, Mason RJ. Hydrogen peroxide regulation of endothelial exocytosis by inhibition of N-ethylmaleimide sensitive factor. J Cell Biol 2005; 170: 73-79.

McEntegart A, Capell HA, Creran D, Rumley A, Woodward M, Lowe GD. Cardiovascular risk factors, including thrombotic variables, in a population with rheumatoid arthritis. Rheumatol 2001; 40: 640-644.

Morel N, Morel O, Delabranche X, Jesel L, Sztark F, Dabadie P, Freyssinet JM, Toti F. Microparticules circulantes au cours des traumatisms graves et des sepsis: un element du couplage inflammation-thrombose. Ann Fr Anesth Reanim 2006; 25: 955-966.

Nielsen NE, Siegbahn A, Swahn E. Markers of hypercoagulation and von Willebrand factor in postmenopausal women with unstable coronary artery disease. Discriminatory ability regarding unstable coronary artery disease and coronary atherosclerosis using receiver operating characteristics. J Inter Med 2000; 248: 151-158.

Nieuwland R, Berckmans RJ, McGregor S, Böing AN, Romijn FPHTM, Westendorp RGJ, Hack CE, Sturk A. Cellular origin and procoagulante properties of microparticles in meningococcal sepsis. Blood 2000; 95: 930-935.

Nouér SA, Nucci M, de-Oliveira MP, Pellegrino FLPC, Moreira BM. Risk factors for acquisition of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing-SPM metallo-β-lactamase. Antimicrob Agents Chemother 2005; 49: 3663-3667.

Pendu R, Terrauble V, Christophe OD, Gahmberg CG, Grool PG, Lenting PJ, Denis CV. P-selectin glycoprotein ligant 1 e β2-integrin cooperate in the adhesion of leucocytes to von Willebrand factor. Blood 2006; 108: 3746-3752.

Phillips RM, Six DA, Dennis EA, Ghosh P. *In vivo* phospholipase activity of the *Pseudomonas aeruginosa* cytotoxin ExoU and protection of mammalian cells with phospholipase A2 inhibitors. J Biol Chem 2003; 278: 41326-41332.

Plotkowski MC, Saliba AM, Pereira SHM, Cervante MP, Laudinal OB. *Pseudomonas aeruginosa* selective adherence to and entry into human endothelial cells. Infect Immun 1994; 62: 5456-5463.

Plotkowski MC, Meireles MN. Concomitant endosome-phagosome fusion and lysis of endosomal membrana account for *Pseudomonas aeruginosa* survival in human endothelial cells. J Submicros Cytol Pathol 1997; 29: 229-37.

Plotkowski MC, Brandão BA, Assis MC, Feliciano LFP, Raymond B, Freitas C, Saliba AM, Zahm JM, Touqui L, Bozza PT. Lipid body mobilization in the ExoU-induced release of inflammatory mediators by airway epithelial cells. Microb Pathog 2008; 45: 30-37.

Plotkowski MC, Feliciano LFP, Machado GBS, Cunha Jr LG, Freitas C, Saliba AM, Assis MC. ExoU-induced procoagulant activity in *Pseudomonas aeruginosa*-infected airway cells. Eur Respir J 2008b; 32(6): 1591-8.

Pober JS, Sessa WC. Evolving functions of endothelial cells in inflammation. Nat Rev Immunol 2007; 7: 803-815.

Porta C, Caporali R, Montecucco C. Thrombotic thrombocytopenic purpura and autoimmunity: a tale of shadows and suspects. Haematol 1999; 84: 260-269.

Rahbar A & Söderberg-Nauclér. Human cytomegalovirus infection of endothelial cells triggers platelet adhesion and aggregation. J Virol 2005; 79: 2211-2220.

Ribeiro MJA, Phillips DJ, Benson JM, Evatt BL, Ades EW, Hooper WC. Hemostatic properties of the SV-40 transfected human microvascular endothelial cell line (HMEC-1). Thromb Res 1995; 79(2): 153-161.

Rondaij MG, Bierings R, Kragt A, van Mourik JA, Voorberg J. Dynamics and plasticity of Weibel-Palade bodies in endothelial cells. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2006; 26: 1002-1007.

Rozmyslowicz T, Majka M, Kijowski J. Platelet and megakaryocyte-derived microparticles transfer CXCR4 receptor to CXCR4-null cells and make them susceptible to infection by X4-HIV. AIDS 2003; 17: 33-42.

Ruggeri ZM. The role of von Willebrand factor in thrombus formation. Thromb Res 2007; 120: 55-59.

Ruiz-Torres MP, Casiraghi F, Galbusera M, Macconi D, Gastoldi S, Todeschini M, Porrati F, Belotti D, Pogliani EM, Noris M, Remuzzi G. Complement activation: the missing link between ADAMTS-13 deficiency and microvascular thrombosis of thrombotic microangiopathies. Thromb Haemost 2005; 93(3): 443-52.

Saliba AM, Filloux A, Ball G, Silva ASV, Assis MC, Plotkowski MC. Type III secretion-mediated killing of endothelial cells by *Pseudomonas aeruginosa*. Microb Pathog 2002; 33: 153-166.

Saliba AM, Nascimento DO, Silva MCA, Assis MC, Gayer CRM, Raymond B, Coelho MGP, Marques EA, Touqui L, Albano RM, Lopes UG, Paiva DD, Bozza PT, Plotkowski MC. Eicosanoid-mediated proinflammatory activity of *Pseudomonas aeruginosa* ExoU. Cell Microbiol 2005; 7: 1811-1822.

Saliba AM, Assis MC, Nishi R, Raymond B, Marques EA, Lopes UG, Touqui L, Plotkowski MC. Implications of oxidative stress in the cytotoxicity of *Pseudomonas aeruginosa* ExoU. Microb Infect 2006; 8: 450-459.

Sato H, Frank DW, Hillard CJ, Feix JB, Pankhaniya RR, Moriyama K, Finck-Barbançon V, Buchaklian A, Lei M, Long RM, Wiener-Kronish J, Sawa T. The mechanism of action of the *Pseudomonas aeruginosa*-encoded type III cytotoxin, ExoU. EMBO J 2003; 22: 2959-2969.

Schouten M, Wiersinga WJ, Levi M, van de Poll T. Inflammation, endothelium, and coagulation in sepsis. J Leukoc Biol 2008; 83: 1-10.

Shaver CM, Hauser AR. Relative contributions of *Pseudomonas aeruginosa* ExoU, ExoS, and ExoT to virulence in the lung. Infect Immun 2004; 72(12): 6969-6977.

Schulert GS, Feltman H, Rabin SDP, Martin CG, Battle SE, Rello J, Hauser AR. Secretion of the toxin ExoU is a marker for highly virulent *Pseudomonas aeruginosa* isolates obtained from patients with hospital-acquired pneumonia. J Infect Dis 2003; 188: 1695-706.

Siemiatkowski A, Kloczko J, Galar M, Czaban S. von Willebrand factor antigen as a prognostic marker in posttraumatic acute lung injury. Haemost 2000; 30: 189-195.

Silva MCF, Vidipó LA, Nishi R, Plotkowski MC. Binding of plasminogen to *Pseudomonas aeruginosa* results in formation of surface-associated plasmin and enhanced bacterial invasiveness. Microb Pathogen 2004; 36: 59-66.

Szotowski B, Antoniak S, Poller W, Schultheiss HP, Rauch U. Procoagulant soluble tissue factor is released from endothelial cells in response to inflammatory cytokines. Circ Res 2005; 96: 1233-1239.

Tesse A, Martinez MC, Hugel B, Chalupsky K, Muller CD, Meziani F, Mitolo-Chieppa D, Freyssinet JM, Andriantsitohaina R. Upregulation of proinflammatory proteins through NF-κB pathway by shed membrane microparticles results in vascular hyporeactivity. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2005; 25: 2522-2527.

Tsao SM, Hsu CC, Yin MC. Meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection in diabetic mice enhanced inflammation and coagulation. J Med Microbiol 2006; 55: 379-85.

Tzavara V, Vlachoyiannopoulos PG, Kordossis T. Evidence for non-adaptive immune response in HIV infection. Eur J Clin Invest 1997; 27: 846-849.

Ullberg M, Kronvall G, Karlsson I, Wiman B. Receptors for human plasminogen on gram-negative bacteria. Infect Immun 1990; 58: 21-25.

Valente E, Assis MC, Alvin IMP, Pereira G, Plotkowski MC. *Pseudomonas aeruginosa* induce apoptosis in human endothelial cells. Microb Pathog 2000; 29: 345-356.

Varga-Szabo D, Pleines I, Nieswandt B. Cell adhesion mechanisms in platelet. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2008; 28: 403-412.

Veltrop MHAM, Beekhuizen H, Thompson J. Bacterial species- and strain- dependent induction of tissue factor in human vascular endothelial cells. Infect and Immun 1999; 67: 6130-6138.

Visher UM, Jornot L, Wollheim CB, Theler JM. Reactive oxygen intermediates induce regulated secretion of von Willebrand factor from cultured human vascular endothelial cells. Blood 1995; 85(11): 3164-3172.

Wagner DD. Cell biology of von Willebrand factor. Annu Rev Cell Biol 1990; 6: 217-46.

Weyrich AS, Lindemann S, Zimmerman GA. The evolving role of platelets in inflammation. J Thromb and Haemost 2003; 1: 1897-1905.

Wohner N. Role of cellular elements in thrombus formation and dissolution. Cardiovasc Hematol Agents Med Chem 2008; 6(3): 224-228.

Wu KK, Thiagarajan P. Role of endothelium in thrombosis and hemostasis. Annu Rev Med 1996; 47: 315-31.

Yahr TL, Vallis AJ, Hancock MK, Barbieri JT, Frank DW. ExoY, an adenylate cyclase secreted by the *Pseudomonas aeruginosa* type III system. Microbiol 1998; 95: 13899-13904.

Yamamoto K, Waard V, Fearns C, Loskutoff DJ. Tissue distribution and regulation of murine von Willebrand factor gene expression in vivo. Blood 1998; 92(8): 2791-2801.

Zarei S, Frieden M, Kaufmann JE, Visher UM. The regulation of endothelial vWF secretion by nitric oxide: is it physiological? J Thromb Haemost 2006; 4: 263-5.

Zaverio M, Ruggeri ZM. Von Willebrand factor. Curr Opin Hematol 2003; 10: 142-149.

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