

MARIALICE ERDELYI MENDES

PERFIL DE EXPRESSÃO GÊNICA DA VIA DE
SINALIZAÇÃO DOS RECEPTORES DO TIPO *TOLL* EM
CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO
HUMANAS TOLERANTES AO LPS

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

São Paulo

2010

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

MARIALICE ERDELYI MENDES

PERFIL DE EXPRESSÃO GÊNICA DA VIA DE
SINALIZAÇÃO DOS RECEPTORES DO TIPO *TOLL* EM
CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO
HUMANAS TOLERANTES AO LPS

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

Orientador: Prof. Dr. Reinaldo Salomão

São Paulo

2010

Mendes, Marialice Erdelyi

Perfil de expressão gênica da via de sinalização dos receptores do tipo *Toll* em células mononucleares do sangue periférico humanas tolerantes ao LPS.

/Marialice Erdelyi Mendes. São Paulo, 2010.

x, 88f.

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

Título em inglês: Gene expression profile of Toll-like Receptor signaling pathway in LPS-tolerant human peripheral blood mononuclear cells.

1. Lipopolissacarídeos 2. Monócitos 3. Reação em Cadeia da Polimerase

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO

ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE MEDICINA

DISCIPLINA DE INFECTOLOGIA

Chefe do Departamento: Prof. Angelo Amato Vincenzo de Paola

Chefe da Disciplina: Prof. Dr. Eduardo Alexandrino Sérvolo de Medeiros

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

Este trabalho foi realizado com recursos da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) – Processos 2007-56860-7 e 2006/ 58744-1.

MARIALICE ERDELYI MENDES

PERFIL DE EXPRESSÃO GÊNICA DA VIA DE
SINALIZAÇÃO DOS RECEPTORES DO TIPO *TOLL* EM
CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO
HUMANAS TOLERANTES AO LPS

Presidente da Banca:

Prof. Dr. Reinaldo Salomão

BANCA EXAMINADORA

TITULARES

Prof. Dr. Hugo Caire de Castro Faria Neto

Prof. Dr. Francisco Garcia Soriano

Prof. Dr. Ismael Dale Cotrim Guerreiro da Silva

SUPLENTE

Dra. Shirley Komninakis

Aprovada em: 01/07/2010

PARA SER GRANDE

*“Para ser grande, sê inteiro: nada
Teu exagera ou exclui.
Sê todo em cada coisa. Põe quanto és
No mínimo que fazes.
Assim em cada lago a lua toda
Brilha, porque alta vive.”*

Fernando Pessoa

(Ricardo Reis)

Dedicatória

*Aos meus pais, Marcia e Teodoro,
pelo apoio e amor incondicionais.*

*Ao meu companheiro, Rafael
Kossamu Yamauti, com todo o meu
Amor.*

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Reinaldo Salomão, orientador e amigo, pelos ensinamentos científicos e Humanos, e por ouvir e aceitar minhas eternas “crises”.

À Milena, que “supervisionou” impecavelmente não só esta tese, mas também muitos momentos de desespero. Obrigada pela disposição e paciência infindáveis.

À Natália, amiga que me segurou pela mão e me guiou nos primeiros passos científicos.

Aos meus amigos do laboratório de Imunologia, Maria da Luz, Marjorie, Giovana, Amanda, Sidnéia, Selma, Michelle, Leandro, Antônia, Otelô, e amigos do laboratório de Virologia, com os quais construí muito mais do que uma relação de trabalho, com risadas, conversas e muitas festinhas.

Aos voluntários que aceitaram participar do estudo.

Ao meus amigos, sem os quais eu não poderia ter chegado até aqui.

Ao meu companheiro, Rafael, por existir.

À minha mãe, Marcia, mulher de integridade inexorável, por ser a minha estrela guia.

Sumário

Dedicatória	<i>ví</i>
Agradecimentos	<i>vii</i>
Resumo	<i>ix</i>
1. Introdução	1
1.1. Imunidade inata e receptores do tipo <i>Toll</i>	1
1.2. Sinalização desencadeada pelo LPS.....	3
1.3. Sepses.....	6
1.4. Tolerância ao LPS.....	8
2. Objetivos	11
3. Artigo Científico	12
4. Conclusão	47
5. Anexos	48
5.1 Resultados Complementares.....	48
5.1.1. Expressão gênica induzida pelo desafio com LPS (Meio-LPS)	48
5.1.2. Padronização do modelo de tolerância.....	52
5.2. Protocolos.....	54
5.3. Soluções.....	69
6. Bibliografia	70
7. Abstract	78

Resumo

Pré-exposição a pequenas doses de LPS induz resistência a uma dose letal de LPS, um fenômeno conhecido como tolerância à endotoxina. A pré-exposição ao LPS modula o padrão de resposta celular, conforme ilustrado pela expressão gênica e síntese protéica alteradas de citocinas inflamatórias. No entanto, os mecanismos envolvidos neste processo ainda são parcialmente descritos. Interessante, as células tolerantes ao LPS assemelham-se àquelas obtidas de pacientes sépticos. **Métodos:** Tolerância ao LPS foi induzida em células mononucleares do sangue periférico humanas pela incubação destas com 1 ng/mL de LPS durante 48 horas. Após este período, as células foram desafiadas com 100 ng/mL de LPS por 2, 6 e 24 horas. Em cada um destes momentos, foi avaliada a expressão de 84 genes relacionados à via dos receptores do tipo *Toll*, por PCR *array*. **Resultados:** O pré-tratamento com LPS não modulou a expressão de CD14 e TLR4 na superfície de monócitos, demonstrando que a tolerância não ocorreu devido à modulações dos receptores do LPS. Um gene foi considerado tolerizável quando o pré-tratamento com LPS reverteu o efeito causado na expressão gênica pelo desafio com LPS; enquanto um gene foi considerado não tolerizável quando o pré-tratamento com LPS não reverteu o efeito do desafio com LPS. As cascatas no NF- κ B, JNK, ERK e TRIF estavam bloqueadas ou atenuadas em células tolerantes, enquanto a expressão dos genes relacionados à cascata da p38 estava aumentada. **Conclusão:** Esses resultados demonstram uma regulação distinta entre as cascatas da via de sinalização dos TLRs durante a tolerância. Além disso, este achado pode explicar a regulação diferenciada entre alguns mediadores inflamatórios, como por exemplo a regulação positiva de IL-10 e COX2 e regulação negativa de TNF- α e IL-12, fato este também explicado pela influência de regulações epigenéticas. A tolerância pode resultar em repressão ou indução de expressão gênica, sendo tal efeito dependente de regulação positiva ou negativa induzida pelo desafio com LPS.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Imunidade inata e receptores do tipo *Toll*

A imunidade inata é o mecanismo filogenético mais antigo de defesa contra patógenos e está presente em todos os organismos multicelulares. Animais vertebrados dispõem também de um sistema mais específico de defesa, a imunidade adaptativa. No entanto, a imunidade inata continua sendo a primeira linha de defesa contra patógenos e está presente antes mesmo da invasão do hospedeiro por tais microorganismos (Abbas *et al.*, 2007).

A ativação da imunidade inata se dá por meio do reconhecimento de estruturas conservadas evolutivamente e presentes nos microorganismos invasores, conhecidas como padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), como por exemplo lipopolissacarídeo (LPS), peptidoglicano, ácido lipoteicóico, lipoproteínas e DNA bacteriano. Estas estruturas são reconhecidas por meio dos receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), os quais também são estruturas conservadas evolutivamente (Janeway, 1989). Um dos tipos mais conhecidos de PRRs são os receptores do tipo *Toll* (TLR). Esses receptores foram inicialmente descritos como tendo um importante papel na formação do eixo dorso-ventral da mosca *Drosophila melanogaster*. (Anderson *et al.*, 1985; Hashimoto *et al.*, 1988). Posteriormente, demonstrou-se que os TLRs também exercem um papel na imunidade inata desses animais (Lemaitre *et al.*, 1996). A partir de então, foram identificados membros dos TLRs em mamíferos, os quais também atuam no reconhecimento de padrões moleculares de patógenos.

Os TLRs são compostos por proteínas transmembrana ricas em leucina na porção extracelular e sua porção citoplasmática é muito similar ao receptor de interleucina-1, funcionando como transdutora de sinalização. Esta porção é conhecida como domínio homólogo ao receptor *Toll/IL-1* (TIR) (Gay & Keith, 1991). Em mamíferos são conhecidos hoje pelo menos 11 tipos de TLRs, responsáveis pelo reconhecimento de diferentes estruturas dos patógenos invasores (Akira & Takeda, 2004). Os TLRs se combinam em dímeros e, desta forma, criam um repertório capaz de discriminar o grande número de padrões moleculares associados a patógenos presentes na natureza (Ozinsky *et al.*, 2000).

O primeiro indício de que os TLRs de mamíferos atuam no reconhecimento de PAMPs veio da observação de que um homólogo humano do *Toll* da drosophila, depois chamado *Toll-like Receptor 4* (TLR4), induzia a expressão de genes relacionados à resposta inflamatória. (Medzhitov *et al.*, 1997). Pouco depois, um

estudo conduzido por Poltorak e colegas demonstrou que camundongos mutantes para o gene *Tlr4*, o C3H/HeJ com mutação pontual e o C57BL/10ScCr com deleção do gene, apresentavam um fenótipo de resistência ao LPS (Poltorak *et al.*, 1998.). Com isso, reconheceu-se o TLR4 como parte do complexo receptor do LPS responsável pela transdução do seu sinal, já que o CD14, previamente identificado como receptor do LPS (Wright *et al.*, 1990), não possui porção intracelular.

O receptor CD14 é composto de glicoproteína ancorada à membrana por glicosilfosfatidilinositol (GPI) de 55 KDa e é encontrado na membrana de monócitos, macrófagos e em menor proporção em granulócitos (Ziegler-Heitbrock & Ulevitch, 1993). Além disso, a sinalização desencadeada pelo LPS inclui interação com proteínas do soro, as quais podem aumentar (LBP - lipopolysaccharide binding protein) (Schumann *et al.*, 1990) ou diminuir (BPI bactericidal/permeability-increasing protein) (Marra *et al.*, 1992) a atividade do LPS e sua ligação à célula via o receptor CD14. Após essa ligação, o CD14 interage com o TLR4, o qual necessita da proteína de diferenciação mielóide-2 (MD-2) que se encontra acoplada à porção extracelular do TLR4, conferindo uma maior sensibilidade ao LPS, provavelmente através da estabilização dos dímeros do TLR4 (Shimazu *et al.*, 1999).

Após a morte e lise bacteriana, e também quando a bactéria se multiplica, o LPS é liberado da superfície bacteriana. A molécula do LPS, presente na membrana externa das bactérias Gram-negativas, pode ser dividida, estrutural e funcionalmente, em três sub-regiões: polissacarídeo O, região central ("core") e lipídeo A (Galanos *et al.*, 1979) (Figuras 1 e 2). O lipídeo A representa a estrutura mais conservada do LPS e retém a toxicidade da molécula (Galanos *et al.*, 1985). Por intermédio do lipídeo A, o LPS interage com vários tipos celulares, como células mononucleares, células endoteliais, polimorfonucleares, sendo de particular importância os monócitos e macrófagos.

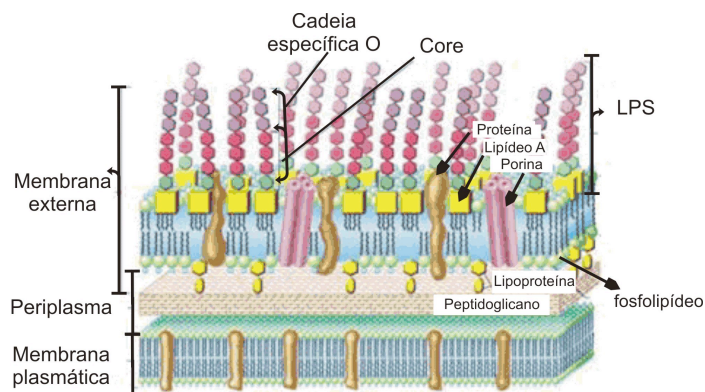


Figura 1: Diagrama esquemático da parede celular de bactéria Gram-negativa (adaptado de Madigan *et al.*, 1997).

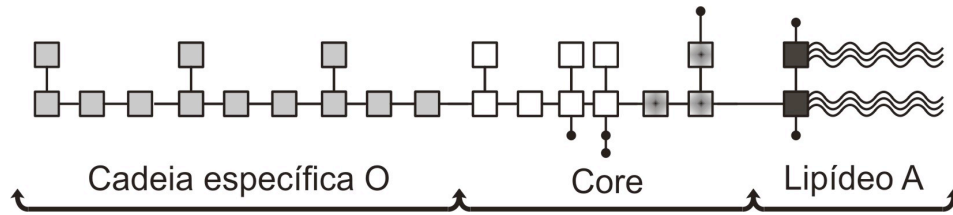


Figura 2: Representação esquemática do LPS de Salmonella (adaptado de Galanos *et al.*, 1979)

1.2. Sinalização desencadeada pelo LPS

A ligação do LPS ao seu complexo receptor na célula desencadeia uma cascata de sinalização que pode seguir duas vias, uma dependente da proteína adaptadora fator de diferenciação mielóide 88 (MyD88), e outra dependente da proteína adaptadora contendo o domínio TIR-1 indutora de IFN- β (TRIF) (Akira & Takeda, 2004).

A via dependente de MyD88 recruta esta molécula para o receptor através de seu domínio TIR, que interage com o domínio citoplasmático TIR do TLR4, juntamente com a proteína adaptadora contendo o domínio TIR (TIRAP). Isto permite o recrutamento e ativação das chamadas quinases associadas ao IL-1R (IRAKs), cujo próximo alvo é o fator 6 associado ao receptor de necrose tumoral (TRAF6). O complexo TRAF6-IRAK1 então se desconecta do receptor e, na membrana plasmática, interage com outro complexo, formado por quinase ativadora do fator transformador de crescimento- β (TAK1), proteína ligante-1 de TAK1 (TAB1) e proteína ligante-2 (TAB2). TAK1 e TAB2 são fosforilados e migram, juntamente com TRAF6 e TAB1, para o citoplasma, onde se associam a duas enzimas, UEV1A e UBC13. Tal associação leva à ubiquitilação da TRAF6, que induz ativação de TAK1 por interação com *evolutionarily conserved signaling intermediate in Toll pathway* (ECSIT). Uma vez ativada, TAK1 leva a dois caminhos de sinalização: (1) ativação da via das proteínas quinases ativadoras de mitose (MAPKs), pertencentes a três famílias principais: p38, N-terminal c-Jun quinase (JNK) e quinase regulada por sinal extracelular (ERK), através da fosforilação das MAPKs resultando em ativação dos fatores de transcrição ATF2, JUN, FOS, ELK1, entre outros e (2) fosforilação do complexo *nuclear-factor- κ B* (κ B)-kinase (IKK), composto por IKK- α , IKK β e IKK γ , o qual então fosforila κ B, levando a sua ubiquitilação e subsequente degradação, o que permite a translocação do NF- κ B para núcleo e transcrição de diversos genes inflamatórios como TNF- α , IL1-

β , IL-6 e COX2. O fator de transcrição NF- κ B é composto por uma família de proteínas que se associam em hetero- ou homodímeros, da qual fazem parte p65, p50, c-rel, relB e p52, sendo o heterodímero p50/p65 sua principal forma ativa (Dong *et al.*, 2002; Hayden & Ghosh, 2008; Akira & Takeda, 2004).

Na via dependente de TRIF, a porção amino-terminal deste adaptador interage com TBK1. Ativação de TBK1 leva à fosforilação do fator de transcrição IRF3, o qual induz expressão de IFN- β e conseqüentemente de genes induzidos por interferon, como CCL5 e CXCL10 (Kawai *et al.*, 2001). Nesta via ocorre também ativação de TRAF6, o qual induz translocação de NF- κ B para o núcleo. A ativação de NF- κ B pelo TRIF também pode ocorrer por meio de sua porção C-terminal, através da molécula RIP1 (Akira & Takeda, 2004). É interessante ressaltar que a ativação de NF- κ B pela via dependente de TRIF ocorre mais tardiamente que na via dependente de MyD88. A presença de duas ondas de ativação de NF- κ B garante estabilidade na ativação desta via, refletindo sua importância na resposta do hospedeiro pelo TLR4. (O'Neill & Bowie, 2007; Covert *et al.*, 2005). Além disso, em camundongos deficientes em MyD88, ativação tardia da via das MAPKs também é descrita (Kawai *et al.*, 1999) Entretanto, a via dependente de TRIF foi descoberta mais recentemente e ainda são necessários mais estudos para entender os mecanismos nela envolvidos (Biswas & Lopez-Collazo, 2009).

O sistema imune precisa constantemente encontrar um balanço entre ativação e inibição para evitar que a resposta inflamatória seja prejudicial. Desta forma, a sinalização pelos TLRs precisa ser finamente regulada. Diversos mecanismos envolvidos nesta regulação são descritos, como redução do número de TLRs, presença de proteínas regulatórias que atuam inibindo passos da cascata de sinalização, as quais podem estar presentes constitutivamente ou serem induzidas durante uma infecção, presença de miRNAs, regulações epigenéticas e até mesmo morte celular. (Liew *et al.*, 2005; Taganov *et al.*, 2006; Foster & Medzhitov, 2009).

Outra via relacionada à inflamação é a do receptor de TNF- α (TNFR1). O TLR4 e IL-1R apresentam trechos na sinalização intracelular que são comuns ao receptor de TNF (TNFR1), sendo que a convergência das vias de ativação ocorre mais distante do que entre os receptores com domínio TIR. Após a ligação do TNF- α ao seu receptor na superfície celular são recrutadas duas proteínas adaptadoras que possuem domínio de morte, a proteína associada ao domínio de morte de FAS (FADD) e a proteína associada ao domínio de morte do TNFR (TRADD). Estas proteínas ativam a cascata de caspases e, subseqüentemente, induzem a apoptose. Entretanto, o TNFR1 somente sinalizará para o domínio de morte quando a síntese protéica estiver

bloqueada. A ativação do TNFR1 induz transcrição de genes inflamatórios. O mecanismo protetor das células ao desencadeamento da apoptose é observado em nível molecular, onde TNFR1 primeiramente recruta TRADD, enquanto FAS (CD95) interage com FADD. TRADD agrupa-se ao fator 2 associado ao TNFR (TRAF2), TRAF1 e a proteína associada a receptor (RIP) ativando o NF-κB e JNK, protegendo as células da apoptose (Hehlgans & Pfeffer, 2005)

A ativação dos macrófagos pelo LPS resulta na liberação de mediadores como o fator de necrose tumoral-alfa (TNF-α), interleucina-1 (IL-1), IL-6, IL-8, quimiocinas e outros. Estes mediadores têm atividade bioativa potente e podem atuar em sinergismo ou ter efeito antagônico à endotoxina (Rietschel *et al.*, 1994). Essa resposta atua na tentativa de erradicar os patógenos invasores e assim manter a homeostase do organismo. *In vivo*, estas moléculas podem ter ação local ou serem liberadas na circulação, permitindo assim a repercussão sistêmica de seus efeitos (Rietschel *et al.*, 1982). No entanto, a produção exacerbada dessas moléculas pode levar a um descontrole da resposta inflamatória protetora, com desencadeamento de diversas doenças, como por exemplo sepse, doenças auto-imunes, doenças metabólicas e câncer. Neste sentido, fica clara a importância de mecanismos eficientes de controle da resposta inflamatória do hospedeiro, os quais têm sido motivo de estudos incipientes nas mais diversas áreas (Foster *et al.*, 2007).

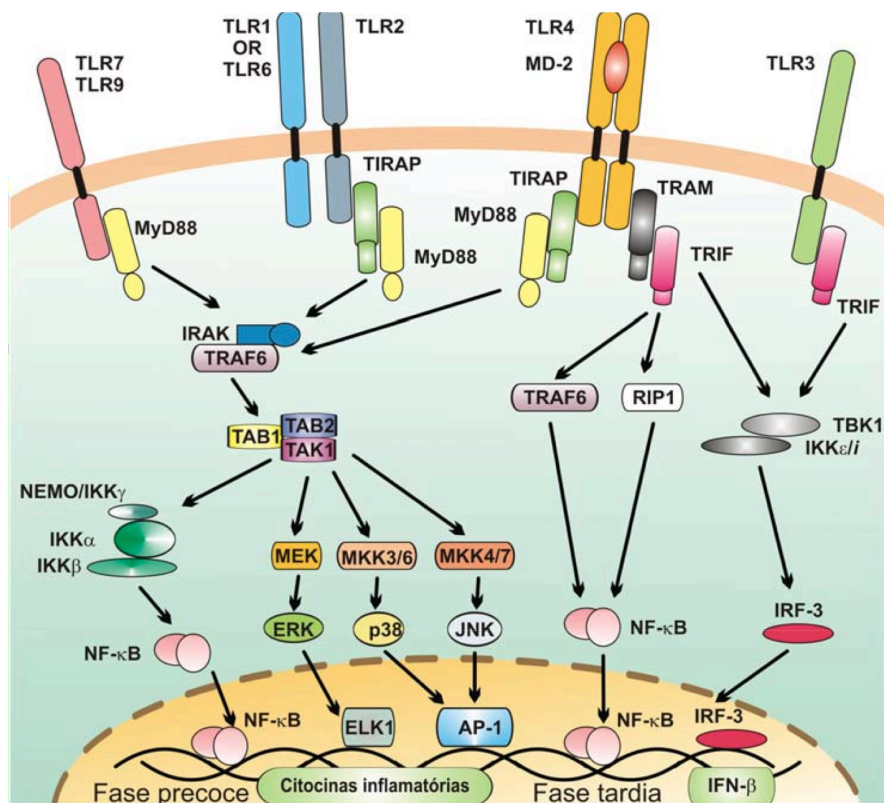


Figura 3: Vias de sinalização dos TLRs (adaptado de Takeda & Akira, 2005; Liew *et al.*, 2005).

1.3. Sepses

A sepsis pode ser definida como a repercussão sistêmica da infecção, manifestando-se em diferentes estágios clínicos de um mesmo processo fisiopatológico e podendo levar à disfunção de órgãos, hipotensão e morte. No início da década de 90, em reunião de consenso das Sociedades de Terapia Intensiva e de Pneumologistas (American College of Chest Physicians/ Society of Critical Care), procurou-se estabelecer uma padronização para o diagnóstico de sepsis e suas complicações, levando-se em consideração os avanços da compreensão de sua fisiopatologia. Reconheceu-se que uma grande diversidade de causas poderia levar a um quadro clínico comum, caracterizado pelo desencadeamento da resposta inflamatória do hospedeiro. Este quadro foi definido como Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica (SIRS, do inglês Systemic Inflammatory Response Syndrome) e seria desencadeado por pancreatite, queimaduras, trauma e outros, ficando o termo sepsis restrito à SIRS causada por infecção (Bone *et al.*, 1992).

A sepsis apresenta crescente incidência e elevada morbidade e mortalidade, sendo a principal causa de óbito nas unidades de terapia intensiva (Salomão *et al.*, 1992; Salomão *et al.*, 1993; Silva *et al.*, 2004). O controle da infecção depende do adequado reconhecimento dos microorganismos pelas células do hospedeiro e de resposta efetora competente. Paradoxalmente, na sepsis, os mecanismos de proteção estão também envolvidos no processo de doença, sendo o limite de resposta protetora e de lesão ainda impreciso (Salomão *et al.*, 2008).

Na sepsis, as citocinas inflamatórias e outros mediadores desencadeados por estas ou por agentes patogênicos induzem uma série de alterações nas células alvo. Adicionalmente, as alterações induzidas na célula endotelial constituem um importante substrato fisiopatológico na sepsis. Há alterações do seu citoesqueleto, alterações funcionais, com síntese de mediadores com efeitos quimiotáticos, além do aumento da expressão de moléculas de adesão. Ainda, a liberação de vasodilatadores potentes como o óxido nítrico (NO) pelas células inflamatórias e endoteliais leva a uma importante vasodilatação. As citocinas inflamatórias desencadeiam também a cascata de coagulação, principalmente pela exposição do fator tissular, criando um ambiente de exacerbação da inflamação e coagulação. A regulação negativa de proteínas com função anticoagulante contribui ainda mais para a indução da coagulação. Como resultado tem-se a adesão de neutrófilos e monócitos às células endoteliais, migração para o extravascular, extravasamento de fluidos para o interstício, coagulação intravascular, que em conjunto com alteração do tônus resultam em alterações da microcirculação e levam à hipóxia tecidual e conseqüente

disfunção de órgãos e sistemas. Importante ainda, a disfunção celular desencadeada pela sepse pode persistir mesmo após estabelecimento do fluxo sanguíneo aos tecidos, por mecanismos de sofrimento celular, referido como choque citopático (Salomão *et al.*, 1999; Rigato *et al.*, 2001; Cohen, 2002; Hotchkiss & Karl, 2003).

A complexidade da sepse se dá pela sua natureza bifásica, a qual é caracterizada por uma fase inicial de inflamação exacerbada, na qual a imunidade inata é ativada e ocorre liberação de mediadores proinflamatórios, seguida de um estado de hiporesposta, caracterizada por resposta inflamatória inibida, maior susceptibilidade a infecção e mortalidade elevada (Monneret *et al.*, 2008; Riedemann *et al.*, 2003).

A similaridade entre as manifestações da sepse por Gram-negativos e os efeitos fisiopatológicos agudos induzidos pelo LPS levou à hipótese de que este, liberado da bactéria *in vivo*, é responsável pela indução dos sintomas da sepse (Rietschel *et al.*, 1982). Este dado foi confirmado quando se demonstrou que o lipídeo A sintético tinha atividade biológica idêntica ao lipídeo A e ao LPS bacterianos (Galanos *et al.*, 1985).

Estudos da cascata de sinalização do TLR4 em pacientes sépticos revelam perturbações em diferentes níveis da cascata, incluindo alterações na expressão dos receptores da superfície celular (Brunialti *et al.*, 2006; Härter *et al.*, 2004; Mages *et al.*, 2007) e perturbações na cascata do NF- κ B (Adib-Conquy *et al.*, 2000; Salomao *et al.*, 2009). Além disso, a produção de citocinas inflamatórias pelos monócitos circulantes no sangue desses pacientes também apresenta um padrão alterado quando comparada a indivíduos saudáveis. Durante a fase de “imunocomprometimento”, este padrão de liberação de citocinas revelou diminuição na capacidade dos monócitos circulantes em produzir citocinas proinflamatórias, enquanto outros fatores anti-inflamatórios estavam aumentados ou preservados, um quadro que parece estar relacionado à tentativa do organismo em limitar a resposta inflamatória exacerbada instalada previamente, enquanto algumas funções ainda são mantidas (Cavaillon *et al.*, 2005).

Estudos empregando cultura de células mononucleares isoladas do sangue periférico (Munoz *et al.*, 1991) e sangue total (Ertel *et al.*, 1995; Ertel *et al.*, 1997; van Deuren *et al.*, 1994) de pacientes sépticos mostraram menor produção das citocinas IL-1 α , IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-12 e IFN- γ após estimulação com LPS. Por outro lado, a produção de IL-10 estava elevada (Adib-Conquy *et al.*, 2006; Salomao *et al.*, 2009) ou preservada (Rigato & Salomão, 2003) nestes pacientes, fato este que também foi observado em relação à produção de fatores de diferenciação celular (Weiss *et al.*, 2001; Salomao *et al.*, 2009). Além disso, alguns reguladores negativos da cascata dos

TLRs também estão aumentados durante a sepse, como IRAK-M (Escoll *et al.*, 2003), MyD88s e SIGIRR (Adib-Conquy *et al.*, 2006).

Fenótipo muito similar ao descrito acima pode ser observado em animais e células submetidos a exposições sucessivas *in vitro* ou *in vivo* ao LPS, um fenômeno conhecido como tolerância à endotoxina (Cavaillon & Adib-Conquy, 2006). Por este motivo, esse modelo tem sido empregado na tentativa de mimetizar o microambiente da sepse e assim ajudar a compreender os mecanismos a ela relacionados (Cavaillon *et al.*, 2003).

1.4. Tolerância ao LPS

Um dos primeiros relatos de tolerância é datado de 1946, onde o pesquisador Paul Beeson observou que a administração de doses repetidas de vacina tifóide em coelhos levava a uma redução progressiva da febre causada por este microorganismo (Beeson, 1946). Observou-se também que em pacientes em fase de recuperação de febre tifóide e malária, a administração de endotoxina levava à redução da febre (Neva & Morgan, 1950; Heyman & Beeson, 1949).

De forma similar, em ratos, a pré-exposição a pequenas doses de LPS é capaz de proteger esses animais de uma dose letal da endotoxina (Galanos *et al.*, 1992). Freudenberg e Galanos observaram que a transferência de macrófagos de camundongos resistentes ao LPS para camundongos sensíveis, tornava-os resistentes, demonstrando o papel central destas células na indução da tolerância ao LPS *in vivo* (Freudenberg & Galanos, 1988).

Assim como na sepse, a tolerância ao LPS envolve uma reprogramação complexa das funções de monócitos e macrófagos (Zhang & Morrison, 1993a). No entanto, os mecanismos que permeiam esta reprogramação ainda não são totalmente conhecidos. A expressão dos receptores da superfície celular pode sofrer modulação durante a tolerância de acordo com o modelo estudado, porém este fato não é suficiente para explicar o desenvolvimento deste fenótipo (Dobrovolskaia & Vogel, 2002). Estudos em modelos *in vivo* e *in vitro* têm demonstrado alterações em diversos níveis da sinalização intracelular desencadeada pelo LPS em células tolerantes, incluindo defeitos nas proteínas adaptadoras, moléculas sinalizadoras e fatores de transcrição. A cascata do NF- κ B é largamente descrita como suprimida em células tolerantes ao LPS, tanto em humanos (Ziegler-Heitbrock *et al.*, 1994; Ziegler-Heitbrock, 2001) como em ratos (Bohuslav *et al.*, 1998), com predomiância de homodímeros p50. A via de sinalização das MAPKs também está comprometida

durante a tolerância (Tominaga *et al.*, 1999; Medvedev *et al.*, 2002), e indícios de comprometimento da via dependente de TRIF também são descritos (Piao *et al.*, 2009).

A presença de reguladores negativos da cascata dos TLRs também influencia no desenvolvimento de um fenótipo de tolerância, como demonstrado pelas grandes quantidades de IRAK-M encontradas em células tolerantes humanas (Escoll *et al.*, 2003) e de camundongos (Kobayashi *et al.*, 2002). Além da IRAK-M, também estão envolvidos SHIP (Sly *et al.*, 2004), SOCS-1 (Nakagawa *et al.*, 2002), entre outros. Recentemente, a presença de miRNAs também tem sido associada ao desenvolvimento da tolerância ao LPS (Nahid *et al.*, 2009).

Interessante, o pico de produção de TNF- α observado após estímulo com LPS, não ocorre em células que foram previamente expostas à endotoxina, sendo esta provavelmente a característica mais marcante da tolerância ao LPS. Ainda, são descritas alterações na produção de diversas citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas, frequentemente marcadas por diminuição de sua produção, como é o caso de IL-6, IL-12, IL1b, IL-8, CCL4, CXCL10 entre outras (Foster *et al.*, 2007; del Fresno *et al.*, 2009; Mages *et al.*, 2007; Draisma *et al.*, 2009; Granowitz *et al.*, 1993; van der Poll *et al.*, 1996), apesar de IL-1 (Zuckerman *et al.*, 1991; Seatter *et al.*, 1995) e IL-6 (Hirohashi & Morrison, 1996; Seatter *et al.*, 1995) estarem aumentadas em alguns modelos estudados. Contrariamente, citocinas anti-inflamatórias como IL-10 (Frankenberger *et al.*, 1995; del Fresno *et al.*, 2009; Shimauchi *et al.*, 1999), TGB- β (Draisma *et al.*, 2009; Sly *et al.*, 2004) e IL-1ra (Randow *et al.*, 1995) estão aumentados nas células tolerantes, comprovando que estas células não sofrem uma anergia total, já que algumas de suas funções estão preservadas ou até mesmo aumentadas (Cavaillon & Adib-Conquy, 2006).

De grande relevância também é o fato de as células tolerantes ao LPS apresentarem comprometimento na função de apresentação de antígenos, com diminuição da expressão de HLA-DR e moléculas coestimulatórias (Wolk *et al.*, 2000; del Fresno *et al.*, 2009), fato que também é descrito em células de pacientes sépticos (Salomao *et al.*, 2002; Salomao *et al.*, 2009). Por outro lado, sua função fagocítica está preservada (del Fresno *et al.*, 2009), bem como a produção de espécie reativas de oxigênio e nitrogênio (Zhang & Morrison, 1993b; West *et al.*, 1994; Fernandes *et al.*, 2010, submetido), achados corroborados por estudos funcionais conduzidos em pacientes sépticos (Martins *et al.*, 2008).

Todos esses achados demonstram que a célula tolerante não perdeu sua capacidade de reconhecer e responder ao LPS, mas sim sofreu uma complexa reprogramação de suas funções, provavelmente na tentativa de evitar danos

causados pela resposta inflamatória e preservar a capacidade de resposta a uma possível reinfecção (Cavaillon & Adib-Conquy, 2006). Neste sentido, Foster *et al* observaram o padrão de expressão gênica de células tolerantes ao LPS e dividiram os genes estudados em dois grupos: tolerizáveis e não-tolerizáveis. Os primeiros, apresentam expressão inibida pelo pré-tratamento com LPS após um segundo estímulo com a endotoxina e em sua maioria codificam citocinas e mediadores próinflamatórios. Já o segundo grupo, inclui genes que não têm sua expressão influenciada pelo pré-tratamento com LPS e parecem estar envolvidos em processos anti-inflamatórios e de recuperação celular e tecidual (Foster *et al.*, 2007).

É interessante ressaltar que a regulação negativa de uma via de sinalização deveria levar à diminuição da transcrição dos produtos gênicos da via. No entanto, observamos que em uma mesma via de sinalização existem genes regulados positivamente e outros negativamente. De fato, como uma via de sinalização induz expressão de genes com diferentes funções, não seria interessante que tais funções fossem reguladas da mesma maneira, e sim de forma específica. Esse tipo de regulação tem sido descrito, e ocorre por meio de alterações na estrutura da cromatina. Modificações nas histonas são capazes de gerar alterações conformacionais do DNA, as quais tornam viáveis, ou não, a transcrição gênica. Acetilação ou desmetilação de histonas está associada a cromatina transcricionalmente ativa, enquanto desacetilação ou metilação leva ao silenciamento da expressão gênica. Desta forma, é possível um controle muito maior das diferentes funções induzidas por uma mesma via de sinalização. Foster e colaboradores demonstraram que monócitos tolerantes ao LPS apresentam esse tipo de regulação. Estímulo com LPS levou à metilação de histonas em promotores de genes tolerizáveis e não-tolerizáveis. No entanto, o re-estímulo com LPS levou à reacetilação somente de promotores de genes antimicrobianos, enquanto isso não aconteceu com os promotores de genes inflamatórios, os quais permaneceram inativos (Foster *et al.*, 2007).

Fica claro que a adaptação celular na sepse e na tolerância é um evento complexo e ainda parcialmente compreendido. Esta adaptação celular pode depender do *continuum* de manifestações clínicas na sepse, e de maneira mais complexa, a mesma célula pode ter funções reguladas positivamente e outras negativamente durante o quadro da evolução da doença. Frente à complexa regulação que se estabelece nas células tolerantes ao LPS e sua similaridade com as células de pacientes sépticos, decidimos estudar a expressão de 84 genes relacionados à via de sinalização dos receptores do tipo *Toll* em um modelo de tolerância ao LPS em células mononucleares do sangue periférico de humanos.

2. OBJETIVOS

O objetivo deste estudo foi estudar o perfil de expressão gênica relacionado à via de sinalização dos receptores do tipo *Toll* em um modelo de tolerância ao LPS em células mononucleares do sangue periférico de humanos.

Para tanto foram investigados:

1. A produção de TNF- α em diferentes modelos de tolerância ao LPS em células mononucleares do sangue periférico de humanos.

2. A expressão dos receptores CD14 e TLR4 na superfície de monócitos humanos na presença de doses crescentes de LPS (0,1; 1 e 10 ng/mL) após 48 de incubação.

3. A expressão de 84 genes relacionados à via de sinalização dos receptores do tipo *Toll*, após pré-tratamento e desafio com LPS (tolerância).

3. ARTIGO CIENTÍFICO

Title page

DIFFERENTIAL EXPRESSION OF TOLL-LIKE RECEPTOR SIGNALING CASCADES IN LPS-TOLERANT HUMAN PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELLS

Short title: TLR pathway gene expression in LPS-tolerant cells

Marialice Erdelyi Mendes¹, Giovana Lotici Baggio-Zappia¹, Milena Karina Coló Brunialti¹, Maria da Luz Fernandes¹, Marjorie Marini Rapozo¹, Reinaldo Salomao^{1*}

¹ Department of Medicine, Division of Infectious Diseases, Escola Paulista de Medicina, Federal University of Sao Paulo, Brazil

*** Corresponding author:**

Reinaldo Salomao

Division of Infectious Diseases, Escola Paulista de Medicina, Federal University of Sao Paulo

Rua Pedro de Toledo, 781 – 15th floor

Postal Code: 04039-032

São Paulo, Brazil

rsalomao@unifesp.br

Phone/Fax: 55 11 5081-5394

Keywords: gene expression; innate immunity; LPS; p38; PBMC; tolerance; toll-like receptors

Abbreviations: ERK= extracellular regulated kinase, JNK= c-Jun NH₂-terminal kinase, LBP= lipopolysaccharide binding protein, LPS= lipopolysaccharide, MAPK= mitogen-activated protein kinase, NF-κB= nuclear factor κB, PBMC= peripheral blood mononuclear cells, PCR= polimerase chain reaction, TLR= Toll-like Receptors. All other mentioned genes have their symbol and descriptions in Table 1.

Abstract

Pre-exposure to low doses of LPS induces resistance to a lethal challenge, a phenomenon known as endotoxin tolerance. In this study, tolerance was induced in human PBMC by culturing cells with 1 ng/mL LPS for 48 h. Cells were subsequently challenged with 100 ng/mL LPS for 2, 6 and 24 h, and the expression of 84 genes encoding proteins involved in the TLR signaling pathway was evaluated at each time point by PCR array. LPS pretreatment did not modulate the expression of TLR4 and CD14 on the surface of monocytes. A gene was defined as tolerized when LPS pretreatment reversed the effect of LPS challenge on the expression of the gene or as non-tolerized when LPS pretreatment did not reverse the effects of LPS challenge. We observed impaired or attenuated signal transduction through the NF- κ B, JNK, ERK and TRIF pathways, whereas expression of p38 pathway-related genes was preserved in LPS-tolerant cells. These results show a distinct regulation of the TLR pathway cascades during tolerance; this may account for the differential gene expression of some inflammatory mediators, such as up-regulation of IL-10 and COX2 as well as down-regulation of TNF- α and IL-12. Depending on the effect of LPS-induced gene up-regulation or down-regulation, tolerance, as a reversion of such LPS effects, may result in repression or induction of gene expression.

Introduction

Susceptible animals are rendered resistant to a lethal lipopolysaccharide (LPS) challenge by pretreatment with low doses of LPS. This phenomenon is known as endotoxin tolerance (Galanos *et al.*, 1992). This process involves a complex reprogramming of macrophage function (Zhang and Morrison, 1993) hallmarked by decreased production of TNF- α and seems to occur as the cell attempts to attenuate excess inflammation. Other cytokines and inflammatory mediators are also involved in this reprogramming, with inhibition (Tominaga *et al.*, 1999) or enhancement/maintenance of their production (Frankenberger *et al.*, 1995; Foster *et al.*, 2007) resulting in modulation of cellular functions. This cellular reprogramming during tolerance has been associated with resistance and protection to different injuries (Cavaillon and Adib-Conquy 2006).

It is known that circulating leukocytes from septic patients have characteristics similar to those of tolerant cells; in particular, the TLR signaling pathway is modulated in patients with sepsis (Cavaillon and Adib-Conquy 2006; Salomao *et al.*, 2008). Sepsis has been defined as a systemic inflammatory response triggered by infection that can lead to organ dysfunction, hypotension and death (Bone *et al.*, 1992). It has been proposed that during sepsis, an acute inflammatory response, during which innate immune cells are activated and pro-inflammatory mediators are released, is followed by a state of hyporesponsiveness characterized by inhibited inflammatory responses and enhanced susceptibility to infection (Riedemann *et al.*, 2003). Accordingly, we found that the production of inflammatory cytokines was modulated throughout sepsis, with increased production in the early stages followed by a decrease in production in the later and more severe phases (Brunialti *et al.*, 2006).

LPS-induced cell activation involves a complex mechanism in which LPS is presented by lipopolysaccharide binding protein (LBP) to CD14 and TLR4 and, in association with MD-2, triggers the intracellular signaling, which is mediated by two distinct pathways, the MyD88-dependent pathway and the TRIF-dependent pathway (Beutler *et al.*, 2003). Reprogramming of cells made tolerant to LPS may occur at the level of cell surface receptor expression (Nomura *et al.*, 2000) and at the level of signal transduction through the presence of negative regulators of TLR signaling (Escoll *et al.*, 2003), NF- κ B subunit p50-homodimers (Ziegler-Heitbrock 2001), and even miRNAs (Nahid *et al.*, 2009). Recently, epigenetic mechanisms altering the chromatin structure have been reported to play a major role in the modulation of gene expression during LPS tolerance (Chan *et al.*, 2005; Foster *et al.*, 2007).

In the current study, we demonstrate that tolerance to LPS is not directly controlled by expression of its receptor complex, pointing out that the cell can still sense LPS and modulation might occur in the intracellular signaling. Therefore, we investigated the expression of 84 genes from the TLR signaling pathway by polymerase chain reaction (PCR) array in a model of LPS tolerance in human peripheral blood mononuclear cells (PBMC).

Materials and Methods

Volunteers and cells

Peripheral blood samples were collected from 20 to 30-year-old healthy volunteers after obtaining written informed consent. The study was approved by the Ethics Committee of Federal University of São Paulo. PBMC were purified by the Ficoll density gradient method (Ficoll-Paque PLUS, GEHealthcare, Uppsala, Sweden) and suspended in RPMI 1640 medium (Sigma, Missouri, USA) supplemented with 10% fetal calf serum, 10 IU/mL penicillin, 10 µg/mL streptomycin (Gibco, California, USA), and 200 mM glutamine (Sigma).

***In vitro* induction of LPS tolerance**

LPS from *Salmonella abortus equi* was a generous gift from C. Galanos (Max-Planck Institute of Immunobiology, Freiburg, Germany) and was prepared by the phenol-water method and further purified with phenol-chloroform-petroleum ether as previously described (Galanos *et al.*, 1979). Tolerance to LPS was induced in PBMC from eight healthy volunteers by pre-incubating the cells with increasing concentrations of LPS (0.1 ng/mL or 1.0 ng/mL) for 6, 24 and 48 h before challenging the cells with 100 ng/mL LPS (LPS-LPS). The negative control contained only medium and did not receive LPS (Medium-Medium), while the positive control received only medium during the pre-incubation period but received 100 ng/mL LPS during the challenge. Residual LPS-induced TNF- α secretion was assessed after 48 h of incubation, before the challenge (LPS-Medium). Tolerance was confirmed by diminished TNF- α secretion, measured by ELISA (BD OptEIA), 6 hours after LPS challenge (Figure 1). A concentration of 1.0 ng/mL of LPS and length of pre-incubation of 48 h were chosen based on the efficient response observed in the positive control, the efficient induction of tolerance and low residual activation.

TLR4 and CD14 expression on monocytes

Expression of TLR4 and CD14 were evaluated in monocytes from five individuals by flow cytometry, following 48 hours of conditioning with 0.1, 1 and 10 ng/mL LPS. At this time point, cells were centrifuged at 800 x g for 10 minutes at 4°C. Supernatant was discarded and cells were resuspended and incubated with anti-TLR4 (PE) (eBiosciences, California, USA) and anti-CD14 (PerCP) (BD Bioscience, California, USA) antibodies for 15 minutes in the dark at room temperature. Cells were washed, centrifuged and resuspended in 1% paraformaldehyde (Sigma). Event acquisition was performed using CellQuest software (BD Bioscience) and a FACSCalibur 4-color flow cytometer (BD Bioscience). For each condition, 5000 events were acquired based on forward scatter, side scatter and CD14 parameters. Monocyte analysis was performed using Flow Jo software 8.8.6 (Tree Star, California, USA) by assessing forward and side scatter parameters combined with CD14-positiveness. Surface receptor expression was measured as the geometric mean fluorescence intensity (GMFI).

Quantitative RT-PCR array

Total RNA was primarily isolated using TRIzol reagent (Invitrogen, California, USA) followed by a silica membrane kit from SuperArray Bioscience (ArrayGrade™ Total RNA Isolation Kit). Total RNA quantification was obtained using the Nanodrop device (Thermo Scientific, EUA). Purity and integrity were confirmed by spectrophotometry (A260/A280 ratio) and electrophoresis (1.5% agarose gel containing ethidium bromide), respectively. Equal amounts of RNA from three different donors were mixed for each experimental condition, and a final amount of 750 ng of RNA was used for cDNA synthesis. Samples were treated with a genomic DNA elimination buffer from the kit, and reverse transcription reactions were performed using the RT² First Strand Kit from SuperArray Bioscience according to the manufacturer's protocol. Real-time polymerase chain reactions were performed using the RT² Profiler™ PCR Array from SuperArray Bioscience (for details, see the manufacturer's protocol at <http://www.sabiosciences.com/howpcrarrayworks.php>). For each condition, a total of 84 genes were analyzed for relevant human genes involved in the toll-like receptor pathway (listed in Table 1). Amplification, data acquisition, and melting curve analysis were carried out in an iCycler iQ thermal cycler (Bio-Rad, California, USA), and in each run, every gene was checked for efficiency, threshold point, baseline point and melting curve. To enable comparison between runs, the same threshold was established for all genes and runs. Three genes (B2M, RPL13A and ACTB) were used as internal controls

and the average of their Ct values was used to normalize gene expression ($2^{-\Delta Ct}$) and determine fold change between groups ($2^{-\Delta\Delta Ct}$). Gene expression was considered up-regulated or down-regulated when the fold change was greater than two.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using SPSS 10.1.3 software (Illinois, USA). Data were subjected to one-way ANOVA with post hoc multiple comparisons Fisher's exact test. A *p* value of 0.05 was considered significant. Kolmogorov-Smirnov tests were used to check the data for normality.

Results

Induction of LPS tolerance

Tolerance was successfully induced by pre-incubating PBMC with 0.1 and 1.0 ng/mL LPS for 6, 24 and 48 h before challenging the cells with 100 ng/mL LPS. Based on the results of these experiments, pre-incubation with 1.0 ng/mL LPS for 48 hours followed by challenge with 100 ng/mL LPS were chosen for further experiments. Under these conditions, we observed low residual activation by LPS pre-incubation (LPS-Medium), whereas TNF- α production was notably high in challenged cells (Medium-LPS) (positive control) and diminished in pre-incubated and challenged cells (LPS-LPS) (tolerance) (Figure 2).

LPS pretreatment does not modulate TLR4 and CD14 expression on the surface of monocytes

To investigate whether tolerance to LPS was influenced by modulation of cell surface receptors induced by the LPS pre-exposure, the expression of TLR4 and CD14 was evaluated on the surface of monocytes following stimulation with increasing doses of LPS. No differences in TLR4 and CD14 expression were observed between conditioned (0.1, 1 and 10 ng/mL of LPS) and un-conditioned cells after 48 h of incubation, demonstrating that tolerance was not due to diminished capacity of the cell for sensing LPS (Figure 3).

LPS-induced gene expression

LPS challenge (Medium-LPS) modulated the expression of 61 out of the 84 genes examined; of those 61 genes, 36 were up-regulated and 25 were down-regulated compared to their expression levels in un-stimulated cells (Medium-Medium) (fold change >|2|). Expression of the 23 remaining genes was not influenced by LPS (Medium-LPS). The kinetics of gene expression were assessed after 2, 6, and 24 h. The expression levels of most of the genes examined peaked between 2 and 6 h (Table 1).

Effects of LPS-pretreatment on gene expression

Genes were assigned to one of three groups based on the way in which their expression was affected by pretreatment of cells with LPS for 48 hours before LPS challenge (LPS-LPS). LPS-induced changes in expression of genes in the first group were reversed by pretreatment with LPS, while LPS-induced changes in expression of genes in the second group were not affected by LPS pretreatment, and LPS-induced changes in expression of genes in the third group were exacerbated by LPS pretreatment. The first group includes both genes up-regulated by LPS (Medium-LPS) that decreased in expression when the cells were pretreated before LPS challenge (LPS-LPS) (Figure 4A) and genes down-regulated by LPS (Medium-LPS) that increased in expression when the cells were pretreated before LPS challenge (LPS-LPS) (Figure 4B). The second group comprises genes up-regulated or down-regulated by LPS challenge (Medium-LPS) that were not affected by pretreatment (LPS-LPS) ($-2 < \text{fold change} < 2$) (Figure 4C and D, respectively). The third group includes genes that were either up-regulated or down-regulated upon LPS challenge and were further up-regulated or down-regulated when cells were pretreated before LPS challenge (Figure 4E and F, respectively). Genes in the first group were classified as tolerizeable genes (T) because they respond to LPS pretreatment by reversing the effects of LPS challenge, whereas genes in the second and third groups were classified as non-tolerizeable genes (NT) because they fail to respond to LPS pretreatment or respond to LPS pretreatment by exacerbating the effects of LPS challenge (Figure 5).

We considered that absent or low gene expression induced by LPS challenge (Medium-LPS) might not be suitable to evaluate whether LPS pretreatment reversed the effect of LPS challenge. Therefore, the analysis of tolerance for each gene was performed at their optimum expression when stimulated with LPS (Medium-LPS) (Table 1), evaluated in kinetics of 2, 6 and 24 h.

Surface receptor and adaptor expression

Among genes encoding surface receptors and adaptors, TLR1, TLR4, TLR5, TLR7, TLR9, TNFRSF1A, CD180, LY86, CLEC4E and CD86 were not tolerized, whereas TLR3, TLR6, TLR8, TLR10, CD14, MD-2, SIGIRR and CD80 were tolerized. Except MD-2 and CD80, mRNA expression of tolerized genes was increased when cells were pretreated with LPS before LPS challenge (LPS-LPS), indicating that the LPS challenge-induced inhibition of these genes was reversed by LPS pretreatment. LPS challenge-induced changes in the expression of non-tolerized genes were not reversed by LPS pretreatment. Most of these genes were inhibited after LPS challenge with or without LPS pretreatment, but CLEC4E was up-regulated following LPS challenge with or without LPS pretreatment.

MyD88-dependent pathway

Except for RIPK2, genes involved in the MyD88-dependent pathway upstream of NF- κ B and mitogen-activated protein kinases (MAPKs) (TIRAP, MyD88, IRAK2, TOLLIP, UBE2V1, and TAK1) were not tolerized; the pattern of LPS challenge-induced up-regulation or down-regulation of these genes was maintained in cells that were pretreated with LPS before LPS challenge.

Impaired NF- κ B signaling in LPS-tolerant PBMC

Genes encoding NF- κ B (NF κ B1, NF κ B2 and RELA) and its activator complex (CHUCK) were tolerized. Despite high expression of CHUCK in tolerant cells (LPS-LPS), the expression of NF κ B1, NF κ B2 and RELA were decreased when cells were pretreated before LPS challenge (LPS-LPS). Moreover, an inhibitor of the NF- κ B complex (NF κ BIA) was not tolerized and maintained high levels of mRNA expression. NR2C2, which represses an inhibitor of NF- κ B activity, was tolerized and down-regulated. In addition, NF κ BIL1, a gene with uncertain function, was tolerized as indicated by the pretreatment-induced reversal of its LPS challenge-induced up-regulation. Taken together, these results show impaired signaling through the NF- κ B pathway during tolerance (LPS-LPS).

Preservation of p38 and inhibition of JNK and ERK MAPK cascades in LPS-tolerant PBMC

The mitogen-activated protein kinases (MAPK) pathway included tolerant (MAP3K1, MAPK8, FOS and JUN) and non-tolerant genes (MAP2K3, MAP2K4, HRAS and ELK-1). c-Jun NH(2)-terminal kinase (JNK)-related genes (MAP2K4, MAPK8 and JUN) and a gene involved in the extracellular signal-

regulated kinase (ERK) pathway (HRAS) had decreased expression in LPS-pretreated cells, while genes involved in the p38 pathway (MAP2K3, FOS) showed increased expression during LPS tolerance (LPS-LPS). In addition, ELK-1, which provides signals for cell growth and survival, was up-regulated upon both LPS challenge (Medium-LPS) and tolerance (LPS-LPS). ELK-1 encodes a transcription factor activated by different kinases; in this case, it may have been activated by the p38 cascade. These results demonstrate tolerance-induced regulation of MAPK pathway-related genes as indicated by inhibition of the JNK and ERK cascades and preservation of the p38 cascade. Furthermore, this distinct regulation can help to explain the differences observed in expression of genes encoding inflammatory mediators.

Attenuated TRIF-dependent pathway signaling

Genes encoding members of the TRIF-dependent pathway (TRIF and IFNB1) were tolerized; the LPS challenge-induced up-regulation of these genes was reversed by LPS pretreatment, demonstrating an inhibition of this pathway in tolerant cells (LPS-LPS). In contrast, the gene encoding a repressor of this pathway, SARM-1, was not tolerized and LPS pretreatment did not affect its LPS challenge-induced down-regulation. PELI-1, a protein responsible for one of the mechanisms by which the TRIF-dependent pathway intersects with the MYD88-dependent pathway, was not tolerized and maintained a high level of gene expression in LPS-pretreated cells, suggesting that this pathway attempted to activate the signals downstream of LPS.

CASP8 and PKR gene expression

CASP8, which induces cell death, was tolerized and up-regulated, while TNFR1 was inhibited and not tolerized. It has been reported that CASP8 can also activate the NF- κ B pathway (Maelfait and Beyaert 2008). Thus, another possible explanation for the reversion of CASP8 inhibition might be its attempt to activate the NF- κ B pathway in tolerant cells (LPS-LPS).

In addition, EIF2AK2, often referred to as PKR, was expressed at high levels in LPS-stimulated (Medium-LPS) and LPS-tolerant cells (LPS-LPS). PKR has been associated with several cellular functions (Garcia *et al.*, 2006), and a role for PKR in the TLR4 signaling pathway has been proposed (Horng *et al.*, 2001).

Expression of inflammatory mediators is distinctly modulated

Some inflammatory mediators were tolerized (TNF- α , LTA, IL12A, IL8, CCL2 and CXCL10), while others were not tolerized (IL1A, IL1B, PTGS2, IL6, IL10, HSPA1A, CSF2 and CSF3). All tolerant genes were up-regulated by LPS (Medium-LPS), and this effect was reversed when cells were pretreated with LPS (LPS-LPS), resulting in diminished gene expression. Among the non-tolerant genes, all but HSPA1A were up-regulated by LPS, and this effect was maintained in cells pretreated with LPS.

Discussion

In this study, we show that in cells made tolerant to LPS, expression of genes encoding proteins involved in TLR signaling was modulated by pretreatment with LPS. Pretreatment with LPS reversed the effects of LPS challenge on these tolerant genes but did not affect the LPS challenge-induced modulation of non-tolerant genes. The biological effect of reprogramming gene expression during tolerance depends on the effect LPS challenge-induced gene up-regulation or down-regulation. We report that tolerant cells have attenuated/inhibited expression of TRIF, NF- κ B, ERK and JNK cascade-related genes but enhanced expression of p38 cascade-related genes.

In spite of the differences among the tolerance models (nature of stimulus, dose of LPS pretreatment, duration of pretreatment, and type of cell) and the responses of tolerized cells to LPS challenge, it is clear that the development of a tolerance phenotype leads to regulation of the inflammatory response (Fan and Cook, 2004). In our model, we were able to induce tolerance by pretreating cells with low doses of LPS (0.1 ng/mL), as demonstrated by suppressed TNF- α production upon LPS challenge. Although pretreatment with high doses of LPS induced a similar phenotype, it is possible that high doses also involve depletion of cell machinery necessary to respond to a second dose of LPS. In addition, the chosen time interval of 48 h between LPS pretreatment and challenge guaranteed low residual cell activation; this was demonstrated by the similar amounts of TNF- α present in the supernatants of LPS-conditioned (LPS-Medium) and control cells (Medium-Medium).

Modulation of the expression of cell surface receptors by LPS may account for the altered response to a second LPS stimulus and even development of endotoxin tolerance. Decreased expression of surface receptors in cells pretreated with LPS has been associated with the development of an

endotoxin tolerance phenotype in mouse peritoneal macrophages (Nomura *et al.*, 2000). Studies of CD14 expression on the cell surface of human and mice cells reported either up-regulation (Labeta *et al.*, 1993) or unchanged expression upon LPS pretreatment (Nomura *et al.*, 2000). The effects of LPS pretreatment on TLR4 expression are less clear; various studies have reported that LPS pretreatment results in up-regulation (Mirlashari and Lyberg 2003), down-regulation (Nomura *et al.*, 2000; Medvedev *et al.*, 2002) or unchanged expression (Adib-Conquy and Cavaillon 2002) of TLR4.

In our model, we found no difference in monocyte surface expression of TLR4 and CD14 between pretreated and cells that were not pretreated, demonstrating that tolerance was not due to diminished capacity of the cell to sense LPS and trigger downstream signals. Most reports demonstrating LPS-induced modulation of mRNA or protein expression of cell surface receptors involved pretreatment with higher doses of LPS for shorter periods of incubation than our protocol, and in these studies, the expression of surface receptors eventually returned to normal levels. Thus, the lack of LPS-induced cell surface receptor modulation in our experiments may be a result of the low concentration of LPS used for pretreatment and the long time of incubation used in our model.

Further supporting the idea that tolerance is not due to down-regulation of cell surface receptors, overexpression of TLR4 and CD14 failed to prevent endotoxin tolerance in CHO cells (Medvedev *et al.*, 2001) or in 293T/CD14/TLR4/MD-2 cells (Medvedev and Vogel 2003). Moreover, Tominaga and colleagues measured LPS uptake by tolerant macrophages and found enhanced activity compared to normal cells (Tominaga *et al.*, 1999). Taken together, these results show that modulation of surface receptor expression cannot account for LPS-induced tolerance and that other mechanisms involved in the LPS-mediated signal transduction must be considered (Dobrovolskaia and Vogel 2002). For a better understanding of these mechanisms, we investigated the expression of 84 genes involved in the signal transduction mediated by toll-like receptors in peripheral blood mononuclear cells made tolerant to LPS. Gene expression was tested at 2, 6 and 24 hours after LPS challenge, allowing us to analyze the kinetics of expression of each gene.

LPS stimulation results in either up-regulation or down-regulation of a large number of genes (Calvano *et al.*, 2005). Tolerance has been discussed as a phenomenon in which up-regulation of LPS-induced gene expression (Medium-LPS) can be either inhibited (tolerizeable genes) or maintained (non-tolerizeable genes) after pre-exposure to small doses of LPS; however, we are unaware of any published reports that discuss tolerance in the context of LPS-down-regulated genes (Medium-LPS). In the present

study, we observed that genes inhibited by LPS (Medium-LPS) can also be modulated by LPS pretreatment (LPS-LPS). Although some authors have reported this phenomenon, a biological interpretation is lacking. We show that the repression of these genes caused by LPS (Medium-LPS) can be either reversed or maintained when cells are pretreated with LPS (LPS-LPS). In the first case, tolerance occurs as a result of an increase in gene expression, such as that observed for CD14, CASP8 and MAP3K1 (Figure 4B), while in the second case it occurs as a result of an inhibition of gene expression, such as that observed for HRAS, MAP2K4 and TIRAP (Figure 4D).

Among genes encoding surface receptors and their adaptors, pre-exposure to LPS before LPS challenge (LPS-LPS) resulted in tolerization of CD14 and MD-2 but not of TLR4. The down-regulation of CD14 expression induced by LPS (Medium-LPS) was reversed by LPS pretreatment (LPS-LPS), resulting in its up-regulation. MD-2 was up-regulated upon LPS challenge, and this LPS challenge-induced modulation was reversed by LPS pretreatment. TLR4 was down-regulated upon LPS challenge with or without LPS pretreatment. These findings suggest that after LPS pretreatment and challenge, cells attempt to recognize LPS through CD14, but signal transduction, which requires TLR4 and MD2, is still disrupted. In accordance with the tolerance model, in a recent study performed in PBMC from patients with sepsis, severe sepsis and septic shock, we demonstrated increased expression of CD14 expression in patients compared to healthy controls. In contrast, we found enhanced expression of TLR4 and MD2 (Salomao *et al.* 2009). mRNA and protein expression of CD14, TLR4 and MD2 have been reported to be enhanced, preserved or inhibited in different LPS tolerance experiments and in septic patients (Hartert *et al.*, 2004; Brunialti *et al.*, 2006; Mages *et al.*, 2007).

TLR4 signals are negatively modulated by other cell surface proteins such as single immunoglobulin IL1R-related molecule (SIGIRR), a member of the TLR/IL-1R superfamily. LPS pretreatment caused reversion of LPS-induced modulation of SIGIRR, resulting in increased levels of expression of SIGIRR. These findings are in agreement with those from septic patients, in whom SIGIRR mRNA expression was enhanced (Adib-Conquy *et al.*, 2006). Attenuation of TLR4 signaling in tolerant cells may prevent further damage caused by persistent infection.

Except for RIPK2, genes involved in the MyD88-dependent pathway upstream of NF- κ B and MAPK were not tolerized. Thus, LPS pretreatment did not reverse the pattern of gene expression observed when cells were stimulated with LPS, demonstrating that tolerance did not affect this part of the signaling cascade.

In contrast, genes encoding the NF- κ B complex were tolerized and inhibited, while a repressor of NF- κ B was induced and not tolerized. Expression of NR2C2, which favors the transcription of NF- κ B genes, was impaired. Together, these results reflect impaired signal transduction through this pathway. Accordingly, studies in murine peritoneal macrophages (Bohuslav *et al.*, 1998) and human monocytic cell lines (Ziegler-Heitbrock 2001) made tolerant to LPS demonstrated impaired NF- κ B activation and an increase in the inactive NF- κ B p50 homodimer of NF- κ B. In addition, a study of septic patients demonstrated that NF- κ B expression in mononuclear cells resembles that observed during LPS tolerance (Adib-Conquy *et al.*, 2000). Our study of the TLR signaling pathway in septic patients (Salomao *et al.*, 2009) strongly supports these results by demonstrating down-regulation of all genes encoding the NF- κ B complex and up-regulation of the repressor of NF- κ B in septic patients. Moreover, a new role for NF- κ B p50 homodimers has been recently proposed by Lawrence *et al.* (Lawrence *et al.*, 2001), suggesting that their predominance may suppress the expression of inflammatory genes such as IL-12 and TNF- α and promote the expression of genes including IL-10 and COX2. This hypothesis is in agreement with our finding that IL-12 and TNF- α are repressed and tolerized, while IL-10 and PTGS2 (COX2) are inducible and not tolerized. PTGS2, known as a pro-inflammatory mediator during early phases of inflammation, has been reported to have anti-inflammatory effects at later phases (Gilroy *et al.*, 1999), thus accounting for resolution of inflammation. This may explain the maintenance of high levels of PTGS2 during tolerance in our experiments. Furthermore, prostaglandin production remains active in septic patients, which may contribute to decreased cytokine production in these patients (Choudhry *et al.*, 1999). Hence, the presence of PTGS2 in tolerant cells may be partially responsible for the down-regulation of some cytokines in our model.

Attenuated or suppressed signaling through the MAPK pathway are widely reported in diverse models of tolerant cells (Tominaga *et al.*, 1999; Medvedev *et al.*, 2002). In our study, genes encoding members of the MAPK pathway included tolerant and non-tolerant, suppressed and inducible genes; members of the JNK and ERK cascades were predominantly inhibited, while members of the p38 pathway were activated. Accordingly, a study by Mendez *et al.* suggests that activation of p38 MAPK is necessary for LPS tolerance induction in rat peritoneal macrophages (Mendez *et al.*, 2000). Similar results were found in trauma patients, who showed higher levels of phosphorylated p38 than healthy volunteers (Adib-Conquy *et al.*, 2003). We suggest that p38 cascade preservation may account for the up-regulation of some mediators during tolerance through a mechanism using ELK-1 and FOS transcription factors and

activators of p38, such as MAP2K3, TAK1, MAP3K1, which are up-regulated in tolerant cells. Accordingly, ELK-1, FOS, MAP2K3 and TAK1 were preserved or up-regulated in septic patients compared to healthy controls in a previous study from our group, while JUN and its activator MAP2K4 were down-regulated (Salomao *et al.*, 2009). In addition, Frevel *et al.* described 42 novel AU-rich genes that show p38-dependent mRNA stabilization in THP-1 cells treated with LPS, a mechanism implicated in the regulation of cell growth, differentiation and immune response (Frevel *et al.*, 2003). Our finding that the p38 pathway was preserved during tolerance may help us to explain why some genes showed high levels of mRNA expression, while others did not; there are parallels between the genes up-regulated in our study and p38-dependent mRNA stabilized genes (COX2, IL1A, and IL1B) and between genes down-regulated in our study and p38-independent mRNA stabilized genes (TNF, LTA, JUN, IFN- β , and IRF3).

Studied genes from the TRIF-dependent pathway were tolerized and inhibited after pretreatment and challenge with LPS; this was observed as a reversal of LPS-induced gene up-regulation (Medium-LPS). These results indicate that this pathway and its products are inhibited during endotoxin tolerance, although this pathway is under-represented in our array. In agreement with our findings, Piao *et al.* recently demonstrated in elegant experiments that LPS-induced TLR4-TRIF and TRIF-TBK1 associations, TBK-1 kinase activity and IRF3 activation were inhibited in endotoxin-tolerant human monocytes (Piao *et al.*, 2009). Although other studies also show inhibition of this pathway in tolerant cells, contrasting results have been reported in the literature (Biswas and Lopez-Collazo, 2009). Hence, further studies are required to reach a better understanding of the role of the TRIF pathway in inflammation and endotoxin tolerance.

PELI1 has been described to be an E3 ubiquitin ligase that is specifically required for TRIF-induced RIP1 ubiquitination and IKK activation (Chang *et al.*, 2009). The TRIF-dependent pathway was blocked and PELI1 was up-regulated and not tolerized in our experiments, suggesting an alternative mechanism by which the TRIF-dependent pathway may activate the signals triggered by LPS in tolerant cells.

Disrupted activation of adaptive immunity has been described in human LPS-tolerant monocytes (Wolk *et al.*, 2000; del Fresno *et al.*, 2009), consistent with the decreased MHC class II and co-stimulatory molecule gene expression observed in these cells. Accordingly, we found that genes related to adaptive immunity were inhibited in tolerant cells. The co-stimulatory molecules CD80 and CD86 and the

Th1 cytokine IL12 were expressed at lower levels in tolerant cells than in LPS-challenged cells that were not pretreated with LPS; this was a result of either reversal or maintenance of the effects of LPS. CD180 (RP105) and its adaptor LY86 (MD-1), proteins mediating inhibition of TLR4 signaling that are present on the surface of B cells (Divanovic *et al.*, 2005), were inhibited under both conditions, Medium-LPS and LPS-LPS. These findings are in agreement with previous findings in cells from septic patients, both at level of gene expression (Salomao *et al.*, 2009) and surface HLA-DR protein expression (Salomao *et al.*, 2002).

Regulation of expression of genes related to apoptosis, including TNFR1, CASP8, PKR and IRF1, is somewhat unclear in our tolerance model. Upon LPS challenge, TNFR1 and CASP8 were down-regulated, and LPS pretreatment reversed the inhibition of CASP8, but did not affect TNFR1 repression. PKR was up-regulated by LPS, and this was maintained in LPS-pretreated cells, while the LPS challenge-induced up-regulation of IRF1 was reversed in tolerant cells. Hence, our results are not conclusive regarding apoptosis.

Of note, CASP8 and PKR are involved in several other cellular functions (Garcia *et al.*, 2006; Maelfait and Beyaert 2008) that may take place in the context of tolerance. In addition to the proapoptotic function of CASP8, it plays a role in embryonic development, monocyte differentiation, T cell activation, B cell survival and activation of NF- κ B, implicating this caspase in cell survival and immune response functions (Maelfait and Beyaert 2008). Hence, a possible explanation for the reversal of CASP8 inhibition in tolerant cells might be an attempt to activate the NF- κ B pathway in tolerant cells and to account for monocyte differentiation, consistent with the high level of CSF2 and CSF3 expression observed in our experiments. PKR, in addition to its well-established role in the cellular response to viral infection, also seems to participate in the TLR4 signaling pathway (Horng *et al.*, 2001). PKR is important in the activation of p38, as demonstrated by diminished p38 MAPK activation and disrupted IL-6 and IL-12 p40 production in PKR-deficient mouse embryonic fibroblasts (MEFs) stimulated with LPS (Goh *et al.*, 2000). The high expression of PKR mRNA in our experiments supports the activation of the p38 cascade in tolerant cells described above.

Cytokines, chemokines and colony stimulating factors were differentially regulated in LPS-tolerant cells. The up-regulation of TNF- α , LTA, IL-12A, IL-8, CCL2, CXCL10 induced by LPS challenge was reversed in tolerant cells, while up-regulation of IL-1A, IL-1B, PTGS2 (COX2), IL-6, IL-10, CSF2 and CSF3 was maintained. The down regulation of CXCL10, CCL2 and IL-8 in tolerant cells is

consistent with control of the inflammatory response by diminishing the recruitment of inflammatory cells such as neutrophils. Impairment of neutrophil migration to the site of infection has been reported in experimental and clinical studies of sepsis (Brown *et al.*, 2006; Alves-Filho *et al.*, 2008). Considering the down-regulation of TNF- α , IL-12A, and the co-stimulatory molecules CD80 and CD86 and the preservation of IL-10 expression, it seems that tolerance-induced reprogramming takes place to control the immune response triggered by monocytes, possibly resulting in decreased activation of macrophages, neutrophils and lymphocytes.

Studies in tolerant cells from humans and mice show decreased expression of several pro-inflammatory cytokines (TNF- α , IL-6, and IL-8), whereas expression of anti-inflammatory mediators is preserved (IL-1ra and IL-10) (Cavaillon and Adib-Conquy, 2006). Interestingly, it has been shown that LPS-induced IL-10 production is regulated by the transcription factor Sp1, which is activated via p38 (Adib-Conquy *et al.*, 2003), providing support for our findings that the p38 cascade was preserved and IL-10 production was enhanced during tolerance.

The pattern of cytokine gene expression found in tolerant cells is reminiscent of the modulation of cytokine production found in cells from septic patients, with preserved IL-10 and colony stimulating factor and diminished TNF- α and IL-12; however, we found preserved expression of IL-1 and IL-6, which are often reported to be diminished in these patients (Cavaillon and Adib-Conquy, 2006). Accordingly, in a previous study evaluating cytokine gene expression in mononuclear cells from septic patients, we observed that the expression of TNF- α was inhibited, whereas IL-10 expression was preserved (Salomao *et al.*, 2009). In addition, we also reported that LPS-induced production of TNF- α was lower in supernatants of PBMC from septic patients than those from healthy volunteers, while no difference was found in IL-10 levels (Rigato and Salomao, 2003). Despite the preservation of the ability of LPS to bind the cell surface, the response of monocytes to LPS was decreased (Salomao *et al.*, 2002).

Corroborating the results that demonstrated cell reprogramming during tolerance, ROS production was preserved and inflammatory cytokine production was inhibited in monocytes made tolerant to LPS (del Fresno *et al.*, 2009). In accordance, we observed increased production of ROS (Martins *et al.*, 2008) and decreased production of pro-inflammatory cytokines (Brunialti *et al.*, 2006) in LPS-stimulated monocytes from septic patients when cells were stimulated with LPS and compared to those from healthy volunteers.

Preserved up-regulation of ELK-1, CSF2 and CSF3 provides evidence that tolerant cells are still signaling for survival, growth, proliferation and development. In addition, CLEC4E has been reported to be a receptor that senses tissue damage (Yamasaki *et al.*, 2008). In the current study, its expression was up-regulated upon LPS stimulation, and this pattern was maintained during tolerance, a result also found by Foster *et al.* (Foster *et al.*, 2007). These findings reinforce the idea that cells continue to sense LPS and signal during tolerance. Indeed, CLEC4E expression was strongly increased in septic patients compared to healthy controls in a previous study from our laboratory (Salomao *et al.*, 2009).

In conclusion, cascades involved in TLR pathway signaling are differentially regulated in tolerant cells as demonstrated by preserved expression of genes involved in the p38 cascade as well as attenuated and inhibited expression of TRIF, NF- κ B, ERK and JNK cascade-related genes. These findings can be explained by the presence of negative regulators of the TLR pathway and epigenetic mechanisms. The differential regulation of these cascades may modulate the up-regulation and down-regulation of inflammatory mediators resulting in cell function reprogramming in tolerant cells, although gene-specific mechanisms are probably also involved at this level, accounting for differential regulation of cascade products, such as TNF- α and IL-10. As pointed out by Foster *et al.* (Foster *et al.*, 2007), because genes involved in a common pathway have different functions, it is reasonable that their expression is differentially regulated.

The presence of tolerant and non-tolerant genes in human mononuclear cells shows that tolerance is a mechanism that modulates the cell's response to LPS, which is not directly controlled by the expression of the LPS receptor complex. Moreover, it becomes clear that tolerance is not synonymous with repression and might also occur through the up-regulation of a previously inhibited gene. Down-regulation of genes probably occurs in an attempt to stop tissue damage caused by excessive inflammation, while mechanisms involved in cell growth and survival are maintained.

Acknowledgements

We are in debt to Ricardo Sobhie Diaz and Ismael Dale Cotrim Guerreiro da Silva from the Genomics Center – Sao Paulo for providing conditions for the gene expression experiments and to Shirley Komninakis for helping with the PCR arrays.

This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Sao Paulo (FAPESP – grants 2006/ 58744-1 and 2007/56860-7)

Nature of each author's contribution:

Marialice Erdelyi Mendes: planned and conducted the experiments; analyzed data and wrote the manuscript.

Giovana Lotici Baggio-Zappia: analyzed data and wrote the manuscript

Milena Karina Coló Brunialti: planned and conducted the experiments; reviewed the manuscript

Maria da Luz Fernandes: conducted the experiments; reviewed the manuscript

Marjorie Marini Rapozo: conducted the experiments; analyzed data and reviewed the manuscript

Reinaldo Salomao: planned and conducted the experiments; analyzed data and wrote the manuscript.

References

Adib-Conquy, M., Adrie, C., Fitting, C., Gattolliat, O., Beyaert, R., Cavaillon, J.M., 2006. Up-regulation of MyD88s and SIGIRR, molecules inhibiting Toll-like receptor signaling, in monocytes from septic patients. *Crit Care Med.* 34, 2377-2385.

Adib-Conquy, M., Adrie, C., Moine, P., Asehnoune, K., Fitting, C., Pinsky, M.R., Dhainaut, J.F., Cavaillon, J.M., 2000. NF-kappaB expression in mononuclear cells of patients with sepsis resembles that observed in lipopolysaccharide tolerance. *Am J Respir Crit Care Med.* 162, 1877-1883.

Adib-Conquy, M., Cavaillon, J.M., 2002. Gamma interferon and granulocyte/monocyte colony-stimulating factor prevent endotoxin tolerance in human monocytes by promoting interleukin-1 receptor-associated kinase expression and its association to MyD88 and not by modulating TLR4 expression. *J Biol Chem.* 277, 27927-27934.

Adib-Conquy, M., Moine, P., Asehnoune, K., Edouard, A., Espevik, T., Miyake, K., Werts, C., Cavaillon, J.M., 2003. Toll-like receptor-mediated tumor necrosis factor and interleukin-10 production differ during systemic inflammation. *Am J Respir Crit Care Med.* 168, 158-164.

Alves-Filho, J.C., de Freitas, A., Spiller, F., Souto, F.O., Cunha, F.Q., 2008. The role of neutrophils in severe sepsis. *Shock* 30 Suppl 1, 3-9.

Beutler, B., Hoebe, K., Du, X., Ulevitch, R.J., 2003. How we detect microbes and respond to them: the Toll-like receptors and their transducers. *J Leukoc Biol.* 74, 479-485.

Biswas, S.K., Lopez-Collazo, E., 2009. Endotoxin tolerance: new mechanisms, molecules and clinical significance. *Trends Immunol.* 30, 475-487.

Bohuslav, J., Kravchenko, V.V., Parry, G.C., Erlich, J.H., Gerondakis, S., Mackman, N., Ulevitch, R.J., 1998. Regulation of an essential innate immune response by the p50 subunit of NF-kappaB. *J Clin Invest.* 102, 1645-1652.

Bone, R.C., Balk, R.A., Cerra, F.B., Dellinger, R.P, Fein, A.M., Knaus, W.A., Schein, R.M., Sibbald, W.J., 1992. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest.* 101, 1644-1655.

Brown, K.A., Brain, S.D., Pearson, J.D., Edgeworth, J.D., Lewis, S.M., Treacher, D.F., 2006. Neutrophils in development of multiple organ failure in sepsis. *Lancet.* 368, 157-169.

Brunialti, M.K., Martins, P.S., Barbosa de Carvalho, H., Machado, F.R., Barbosa, L.M., Salomao, R., 2006. TLR2, TLR4, CD14, CD11B, and CD11C expressions on monocytes surface and cytokine production in patients with sepsis, severe sepsis, and septic shock. *Shock.* 25, 351-357.

Calvano, S.E., Xiao, W., Richards, D.R., Felciano, R.M., Baker, H.V., Cho, R.J., Chen, R.O., Brownstein, B.H., Cobb, J.P., Tschoeke, S.K., Miller-Graziano, C., Moldawer, L.L., Mindrinos, M.N., Davis, R.W., Tompkins, R.G., Lowry, S.F.; Inflamm and Host Response to Injury Large Scale Collab. Res. Program. 2005. A network-based analysis of systemic inflammation in humans. *Nature.* 437, 1032-1037.

Cavaillon, J.M., Adib-Conquy, M., 2006. Bench-to-bedside review: endotoxin tolerance as a model of leukocyte reprogramming in sepsis. *Crit Care.* 10, 233.

Chan, C., Li, L., McCall, C.E., Yoza, B.K., 2005. Endotoxin tolerance disrupts chromatin remodeling and NF-kappaB transactivation at the IL-1beta promoter. *J Immunol.* 175, 461-468.

Chang, M., Jin, W., Sun, S.C., 2009. Peli1 facilitates TRIF-dependent Toll-like receptor signaling and proinflammatory cytokine production. *Nat Immunol.* 10, 1089-1095.

Choudhry, M.A., Ahmad, S., Ahmed, Z., Sayeed, M.M., 1999. Prostaglandin E2 down-regulation of T cell IL-2 production is independent of IL-10 during gram-negative sepsis. *Immunol Lett.* 67, 125-130.

del Fresno, C., García-Río, F., Gómez-Piña, V., Soares-Schanoski, A., Fernández-Ruíz, I., Jurado, T., Kajiji, T., Shu, C., Marín, E., Gutierrez del Arroyo, A., Prados, C., Arnalich, F., Fuentes-Prior, P., Biswas, S.K., López-Collazo, E., 2009. Potent phagocytic activity with impaired antigen presentation identifying lipopolysaccharide-tolerant human monocytes: demonstration in isolated monocytes from cystic fibrosis patients. *J Immunol.* 182, 6494-6507.

Divanovic, S., Trompette, A., Atabani, S.F., Madan, R., Golenbock, D.T., Visintin, A., Finberg, R.W., Tarakhovskiy, A., Vogel, S.N., Belkaid, Y., Kurt-Jones, E.A., Karp, C.L., 2005. Negative regulation of Toll-like receptor 4 signaling by the Toll-like receptor homolog RP105. *Nat Immunol.* 6, 571-578.

Dobrovolskaia, M.A., Vogel, S.N., 2002. Toll receptors, CD14, and macrophage activation and deactivation by LPS. *Microbes Infect.* 4, 903-914.

Escoll, P., del Fresno, C., García, L., Vallés, G., Lendínez, M.J., Arnalich, F., López-Collazo, E., 2003. Rapid up-regulation of IRAK-M expression following a second endotoxin challenge in human monocytes and in monocytes isolated from septic patients. *Biochem Biophys Res Commun.* 311, 465-472.

Fan, H., Cook, J.A., 2004. Molecular mechanisms of endotoxin tolerance. *J Endotoxin Res.* 10, 71-84.

Foster, S.L., Hargreaves, D.C., Medzhitov, R., 2007. Gene-specific control of inflammation by TLR-induced chromatin modifications. *Nature.* 447, 972-978.

Frankenberger, M., Pechumer, H., Ziegler-Heitbrock, H.W., 1995. Interleukin-10 is upregulated in LPS tolerance. *J Inflamm.* 45, 56-63.

Frevel, M.A., Bakheet, T., Silva, A.M., Hissong, J.G., Khabar, K.S., Williams, B.R., 2003. p38 Mitogen-activated protein kinase-dependent and -independent signaling of mRNA stability of AU-rich element-containing transcripts. *Mol Cell Biol.* 23, 425-436.

Galanos, C., Freudenberg, M.A., Katschinski, T., Salomao, R., Mossmann, H., Kumazawa, Y., 1992. Tumor Necrosis Factor and Host Response to Endotoxin. In *Bacterial Endotoxic Lipopolysaccharides*, Ryan, J.L., Morrison, D.C. pp 88-93. CRC Press.

Galanos, C., Freudenberg, M.A., Lüderitz, O., Rietschel, E.T., Westphal, O., 1979. Chemical, physicochemical and biological properties of bacterial lipopolysaccharides. *Prog Clin Biol Res.* 29, 321-332.

García, M.A., Gil, J., Ventoso, I., Guerra, S., Domingo, E., Rivas, C., Esteban, M., 2006. Impact of protein kinase PKR in cell biology: from antiviral to antiproliferative action. *Microbiol Mol Biol Rev.* 70, 1032-1060.

Gilroy, D.W., Colville-Nash, P.R., Willis, D., Chivers, J., Paul-Clark, M.J., Willoughby, D.A., 1999. Inducible cyclooxygenase may have anti-inflammatory properties. *Nat Med.* 5, 698-701.

Goh, K.C., deVeer, M.J., Williams, B.R., 2000. The protein kinase PKR is required for p38 MAPK activation and the innate immune response to bacterial endotoxin. *EMBO J.* 19, 4292-4297.

Härter, L., Mica, L., Stocker, R., Trentz, O., Keel, M., 2004. Increased expression of toll-like receptor-2 and -4 on leukocytes from patients with sepsis. *Shock.* 22, 403-409.

Horng, T., Barton, G.M., Medzhitov, R., 2001. TIRAP: an adapter molecule in the Toll signaling pathway. *Nat Immunol.* 2, 835-841.

Labeta, M.O., Durieux, J.J., Spagnoli, G., Fernandez, N., Wijdenes, J., Herrmann, R., 1993. CD14 and tolerance to lipopolysaccharide: biochemical and functional analysis. *Immunology* 80, 415-423.

Lawrence, T., Gilroy, D.W., Colville-Nash, P.R., Willoughby, D.A., 2001. Possible new role for NF-kappaB in the resolution of inflammation. *Nat Med.* 7, 1291-1297.

Maelfait, J., Beyaert, R., 2008. Non-apoptotic functions of caspase-8. *Biochem Pharmacol.* 76, 1365-1373.

Mages, J., Dietrich, H., Lang, R., 2007. A genome-wide analysis of LPS tolerance in macrophages. *Immunobiology.* 212, 723-737.

Martins, P.S., Brunialti, M.K., Martos, L.S., Machado, F.R., Assunção, M.S., Blecher, S., Salomao, R., 2008. Expression of cell surface receptors and oxidative metabolism modulation in the clinical continuum of sepsis. *Crit Care.* 12, 25.

Medvedev, A.E., Henneke, P., Schromm, A., Lien, E., Ingalls, R., Fenton, M.J., Golenbock, D.T., Vogel, S.N., 2001. Induction of tolerance to lipopolysaccharide and mycobacterial components in Chinese hamster ovary/CD14 cells is not affected by overexpression of Toll-like receptors 2 or 4. *J Immunol.* 167, 2257-2267.

Medvedev, A.E., Lentschat, A., Wahl, L.M., Golenbock, D.T., Vogel, S.N., 2002. Dysregulation of LPS-induced Toll-like receptor 4-MyD88 complex formation and IL-1 receptor-associated kinase 1 activation in endotoxin-tolerant cells. *J Immunol.* 169, 5209-5216.

Medvedev, A.E., Vogel, S., 2003. Overexpression of CD14, TLR4, and MD-2 in HEK 293T cells does not prevent induction of in vitro endotoxin tolerance. *J Endotoxin Res.* 9, 60-64.

Mendez, C., Jaffray, C., Wong, V., Salhab, K.F., Kramer, A.A., Carey, L.C., Norman, J.G., 2000. Involvement of p38 mitogen-activated protein kinase in the induction of tolerance to hemorrhagic and endotoxic shock. *J Surg Res.* 91, 165-170.

Mirlashari, M.R., Lyberg, T., 2003. Expression and involvement of Toll-like receptors (TLR)2, TLR4, and CD14 in monocyte TNF-alpha production induced by lipopolysaccharides from *Neisseria meningitidis*. *Med Sci Monit.* 9, 316-324.

Nahid, M.A., Pauley, K.M., Satoh, M., Chan, E.K., 2009. miR-146a is critical for endotoxin-induced tolerance: Implication in Innate Immunity. *J Biol Chem.* 284, 34590-34599.

Nomura, F., Akashi, S., Sakao, Y., Sato, S., Kawai, T., Matsumoto, M., Nakanishi, K., Kimoto, M., Miyake, K., Takeda, K., Akira, S., 2000. Cutting edge: endotoxin tolerance in mouse peritoneal macrophages correlates with down-regulation of surface toll-like receptor 4 expression. *J Immunol.* 164, 3476-3479.

Piao, W., Song, C., Chen, H., Diaz, M.A., Wahl, L.M., Fitzgerald, K.A., Li, L., Medvedev, A.E., 2009. Endotoxin tolerance dysregulates MyD88- and Toll/IL-1R domain-containing adapter inducing IFN-beta-dependent pathways and increases expression of negative regulators of TLR signaling. *J Leukoc Biol.* 86, 863-875.

Riedemann, N.C., Guo, R.F., Ward, P.A., 2003. Novel strategies for the treatment of sepsis. *Nat Med.* 9, 517-524.

Rigato, O., Salomao, R., 2003. Impaired production of interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha but not of interleukin 10 in whole blood of patients with sepsis. *Shock.* 19, 113-116.

Salomao, R., Brunialti, M.K., Gomes, N.E., Mendes, M.E., Diaz, R.S., Komninakis, S., Machado, F.R., da Silva, I.D., Rigato, O. 2009. Toll-like receptor pathway signaling is differently regulated in neutrophils and peripheral mononuclear cells of patients with sepsis, severe sepsis, and septic shock. *Crit Care Med.* 37, 132-139.

Salomao, R., Brunialti, M.K., Kallás, E.G., Martins, P.S., Rigato, O., Freudenberg, M. 2002. Lipopolysaccharide-cell interaction and induced cellular activation in whole blood of septic patients. *J Endotoxin Res.* 8, 371-379.

Salomão, R., Martins, P.S., Brunialti, M.K., Fernandes, Mda L., Martos, L.S., Mendes, M.E., Gomes, N.E., Rigato, O., 2008. TLR signaling pathway in patients with sepsis. *Shock Suppl* , 73-77.

Tominaga, K., Saito, S., Matsuura, M., Nakano, M., 1999. Lipopolysaccharide tolerance in murine peritoneal macrophages induces downregulation of the lipopolysaccharide signal transduction pathway through mitogen-activated protein kinase and nuclear factor-kappaB cascades, but not lipopolysaccharide-incorporation steps. *Biochim Biophys Acta.* 1450, 130-144.

Wolk, K., Döcke, W.D., von Baehr, V., Volk, H.D., Sabat, R. 2000. Impaired antigen presentation by human monocytes during endotoxin tolerance. *Blood.* 96, 218-223.

Yamasaki, S., Ishikawa, E., Sakuma, M., Hara, H., Ogata, K., Saito, T., 2008. Mincle is an ITAM-coupled activating receptor that senses damaged cells. *Nat Immunol.* 9, 1179-1188.

Zhang, X., Morrison, D.C., 1993. Lipopolysaccharide structure-function relationship in activation versus reprogramming of mouse peritoneal macrophages. *J Leukoc Biol.* 54, 444-450.

Ziegler-Heitbrock, L., 2001. The p50-homodimer mechanism in tolerance to LPS. *J Endotoxin Res.* 7, 219-222.

Figure Legends

Figure 1. Schematic representation of endotoxin tolerance model and the techniques used for analysis. Tolerance was induced by pre-incubating PBMC with 1.0 ng/mL LPS for 48 h before challenging cells with 100 ng/mL LPS. ELISAs were performed after 48 h to evaluate residual TNF- α production and after 54 h to evaluate tolerance. Expression of TLR4 and CD14 was evaluated on the surface of monocytes by flow cytometry. PCR arrays were performed at 50, 54 and 72 h.

Figure 2. *In vitro* induction of LPS tolerance. Tolerance was induced in PBMC by incubation with 1 ng/mL LPS for 48 hours, cells were challenged with 100 ng/mL LPS for 6 hours and induction of tolerance was confirmed by diminished TNF- α secretion as measured by ELISA. The data are representative of three experiments including a total of eight volunteers. * $p < 0.05$ when comparing Medium-LPS with Medium-Medium. # $p < 0.05$ when comparing Medium-LPS with LPS-LPS.

Figure 3. Effect of LPS pretreatment on the expression of TLR4 and CD14 on the surface of monocytes. LPS-treated (0.1, 1 and 10 ng/mL) and untreated PBMC were stained with anti-TLR4 (PE) and anti-CD14 (PerCP) after incubation for 48 hours, and the expression of these proteins on the cell surface of monocytes was measured by flow cytometry and expressed as the geometric mean fluorescence intensity (GMFI). The data are representative of two experiments with a total of five volunteers.

Figure 4. Patterns of gene expression modulation following pretreatment and challenge with LPS. (A and B): reversal of the effects of LPS, (C and D): maintenance of the effects of LPS, (E and F): exacerbation of the effects of LPS. Medium-Medium: cells were neither pretreated nor challenged, Medium-LPS: cells were only challenged with 100 ng/mL of LPS, LPS-LPS: cells were pretreated with 1 ng/mL of LPS for 48 hours and challenged with 100 ng/mL of LPS. Gene expression was evaluated after 2, 6 and 24 h following LPS-challenge.

Figure 5. Toll-like receptor signaling pathway in LPS-tolerant cells. Tolerance was induced by pretreatment with 1 ng/mL of LPS for 48 hours, and cells were challenged with 100 ng/mL LPS for 2, 6 and 24 h. Genes shown in green were induced and genes shown in orange were repressed. Tolerant genes

are represented with bold boundaries, while non-tolerant genes are represented with normal boundaries. Genes not influenced by LPS stimulation are shown in white. This cell is representative of a mononuclear cell evaluated at the peak of expression of each gene. The web-based Ingenuity Systems Inc. was used to obtain information about the studied genes and their relationships and networks. To obtain further information, please access www.ingenuity.com.

Figures

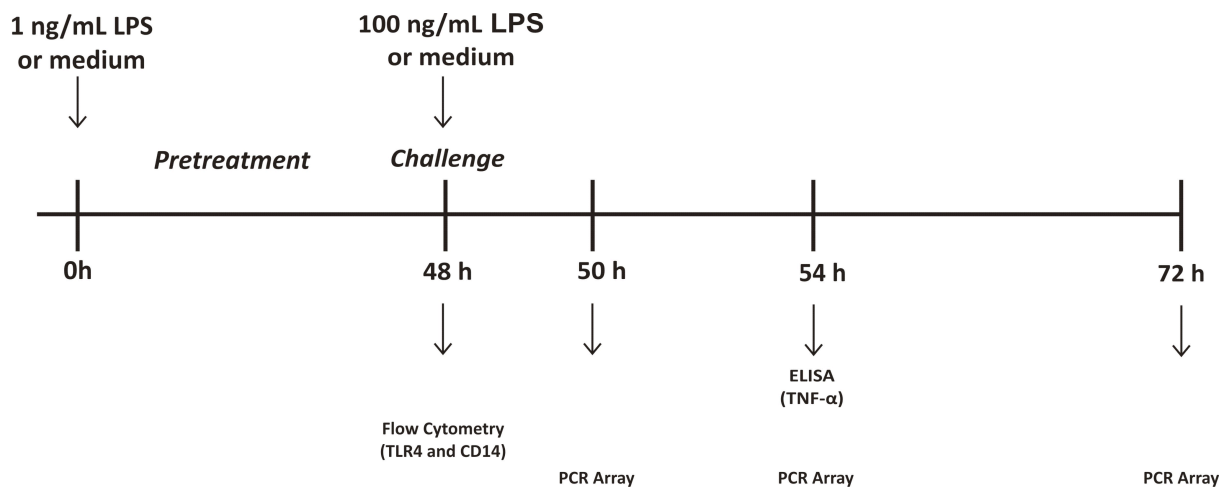


Figure 1.

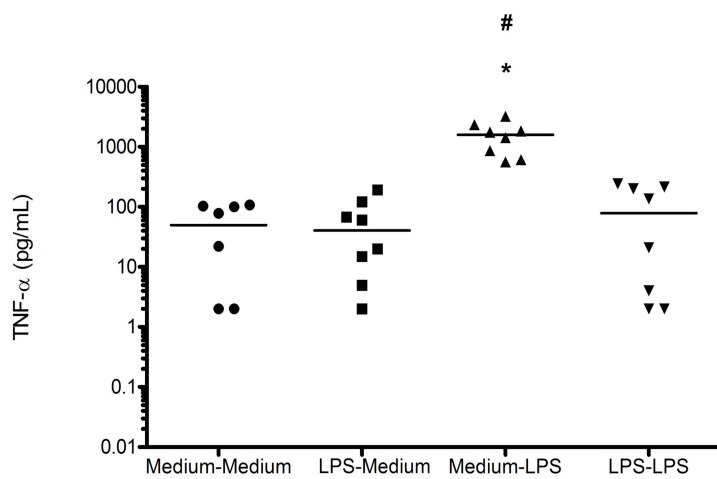


Figure 2.

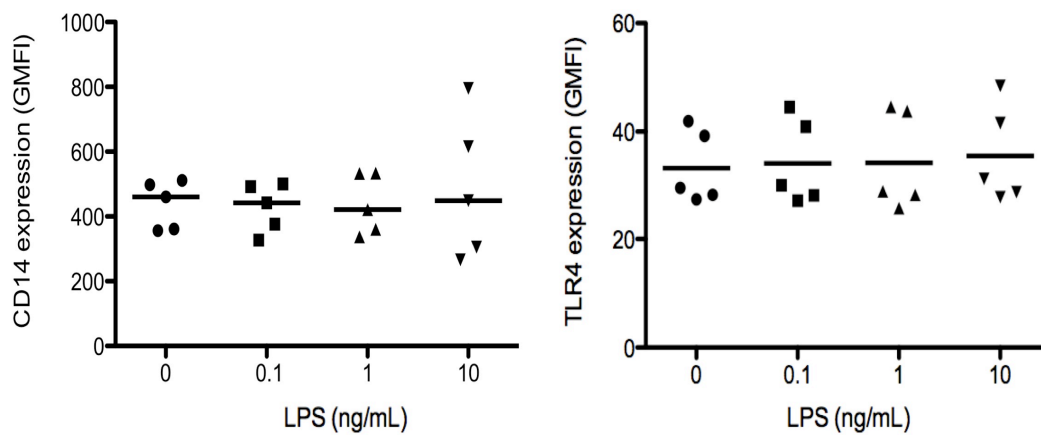


Figure 3.

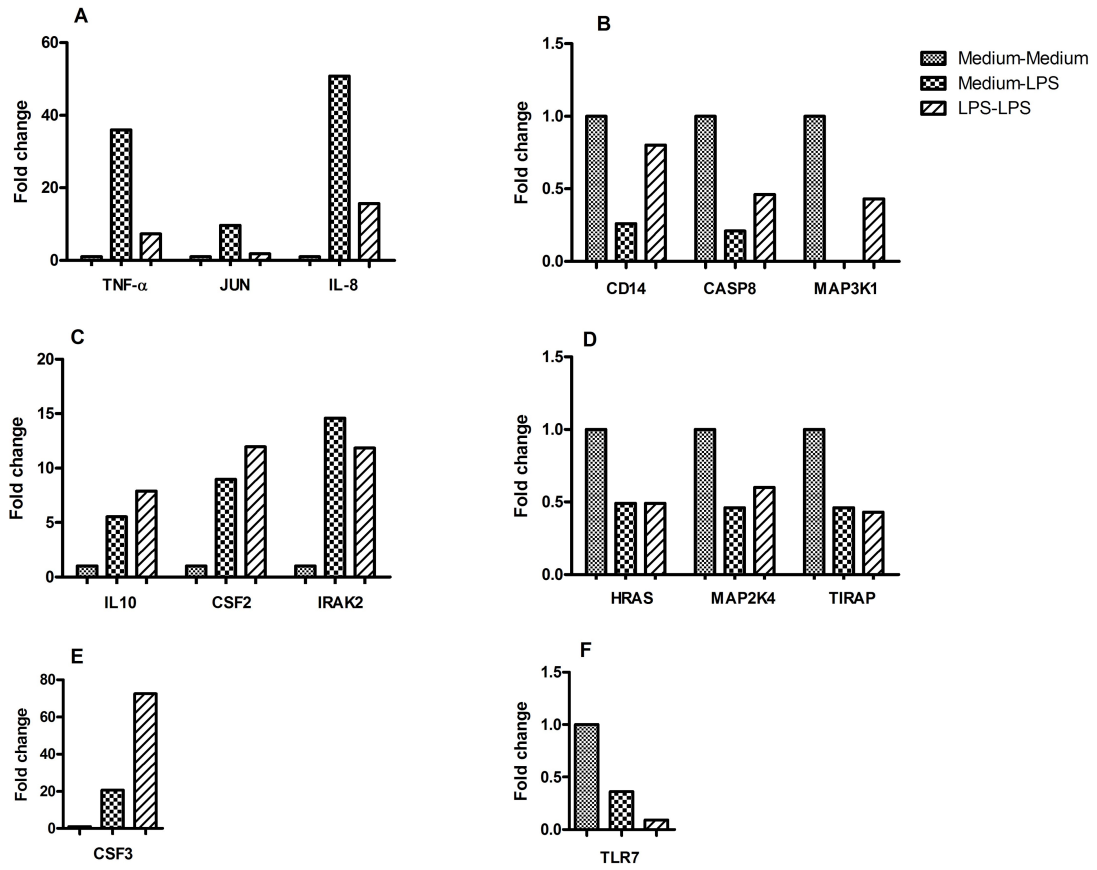


Figure 4.

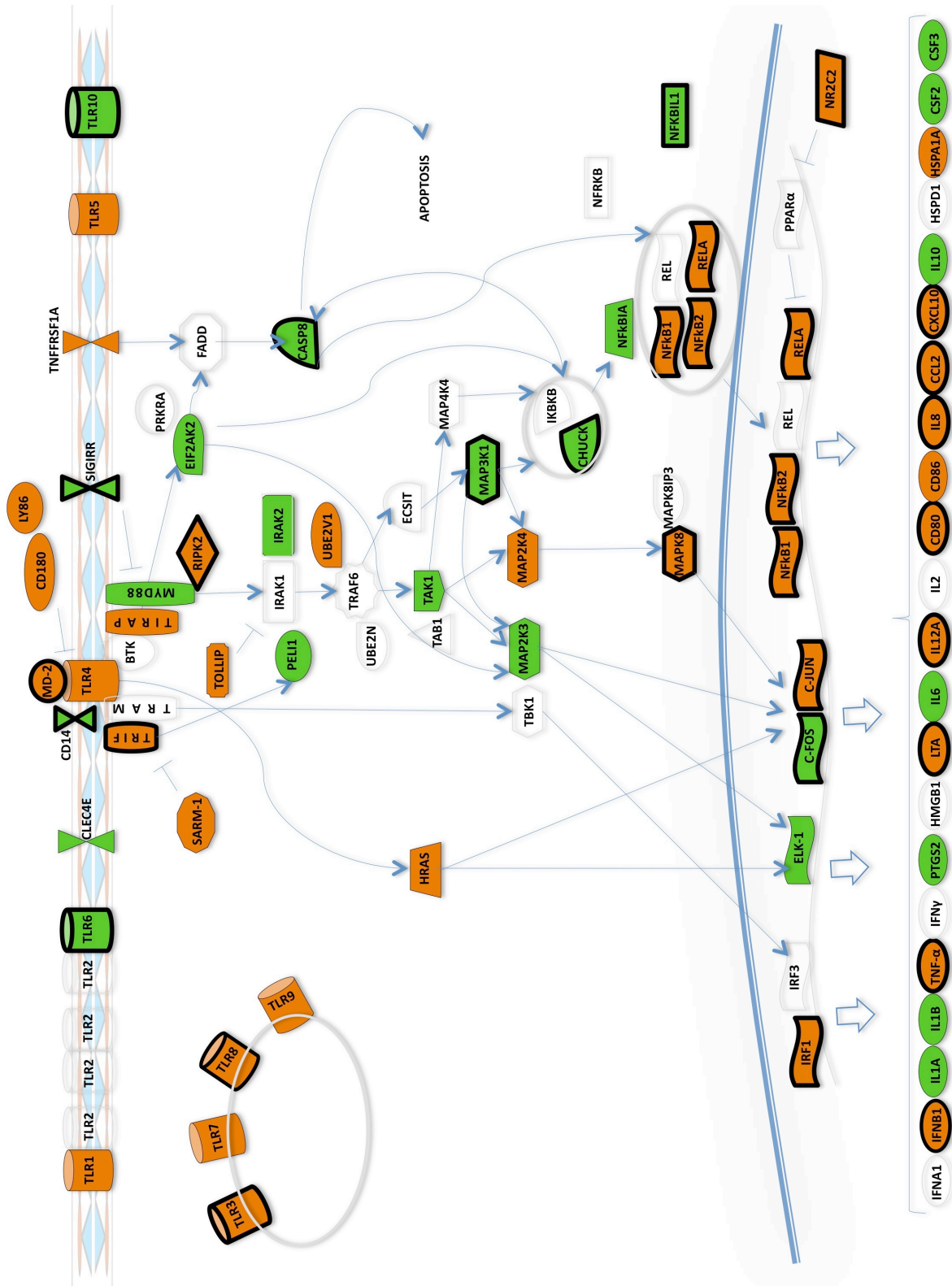


Figure 5.

Tables

Table 1. LPS-induced gene expression (Medium-LPS) and effect of LPS-pretreatment (LPS-LPS) in TLR signaling pathway.

Gene symbol	Description	LPS-induced gene expression		Effect of LPS-pretreatment	
		time of maximum change (h)	Fold change (Medium-LPS / Medium)	Fold change (LPS-LPS / Medium-LPS)	Modulation by LPS-pretreatment
	Bruton agammaglobulinemia tyrosine				
BTK	kinase	-			-
	Caspase 8, apoptosis-related cysteine				
CASP8	peptidase	2	-4,7	2,14	T
CCL2	Chemokine (C-C motif) ligand 2	24	3,32	-3,25	T
CD14	CD14 molecule	6	-3,82	2,76	T
CD180	CD180 molecule	6	-17,55	1,59	NT
CD80	CD80 molecule	24	16,37	-9,85	T
CD86	CD86 molecule	6	-4,39	1,29	NT
	Conserved helix-loop-helix ubiquitous				
CHUK	kinase	2	-3,56	2,3	T
	C-type lectin domain family 4,				
CLEC4E	member E	24	13,3	-2	NT
	Colony stimulating factor 2				
CSF2	(granulocyte-macrophage)	6	8,98	1,2	NT
	Colony stimulating factor 3				
CSF3	(granulocyte)	6	20,63	3,17	NT
CXCL10	Chemokine (C-X-C motif) ligand 10	6	435,54	-122,22	T

	Eukaryotic translation initiation factor				
EIF2AK2	2-alpha kinase 2	6	22,11	-1,91	NT
	ELK1, member of ETS oncogene				
ELK1	family	2	2,24	-1,62	NT
	Fas (TNFRSF6)-associated via death				
FADD	domain	-			-
	V-fos FBJ murine osteosarcoma viral				
FOS	oncogene homolog	6	-4,7	2,41	T
HMGB1	High-mobility group box 1	-			-
	V-Ha-ras Harvey rat sarcoma viral				
HRAS	oncogene homolog	6	-2,05	-1,10	NT
HSPA1A	Heat shock 70kDa protein 1A	6	-3,56	1,70	NT
	Heat shock 60kDa protein 1				
HSPD1	(chaperonin)	-			-
IFNA1	Interferon, alpha 1	-			-
IFNB1	Interferon, beta 1, fibroblast	2	353,77	-21,11	T
IFNG	Interferon, gamma	-			-
	Inhibitor of kappa light polypeptide				
IKBKB	gene enhancer in B-cells, kinase beta	-			-
IL10	Interleukin 10	6	5,53	1,29	NT
	Interleukin 12A (natural killer cell				
	stimulatory factor 1, cytotoxic				
IL12A	lymphocyte maturation factor 1, p35)	2	3,4	-3,48	T
IL1A	Interleukin 1, alpha	2	268,11	-1,62	NT
IL1B	Interleukin 1, beta	2	54,44	1,23	NT
IL2	Interleukin 2	-			-
IL6	Interleukin 6 (interferon, beta 2)	2	615,95	1,07	NT
IL8	Interleukin 8	2	50,80	-3,25	T
	Interleukin-1 receptor-associated				
IRAK1	kinase 1	-			-

	Interleukin-1 receptor-associated					
IRAK2	kinase 2	2	14,59	-1,23	NT	
IRF1	Interferon regulatory factor 1	2	3,91	-2,83	T	
IRF3	Interferon regulatory factor 3	-			-	
JUN	Jun oncogene	2	9,62	-5,28	T	
	Lymphotoxin alpha (TNF					
LTA	superfamily, member 1)	2	4,81	-3,25	T	
LY86	Lymphocyte antigen 86	6	-4,39	-1,91	NT	
LY96	Lymphocyte antigen 96	2	7,29	-2,46	T	
	Mitogen-activated protein kinase					
MAP2K3	kinase 3	2	5,53	-1,87	NT	
	Mitogen-activated protein kinase					
MAP2K4	kinase 4	2	-2,19	1,32	NT	
	Mitogen-activated protein kinase					
MAP3K1	kinase kinase 1	2	-488,88	207,94	T	
	Mitogen-activated protein kinase					
MAP3K7	kinase kinase 7	2	2,76	-2	NT	
MAP3K7I	Mitogen-activated protein kinase					
P1	kinase kinase 7 interacting protein 1	-			-	
	Mitogen-activated protein kinase					
MAP4K4	kinase kinase kinase 4	-			-	
MAPK8	Mitogen-activated protein kinase 8	2	9,62	-8	T	
MAPK8IP	Mitogen-activated protein kinase 8					
3	interacting protein 3	-			-	
	Myeloid differentiation primary					
MYD88	response gene (88)	6	2,76	-1,91	NT	
	Nuclear factor of kappa light					
	polypeptide gene enhancer in B-cells					
NFKB1	1	2	8,38	-2,3	T	
NFKB2	Nuclear factor of kappa light	2	5,16	-3,25	T	

	polypeptide gene enhancer in B-cells 2 (p49/p100) Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells				
NFKBIA	inhibitor, alpha Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells	2	5,92	-1,74	NT
NFKBIL1	inhibitor-like 1 Nuclear factor related to kappaB	2	-5,40	3,48	T
NFRKB	binding protein Nuclear receptor subfamily 2, group	-			-
NR2C2	C, member 2	2	3,4	-3,48	T
PELI1	Pellino homolog 1 (Drosophila) Peroxisome proliferator-activated	2	16,76	-1,41	NT
PPARA	receptor alpha Protein kinase, interferon-inducible double stranded RNA dependent	-			-
PRKRA	activator Prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (prostaglandin G/H synthase and	-			-
PTGS2	cyclooxygenase) V-rel reticuloendotheliosis viral	2	101,59	-1,23	NT
REL	oncogene homolog (avian) V-rel reticuloendotheliosis viral	-			-
RELA	oncogene homolog A (avian) Receptor-interacting serine-threonine	2	4,49	-4	T
RIPK2	kinase 2 Sterile alpha and TIR motif containing	2	14,59	-2,46	T
SARM1	1	2	-2,05	1,23	NT
SIGIRR	Single immunoglobulin and toll-	6	-7,64	3,40	T

	interleukin 1 receptor (TIR) domain				
SITPEC	ECSIT homolog (Drosophila)	-			-
TBK1	TANK-binding kinase 1	-			-
TICAM1	Toll-like receptor adaptor molecule 1	2	5,53	-2,64	T
TICAM2	Toll-like receptor adaptor molecule 2	-			-
	Toll-interleukin 1 receptor (TIR)				
TIRAP	domain containing adaptor protein	2	-2,19	-1,07	NT
TLR1	Toll-like receptor 1	6	-2,19	-1,35	NT
TLR10	Toll-like receptor 10	6	-3,56	2,24	T
TLR2	Toll-like receptor 2	-			-
TLR3	Toll-like receptor 3	6	10,31	-3,56	T
TLR4	Toll-like receptor 4	24	-4,19	2	NT
TLR5	Toll-like receptor 5	24	-4,81	1,52	NT
TLR6	Toll-like receptor 6	6	-5,04	2,58	T
TLR7	Toll-like receptor 7	24	-2,76	-3,73	NT
TLR8	Toll-like receptor 8	24	2,35	-2,30	T
TLR9	Toll-like receptor 9	6	-2,35	1,59	NT
	Tumor necrosis factor (TNF				
TNF	superfamily, member 2)	2	35,92	-4,92	T
TNFRSF1	Tumor necrosis factor receptor				
A	superfamily, member 1A	6	-2,52	1,38	NT
TOLLIP	Toll interacting protein	6	-2,05	1,29	NT
TRAF6	TNF receptor-associated factor 6	-			-
	Ubiquitin-conjugating enzyme E2N				
UBE2N	(UBC13 homolog, yeast)	-			-
	Ubiquitin-conjugating enzyme E2				
UBE2V1	variant 1	24	-3,17	1,52	NT

T: Tolerizeable; NT: Non-tolerizeable

4. CONCLUSÃO

As cascatas envolvidas na sinalização dos TLRs estão diferentemente reguladas em células tolerantes, conforme demonstrado pela expressão preservada de genes envolvidos na cascata da p38, assim como expressão atenuada ou inibida de genes relacionados às cascatas TRIF, NF- κ B, ERK e JNK. Esses achados podem ser explicados pela presença de reguladores negativos da via dos TLRs somado à atuação de mecanismos epigenéticos. A regulação diferencial dessas cascatas pode modular o aumento ou diminuição de expressão de mediadores inflamatórios, resultando em reprogramação das funções celulares na tolerância. Além disso, mecanismos epigenéticos também devem estar presentes neste nível da cascata, contribuindo para a regulação diferencial dos produtos de uma mesma cascata, como TNF- α e IL-10. Conforme demonstrado por Foster e colaboradores, uma vez que genes de uma mesma via de sinalização possuem funções distintas, é um tanto quanto razoável que a expressão destes genes possam ser reguladas separadamente.

A presença de genes tolerantes e não-tolerantes em células mononucleares humanas mostra que a tolerância é um mecanismo que modula a resposta da célula ao LPS, o qual não é controlado diretamente pela expressão do complexo receptor do LPS. Ainda, fica evidente que tolerância não é sinônimo de repressão, podendo ocorrer por meio de aumento de expressão de um gene previamente inibido pelo desafio com LPS. Regulação gênica negativa parece ocorrer na tentativa de conter o dano tecidual causado pela inflamação excessiva, enquanto mecanismos envolvidos no crescimento e sobrevivência celular estão preservados.

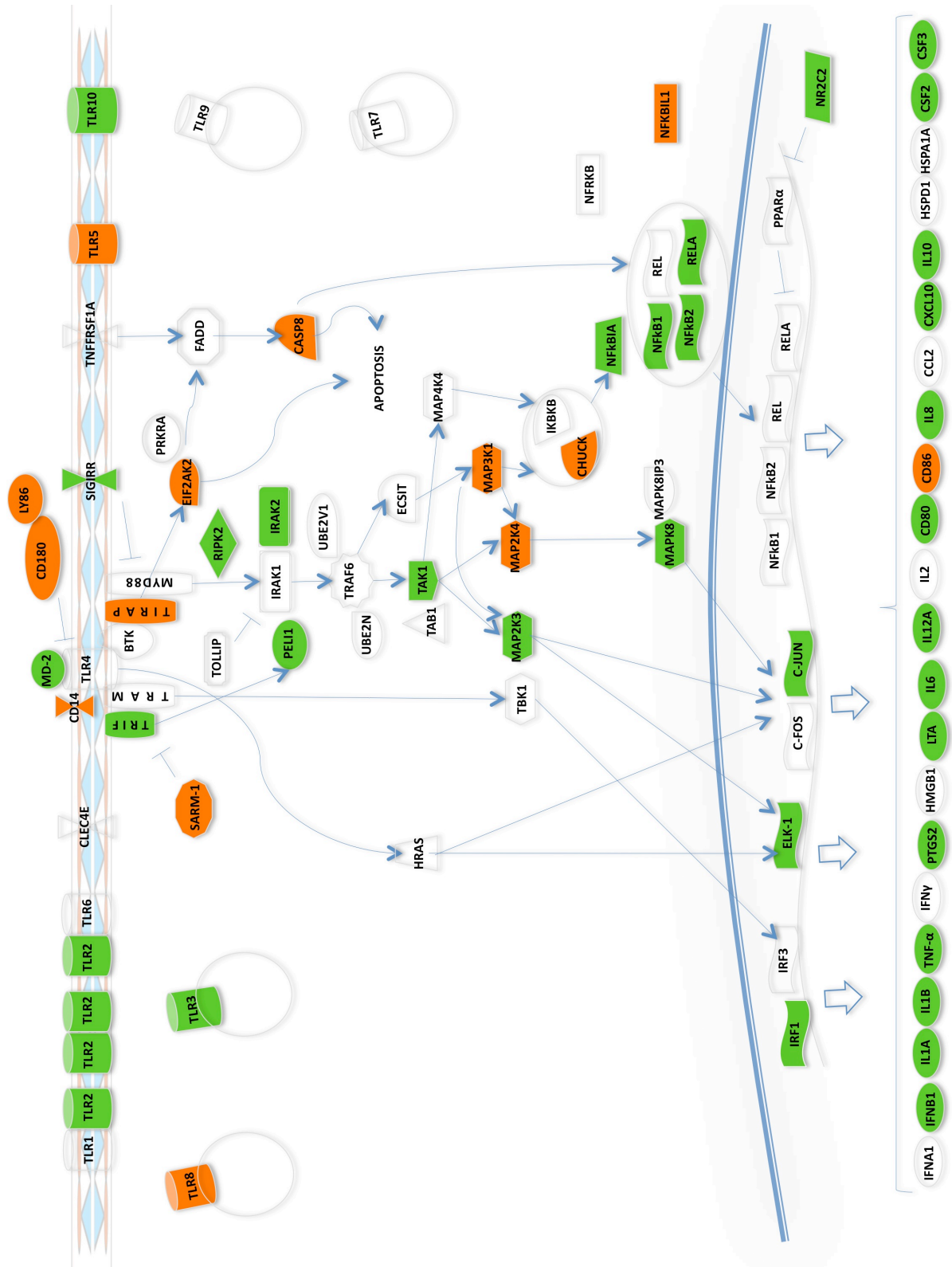
5. ANEXOS

5.1 Resultados Complementares

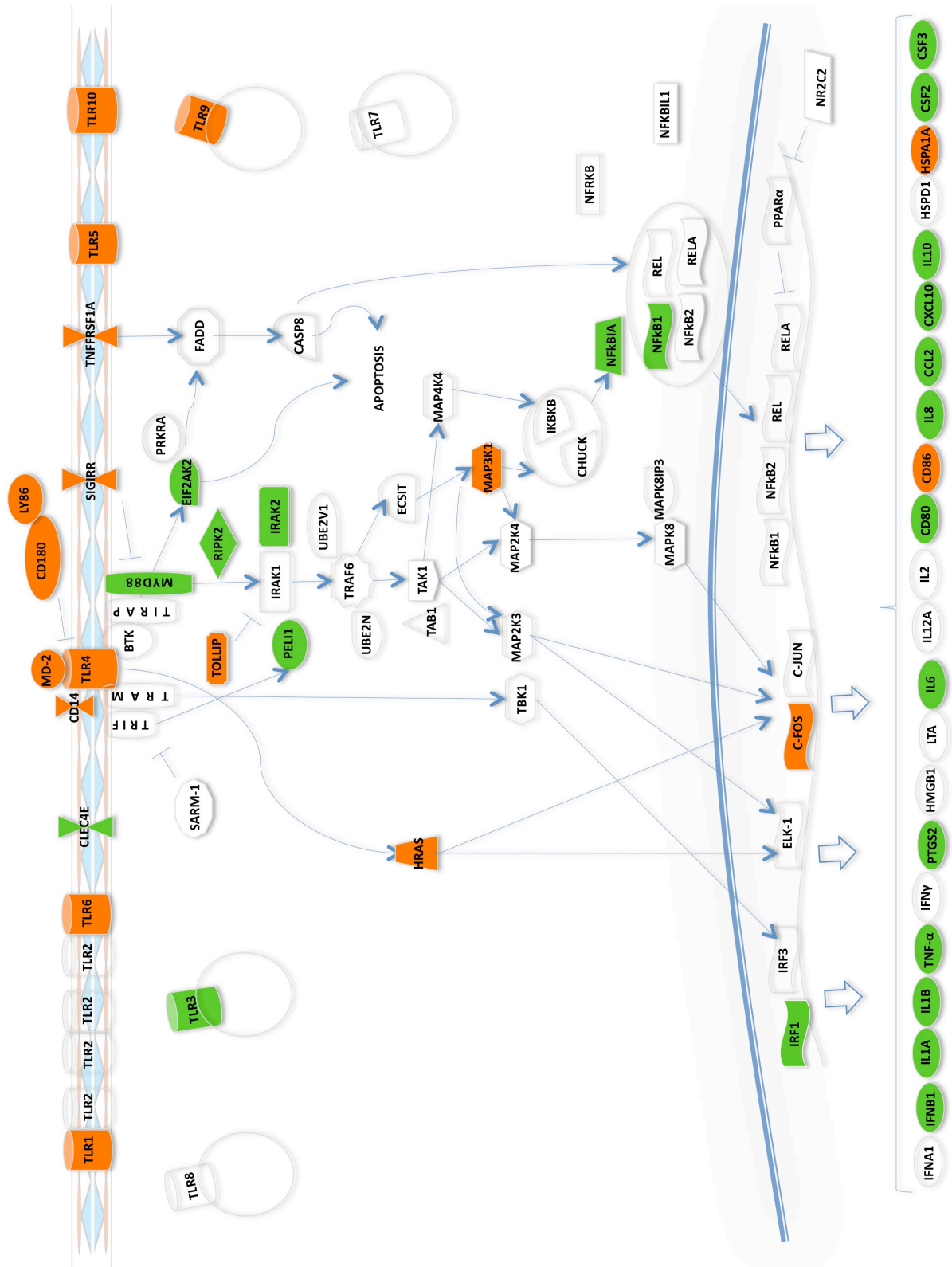
5.1.1. Expressão gênica induzida pelo desafio com LPS (Meio-LPS)

As CMSP foram incubadas em meio de cultura RPMI 10% FCS por 48 horas e então desafiadas com 100ng/mL de LPS. A expressão gênica induzida pelo desafio com LPS foi avaliada em três momentos, 2, 6 e 24 horas após o estímulo. Com 2 horas, o LPS ativou 47 genes, sendo 34 regulados positivamente e 13 regulados negativamente (Figura complementar 1 A). Com 6 horas, observados ativação de 41 genes, 23 com regulação positiva e 18 com regulação negativa (Figura complementar 1 B). Já com 24 horas, somente 24 genes estavam ativados, 17 e 7 com regulação positiva e negativa, respectivamente (Figura complementar 1 C).

A.



B.



C.

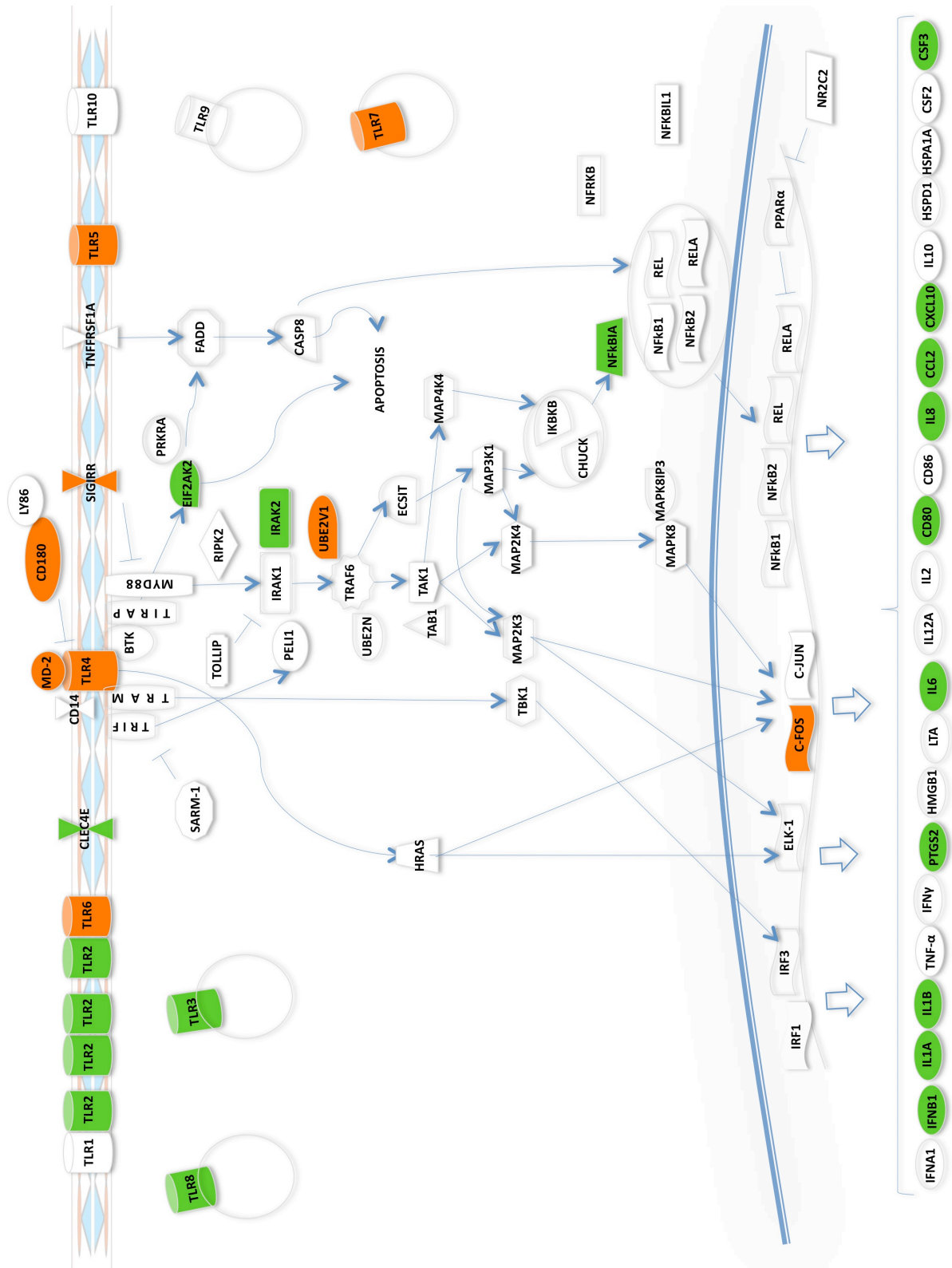


Figura complementar 1. Expressão gênica da via de sinalização dos receptores do tipo Toll. As CMSP foram incubadas por 48 horas e então estimuladas com 100 ng/mL de LPS por: **A)** 2 horas, **B)** 6 horas e **C)** 24 horas. Genes em verde estão regulados positivamente (fold change > 2), enquanto os genes em laranja estão regulados negativamente (fold change < -2). Genes em branco não foram ativados pelo LPS (-2 < fold change < 2).

5.1.2. Padronização do modelo de tolerância

A padronização do modelo de tolerância ao LPS em CMSP contemplou doses de condicionamento de 0,1 e 1ng/mL de LPS seguido de incubação por 6, 24 e 48 horas. Após cada período, as células foram desafiadas com 100ng/mL durante 6 horas. Para avaliação da indução da tolerância ao LPS, foi realizado ELISA para detecção de TNF- α (Figura complementar 2).



Figura complementar 2. Modelo esquemático da padronização do modelo da tolerância ao LPS em CMSP.

Em todas as situações, foi possível induzir tolerância (Figura complementar 3). No entanto, o modelo escolhido utilizou condicionamento com 1ng/mL de LPS por 48 horas. Neste modelo, pudemos observar uma pequena produção residual de TNF- α pelo estímulo de condicionamento, considerável produção de TNF- α nas células somente desafiadas com LPS (controle positivo), e marcante diminuição da produção dessa citocina quando as células foram condicionadas e desafiadas com LPS (Figura complementar 3 C).

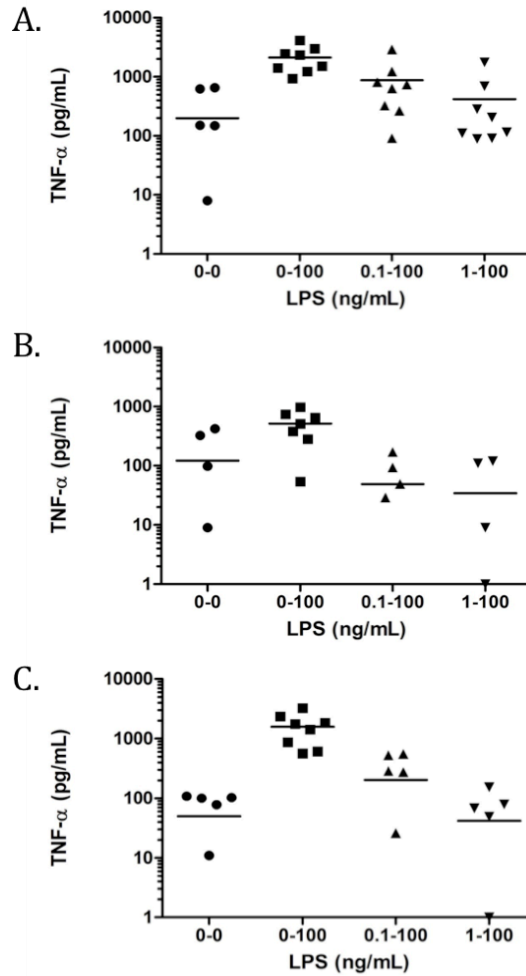


Figura complementar 3. Padronização do modelo de tolerância ao LPS. As CMSP foram condicionadas com 0,1 ou 1 ng/mL de LPS por **A)** 6, **B)** 24, **C)** 48 horas e posteriormente desafiadas com 100 ng/mL de LPS. Após 6 horas foi feito um ELISA para detecção de TNF- α no sobrenadante.

Nos protocolos apresentados a seguir, a indução de tolerância ao LPS contempla apenas a descrição do modelo escolhido, uma vez que os experimentos com células tolerantes foram realizados a partir deste modelo.

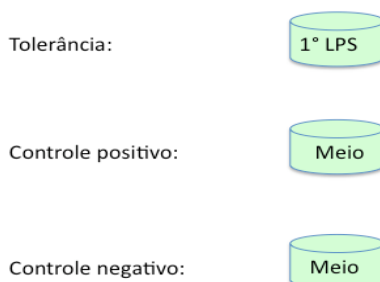
5.2. Protocolos

Separação das células mononucleares do sangue periférico (CMSP)

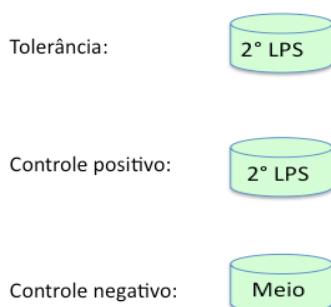
1. Coletar o sangue em tubo à vácuo contendo heparina;
2. Homogeneizar os tubos para não coagular;
3. Transferir o sangue para 1 tubo de 50mL e diluir em parte igual com soro fisiológico estéril;
4. Para cada 35mL de sangue diluído preparar 1 tubo de 50mL com 15mL de Ficoll-Paque PLUS (GEHealthcare, Suécia);
5. Adicionar vagarosamente o sangue diluído ao tubo contendo ficoll. Centrifugar a 500g, *accel* e *brake* 1, 18°C por 20 minutos;
6. Coletar dos tubos a nuvem de células acima do ficoll e transferir para outro tubo de 50mL completando com soro fisiológico;
7. Centrifugar a 500g, 18°C por 10 minutos. Desprezar o sobrenadante;
8. Repetir a lavagem no tubo com 50 mL de soro fisiológico. Centrifugar. Desprezar o sobrenadante;
9. Acrescentar 3 mL de cloreto de amônio, homogeneizar e deixar por 2 minutos. Acrescentar 10mL de meio RPMI com 10% FCS;
10. Centrifugar a 500g, 18°C por 10 minutos. Desprezar o sobrenadante;
11. Ressuspender o botão de células em 10 mL de meio RPMI com 10% FCS
12. Efetuar contagem de células na câmara de Neubauer: 10 μ L da suspensão de células + 90 μ L de *Trypan Blue* (diluição 1:10). Contar pelo menos 2 quadrantes em diagonal;
13. Cálculo: número total de células = (média dos quadrantes)x(diluição da amostra no *trypan blue*)x(volume da suspensão de células)x(10^4);
14. Acertar concentração de células para o desejado.

Indução de tolerância ao LPS

1. Em uma placa de 6 poços, pipetar 2 mL da suspensão de CMSP na concentração de 2×10^6 células/mL em cada poço;
2. Pipetar os estímulos de condicionamento (20 μ L da solução de LPS de 0,1ng/mL para concentração final de 1ng/mL) nos poços adequados, conforme esquema abaixo:



3. Incubar as placas por 48 horas a 37°C e 5% de CO₂;
4. Passadas as 48 horas, pipetar o estímulo de desafio (10 μ L da solução de LPS de 10ng/mL para concentração final de 100ng/mL) nos poços adequados, conforme esquema abaixo:



5. Incubar a 37°C e 5% de CO₂ pelo tempo respectivo a cada protocolo:

- para ELISA:

Incubar a 37°C e 5% de CO₂ por 6 horas, colher o sobrenadante e guardar em -80°C

- para PCR *array*

Incubar uma placa por 2 horas a 37°C e 5% de CO₂;

Incubar uma placa por 6 horas a 37°C e 5% de CO₂;

Incubar uma placa por 24 horas a 37°C e 5% de CO₂;

ELISA para detecção de fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α)

(BD Bioscience Pharmigen, EUA)

1. Sensibilizar a placa de 96 poços com 50 μ L/poço de anticorpo anti-TNF- α na concentração de 4 μ g/mL diluído em tampão carbonato de sódio 0,1 M pH 9,5. Selar a placa e incubar durante a noite a temperatura de 2-8°C;
2. Lavar a placa 3 vezes com PBS+0,05% Tween 20;
3. Colocar 250 μ L/poço da solução bloqueadora (PBS+1% BSA);
4. Incubar por 1 hora a temperatura ambiente;
5. Lavar a placa 3 vezes com PBS+0,05% Tween 20;
6. Diluir a curva padrão com rhTNF- α em RPMI 10% FCS, nas concentrações 2000 pg/mL, 1000 pg/mL, 500 pg/mL, 250 pg/mL, 125 pg/mL, 62,5 pg/mL, 31,2 pg/mL, 15,6 pg/mL, 7,8 pg/mL. Manter um ponto só com o RPMI 10% FCS, que será o 0 pg/mL;
7. Colocar 100 μ L/poço da curva padrão e amostras em duplicata;
8. Incubar por 1 hora a temperatura ambiente;
9. Lavar a placa 4 vezes com PBS+0,05% Tween 20;
10. Acrescentar anticorpo anti-TNF- α biotilado diluído em PBS+1% BSA e 0,05% Tween 20 na concentração de 1 μ g/mL;
11. Colocar 100 μ L/poço da solução e incubar por 1 hora a temperatura ambiente;
12. Lavar a placa 4 vezes com PBS+0,05% Tween 20;
13. Acrescentar 100 μ L/poço de estreptavidina conjugada a peroxidase na proporção 1:1600 em PBS+1% BSA e 0,05% Tween 20;
14. Incubar por 30 minutos a temperatura ambiente;
15. Lavar 5 vezes;
16. Preparar o substrato misturando-se em partes iguais as solução A e B.
17. Colocar 100 μ L/poço da solução e incubar a temperatura ambiente no escuro por aproximadamente 20 minutos;
18. Interromper a reação com 100 μ L/poço de ácido sulfúrico (H₂SO₄) 1M;
19. Realizar a leitura das placas em espectrofotômetro com filtro de 450 nm;
20. Com as leituras das densidades ópticas e concentrações conhecidas do rhTNF- α , construir um gráfico e a equação da reta. Nesta equação, colocar os valores das médias das densidades ópticas das amostras, multiplicar pelo valor da diluição para obtenção das concentrações finais de TNF- α nos sobrenadantes.

PCR array

(SABioscience, EUA)

Os genes estudados fazem parte do *Human Toll-Like Receptor Signaling Pathway RT² Profiler™ PCR Array*. Eles estão divididos funcionalmente nos seguintes grupos mencionados abaixo:

Toll-Like Receptors: LY64, SIGIRR, TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLR10.

Adaptors & TLR Interacting Proteins: BTK, CD14, HMGB1, HRAS, HSPA1A, HSPD1, LY86 (MD-1), LY96 (MD-2), MAPK8IP3, MYD88, PELI1, RIPK2, SARM1, TICAM2, TIRAP, TOLLIP, TRIF.

Effectors: CASP8, EIF2AK2, FADD, IRAK1, IRAK2, MAP3K7 (TAK1), MAP3K7IP1 (TAB1), NR2C2, PPARA, PRKRA, SITPEC, TRAF6, UBE2N, UBE2V1.

Downstream Pathways and Target Genes:

NFκB Pathway: CCL2, CHUK, CSF2 (GMCSF), CSF3 (GCSF), IFNA1, IFNB1, IFNG, IKBKB, IL1A, IL1B, IL2, IL6, IL8, IL10, IL12A, LTA, MAP3K1, MAP4K4, NFKB1, NFKB2, NFKBIA, NFKBIL1, NFRKB, REL, RELA, TNF, TNFRSF1A.

JNK/p38 Pathway: ELK1, FOS (c-Fos), JUN, MAP2K3, MAP2K4 (JNKK1), MAP3K1 (MEKK), MAPK8 (JNK1).

NF/IL6 Pathway: CLECSF9, PTGS2.

IRF Pathway: CXCL10, IFNA1, IFNB1, IFNG, IRF1, IRF3, TBK1.

Regulation of Adaptive Immunity: CD80, CD86, RIPK2, TRAF6.

Preparação da amostra

1. Ao final do período de incubação de cada placa, colher todo o sobrenadante, em tubo de 15ml gelado e identificado. Efetuar 3 lavagens com 2-3mL em cada poço da placa com PBS estéril gelado, utilizando o rodinho para colher as células. Fazer um poço de cada vez e manter os tubos em gelo;
2. Centrifugar a 500g durante 5 minutos a 4°C. Desprezar o sobrenadante cuidadosamente;
3. Suspender o botão de células em 700µL de PBS e transferir para um microtubo;
4. Lavar o tubo de 15mL com mais 700µL de PBS e transferir novamente para o microtubo;

5. Centrifugar e desprezar o sobrenadante devagar, secando o botão de células com uma micropipeta cuidadosamente;
6. Adicionar 1mL de Trizol™ (Invitrogen) e homogeneizar com a micropipeta várias vezes;
7. Armazenar a -80°C até a extração do RNA.

Extração de RNA

(ArrayGrade™ Total RNA Isolation Kit)

1. Retirar amostras do *freezer* e esperar descongelar;
2. Acrescentar clorofórmio 150µL/mL de Trizol™ ;
3. Agitar em vórtex vigorosamente por 2 minutos;
4. Incubar 2-3 minutos em gelo;
5. Centrifugar durante 15 minutos a 13400 g a 4°C;
6. Transferir o sobrenadante contendo o RNA (parte cristalina superior) para um novo microtubo. Não pegar fase intermediária;
7. Acrescentar álcool isopropílico (propanol) 500µL/mL de Trizol™. Homogeneizar por inversão;
8. Incubar durante toda a noite ou 24 horas em *freezer* -20°C;
9. Centrifugar durante 10 minutos a 13400 g a 4°C;
10. Lavar o RNA com 1mL de etanol 80%. Não homogeneizar!
11. Retirar etanol e deixar secar o *pellet*;
12. Dissolver o *pellet* em 30-50µL de água livre de RNase do kit;
13. Adicionar 350µL de *Lysis & Binding Buffer* do kit;
14. Ajuste de condição de *RNA Binding*:
 - a. Adicionar 350µL de etanol 70% a amostra (no *Lysis Buffer*);
 - b. Homogeneizar bem em vórtex;

OBS.: Um precipitado fibroso pode ser visível. Este material não afeta a extração de RNA. Entretanto, tenha certeza de colocar todo o precipitado na *Spin Column* no próximo passo.

15. Ligação do RNA   *Spin Column*:
 - a. Remover uma *light blue Column Spin* já colocada no próprio tubo de coleta da embalagem;
 - b. Adicionar a amostra (em *lysis buffer* e etanol) a *Spin Column*;
 - c. Centrifugar por 30 segundos a 8000g;

- d. Remover a *Spin Column* do tubo de coleta. Descartar o material que passou pela coluna. Recoloque a coluna no tubo coletor;

OBS.: A capacidade máxima da coluna é de 750 μ L. Repetir o procedimento se o volume de trabalho for maior.

16. Dessalinização da *Spin Column*:

- a. Adicionar 350 μ L de *Desalt buffer* do kit à *Spin Column*;
- b. Centrifugar por 1 minuto a 11000g;
- c. Remover a *Spin Column* do tubo de coleta. Descartar o material que passou pela coluna. Recolocar a coluna no tubo coletor;

OBS.: Se a parte inferior da coluna entrar em contato com o fluido que passou pela coluna, descarte o mesmo e centrifugue novamente por 30 segundos a 11000g.

17. Lavagem da *Spin Column*

Primeira lavagem:

- a. Adicionar 200 μ L de *Pre-wash buffer* do kit à *Spin Column*;
- b. Centrifugar por 30 segundos a 8000g;
- c. Remover a *Spin Column* do tubo coletor. Descartar o fluido que passou pela coluna. Recolocar a coluna no tubo coletor.

Segunda lavagem:

OBS.: Antes de começar, assegure-se de adicionar 10mL de etanol ao frasco de *washing buffer* do kit.

- a. Adicionar 350 μ L de *washing buffer* diluído em etanol à *Spin Column*;
- b. Centrifugar por 30 segundos a 8000g;
- c. Remover a *Spin Column* do tubo coletor. Descartar o fluido que passou pela coluna. Recolocar a coluna no tubo coletor.

Terceira lavagem:

- a. Adicione 200 μ L *washing buffer* diluído em etanol à *Spin Column*;
- b. Centrifugar por 3 minutos a 11000g para secar a coluna completamente.

OBS.: Se a parte inferior da coluna entrar em contato com o fluido que passou pela coluna, descarte o mesmo e centrifugue novamente por 30 segundos a 11000g.

18. Transfira a *Spin Column* do tubo coletor para um microtubo de 1,5mL RNase-free.

19. Eluição do RNA total

- a. Adicionar 50 μ L de água RNase-free à *Spin Column*;
- b. Deixar a coluna em repouso por 1 minuto a temperatura ambiente;
- c. Centrifugar por 1min a 11000g;
- d. O eluído contém o RNA total da amostra. Descartar a *Spin Column*;
- e. Fazer 3 alíquotas de 15 μ L e 1 de 5 μ L em microtubos de 1,5mL RNase-free;
- f. Armazenar a -80°C.

20. Quantificação do RNA total

1. Se utilizar o aparelho Nanodrop (Thermo Scientific, EUA), adicionar 49 μ L TE pH 8,0 à cubeta, assegure-se de não haver bolhas, e calibre o aparelho para o branco;
2. Adicione 1 μ L da amostras de RNA e misture gentilmente com uma ponteira;
3. Leia e salve a absorbância em 230, 260 e 280 nm;
4. Dispense o conteúdo da cubete e lave-a;
5. Cálculo da concentração de RNA:

$$A_{260} \times 40 \times 50 \text{ (fator de diluição)} = \text{concentração da amostra } \mu\text{g/mL}$$

6. Determine a pureza da amostra pelos cálculos 260/280 e 260/230. Amostras limpas terão taxas iguais ou melhores que:
 - i. 260/280 = 2.0 (valores menores indicam possível contaminação com proteína)
 - ii. 260/230 = 1.7 (valores menores indicam possível contaminação com sal ou guanidina)
7. Escolha algumas amostras e faça a eletroforese em gel de agarose 2% para confirmar a integridade do RNA com a presença das duas bandas correspondentes a 28S e 18S.

Síntese de cDNA

(First Strand cDNA Syntesis- Superarray)

1. Preparação da mistura de eliminação de DNA genômico:
 - a. Para cada amostra de RNA, misturar em um tubo estéril o RNA total, 2 μ L da solução de eliminação de DNA genômico do kit e completar o volume para 10 μ L;
 - b. Misturar cuidadosamente com uma micropipeta e centrifugue brevemente;
 - c. Incubar por 5 minutos a 42°C;
 - d. Colocar em gelo imediatamente por no mínimo 1 minuto.

2. Preparação RT *cocktail*:

RT Cocktail	1 reaction	2 reactions	4 reactions
BC3 (5X RT Buffer 3)	4 μ l	8 μ l	16 μ l
P2 (Primer & External Control Mix)	1 μ l	2 μ l	4 μ l
RE3 (RT Enzyme Mix 3)	2 μ l	4 μ l	8 μ l
H₂O	3 μ l	6 μ l	12 μ l
Final Volume	10 μ l	20 μ l	40 μ l

1. Reação de síntese de cDNA:
 - a. Adicionar 10 μ L do RT *cocktail* a cada 10 μ L da mistura de eliminação de DNA genômico;
 - b. Misturar bem e cuidadosamente com uma micropipeta;
 - c. Incubar a 42°C por exatamente 15 minutos e então imediatamente para a reação aquecendo a 95°C por 5 minutos;
 - d. Adicionar 91 μ L de H₂O a cada 20 μ L de reação de síntese de cDNA. Misturar bem;
 - e. Deixar em gelo até o próximo passo ou guardar a -20°C.

PCR em tempo real
(*RT² ProfilerTM PCR Array*)

1. Preparação do *Experimental Cocktail*:

- a. Misturar os seguintes componentes em um tubo de 5mL:

2X SABiosciences RT² qPCR Master Mix	1350 µl	550 µl	2000 µl
Diluted First Strand cDNA Synthesis Reaction	102 µl	102 µl	102 µl
H₂O	1248 µl	448 µl	1898 µl
Total Volume	2700 µl	1100 µl	4000 µl

- b. Remover cuidadosamente o selante da placa;
c. Adicionar 25µL do coquetel em cada poço. Mudar de ponteira a cada pipetagem;
d. Cuidadosamente, mas firmemente, selar o *PCR Array* com uma tampa ou filme óptico;
e. Centrifugar a placa por 1 minuto a temperatura ambiente a 1000g para remover as bolhas. Verificar se as bolhas desapareceram;
f. Colocar a placa no gelo enquanto programa o aparelho.

2. Detecção do *PCR em tempo real*:

- a. Ligar o termociclador *real-time* (*BioRad iCycler^R*) ao menos 30 minutos antes do início do uso para o aquecimento da lâmpada;
b. Colocar a placa com SYBR Green diluído no aparelho para *setup* do aparelho;
c. Colocar a placa de amostra no termociclador;
d. Programar da seguinte forma:

Ciclos	Duração	Temperatura
1	10 min ¹	95°C
	15 s	95°C
40		
	1 min ²	60°C

¹ o passo inicial é necessário para a ativação da DNA polimerase *HotStart*.

² detecta e grava a fluorescência do SYBR Green em cada poço durante o anelamento de cada ciclo (ajustar no programa a detecção de fluorescência para o anelamento).

- e. A análise dos resultados é feita no *software* iCycler iQ (Bio-rad Laboratories, EUA);
- f. A definição do *Baseline* é feita automaticamente pelo software;
- g. O *Threshold* deve ser ajustado manualmente. Assegure-se de usar o mesmo *threshold* para todas as corridas de uma mesma análise.

3. Controle de qualidade

a. Curva de dissociação

Correr uma curva de dissociação imediatamente após o programa de PCR acima, e gerar uma primeira curva de dissociação para cada poço da placa toda usando o software. Não pode aparecer mais de um pico em cada reação em temperaturas maiores que 80°C.

Programa para curva de dissociação:

Optics off: 95°C 1min; 55°C 2min

Optics on: 55°C a 95°C, de 0,5°C/s.

OBS1: se desejar, guardar a placa a -20°C para fazer a curva de dissociação posteriormente simplesmente aqueça a placa a temperatura ambiente e faça o processo descrito acima.

OBS2: assegure-se de inspecionar visualmente a placa depois da corrida. Se notar sinais de evaporação, anotar em quais poços para análise apropriada.

b. Gel de Agarose

Se necessário, pode-se correr um gel de agarose das amostras, onde apenas uma banda deve ser visualizada em cada poço.

4. Cálculo do *Fold Change*

Calcule o ΔCt para cada gene em cada placa:

$$\Delta Ct = Ct_{(\text{gene de interesse})} - Ct_{(\text{housekeeping})}$$

OBS. Para escolher o melhor normalizador: o nível de expressão do gene *housekeeping* escolhido como normalizador no método $\Delta\Delta Ct$ não pode ser influenciado pelas condições experimentais. Se mais de um *housekeeping* for adequado para o estudo, use a média dos valores de Ct na equação acima.

Calcule o $\Delta\Delta Ct$ para cada gene comparando dois grupos:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{(\text{grupo 2})} - \Delta Ct_{(\text{grupo 1})}$$

onde o grupo 1 é o controle e o grupo 2 é o experimental

Calcule o *fold change* para cada gene entre os grupo como $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$

Método de análise $\Delta\Delta Ct$

Devido à relação de proporção inversa entre o *threshold cycle* (Ct) e o nível de expressão original, e do aumento exponencial da quantidade de produto em cada ciclo, o nível de expressão original de cada gene de interesse é expresso como:

$$L = 2^{-Ct}$$

Para normalizar o nível de expressão de um gene de interesse em relação a um *housekeeping*, os níveis de expressão dos dois genes são divididos:

$$\frac{2^{-Ct_{(\text{gene de interesse})}}}{2^{-Ct_{(\text{housekeeping})}}} = 2^{-[Ct_{(\text{gene de interesse})} - Ct_{(\text{housekeeping})}]} = 2^{-\Delta Ct}$$

Para determinar o incremento na expressão gênica (*fold change*), a expressão normalizada do gene de interesse nas amostras experimentais é dividido pela expressão normalizada do mesmo gene de interesse na amostra controle:

$$\frac{2^{-\Delta Ct_{(\text{grupo 2})}}}{2^{-\Delta Ct_{(\text{grupo 1})}}} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

onde $\Delta\Delta Ct$ é igual a $\Delta Ct_{(\text{grupo 2})} - \Delta Ct_{(\text{grupo 1})}$

A expressão completa é a seguinte:

$$\begin{aligned}
 & \frac{2^{-\Delta Ct(\text{gene interesse}) \text{ grupo 2}}}{2^{-\Delta Ct(\text{housekeeping}) \text{ grupo 2}}} \\
 & = \frac{2^{-[Ct(\text{gene de interesse}) - Ct(\text{housekeeping})] \text{ grupo 2}}}{2^{-[Ct(\text{gene de interesse}) - Ct(\text{housekeeping})] \text{ grupo 1}}} = \frac{2^{-\Delta Ct \text{ grupo 2}}}{2^{-\Delta Ct \text{ grupo 1}}} = 2^{-\Delta\Delta Ct} \\
 & \frac{2^{-\Delta Ct(\text{gene interesse}) \text{ grupo 1}}}{2^{-\Delta Ct(\text{housekeeping}) \text{ grupo 1}}}
 \end{aligned}$$

Expressão de CD14 e TLR4 na superfície de monócitos

1. Colher 5 a 6 tubos de heparina de sangue;
2. Realizar a separação das CMSP como descrito no protocolo específico;
3. Ressuspender as células em RPMI + 10% FCS e acertar a concentração para 2×10^6 células/mL;
4. Colocar 1mL da suspensão em cada tubo de polipropileno (não aderente);
5. Acrescentar estímulos conforme a tabela:

	T 0	T 48
TUBO 1	-	colher
TUBO 2	0,1 ng LPS	colher
TUBO 3	1,0 ng LPS	colher
TUBO 4	10 ng LPS	colher

6. Incubar a 37°C e 5% de CO₂;
7. Dado cada tempo de incubação, transferir o volume para um tubo de citometria (poliestireno);
8. Acrescentar 2 mL de PBS gelado no tubo de polipropileno para soltar as células e transferir para o tubo de citometria;
9. Centrifugar a 500g por 10 minutos a 4°C;
10. Desprezar o sobrenadante e ressuspender o botão celular;
11. Marcar as células conforme tabela abaixo:

ENSAIO				
	FITC	PE	PerCP	APC
Tubos 1 a 4	-	TLR4 (20 μ L)	CD14 (5 μ L)	-

12. Fazer tubos da compensação conforme tabela abaixo:

COMPENSAÇÃO				
	FITC	PE	PerCP	APC
Tubo A	-	-	-	-
Tubo B	-	TLR4 ou bead	-	-
Tubo C	-	-	CD14	-

13. Homogeneizar e incubar por 15 minutos a temperatura ambiente no escuro

14. Lavar com 2 mL de PBS;

15. Centrifugar, desprezar o sobrenadante e ressuspender o botão celular;

16. Acrescentar 300 μ L de tampão de fixação paraformaldeído 1%

17. Realizar leitura no citômetro de fluxo.

A leitura das amostras é realizada em citômetro de fluxo FACSCalibur (BDIS) equipado com dois lasers, um de argônio e outro de diodo, com emissão de comprimentos de ondas de 488 nm e 633 nm, respectivamente. O laser de argônio possibilita a excitação de três fluorocromos, FITC, PE e PerCP. O laser de diodo excita o fluorocromo APC. As dispersões frontal e lateral de luz detectam, sem auxílio de fluorescência, tamanho e complexidade celular, respectivamente, e são observadas em escala linear. Desta forma é possível detectar até 6 parâmetros para cada evento adquirido sendo que cada evento foi considerado como uma célula. A detecção de cada parâmetro e compensação entre os canais de fluorescências foi acertada para aperfeiçoar a aquisição de eventos. O citômetro é acoplado à unidade constituída por microcomputador Macintosh (Apple Computer Inc., EUA), que permite controle sobre o citômetro e armazenamento dos dados em arquivos.

Aquisição e análise de dados em citômetro de fluxo

A aquisição dos eventos é realizada com o auxílio do programa CellQuest (BDIS). Um gráfico de dispersão frontal versus lateral de luz é utilizado para

identificação das células com morfologia de monócitos. Desta forma será possível estabelecer a região de monócitos (R1). Em outro gráfico combina-se dispersão lateral de luz versus expressão de CD14, possibilitando a identificação das células positivas para este receptor, estabelecendo-se a janela R2. Através da combinação das janelas R1 e R2 dever-se adquirir 5000 eventos, ou seja, células. Entretanto, todos os eventos devem ser salvos (Figura complementar 4).

Utilizando o programa FlowJo, a análise dos dados segue o mesmo padrão. Por meio de um gráfico de dispersão frontal versus lateral de luz define-se uma região de morfologia de monócitos (R1). Em outro gráfico, o qual mostra dispersão lateral de luz versus expressão de CD14, é delimitada uma região R2 nas células CD14+ (Figura complementar 4). A partir destas regiões, a análise da expressão dos receptores na superfície celular é feita por meio da média geométrica da intensidade de fluorescência (MGIF) de cada receptor ilustrado em histogramas (Figura complementar 5).

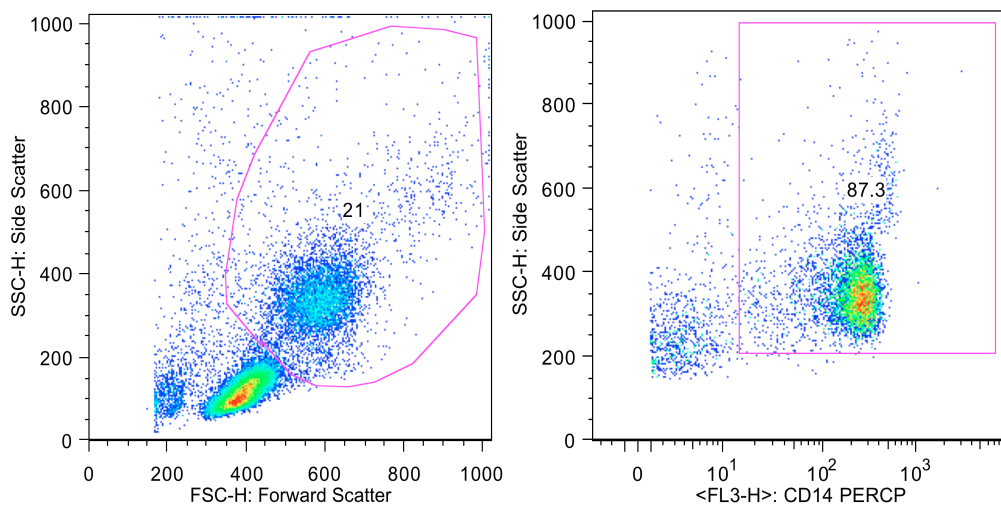


Figura complementar 4. Aquisição e análise de CMSP em citômetro de fluxo.

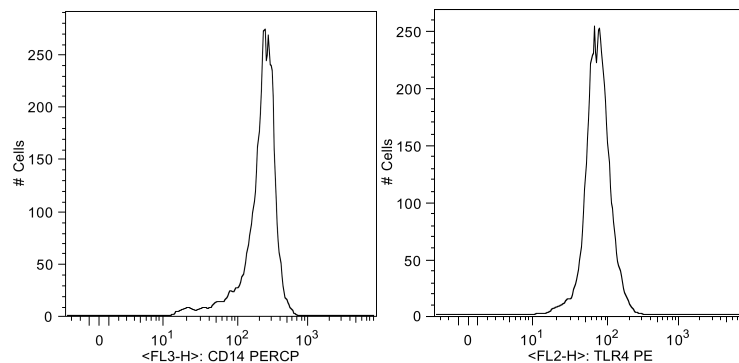


Figura Complementar 5. Histogramas representativos da expressão de CD14 e TLR4 em monócitos.

5.3. Soluções

Cloreto de Amônio pH 7,4

8,29 g de NH₄Cl

1,00 g de KHCO₃

0,0379g de Na₂EDTA

Diluir em 1000mL de água destilada

Filtrar com seringa e filtro 0,22. Identificar com a data, validade de um mês, nome da pessoa que preparou e guardar em geladeira.

Meio de cultura RPMI 1640 pH=7,0

Meio RPMI 1640 autoclavável (Sigma)

10 IU/mL penicilina G (Gibco, EUA)

10 µg/mL estreptomicina sulfatada (Gibco)

200 mM L-glutamina (Sigma)

10% de soro fetal bovino (Gibco)

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

Na₂CO₃ 3,56g (LabSynth)

NaHCO₃ 8,40g (LabSynth)

Água destilada q.s.p. 1000 mL

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

PBS 0,15 M pH = 7,2

NaCl 8,0 g (LabSynth, BR)

KH₂PO₄ 0,2 g (LabSynth)

Na₂HPO₄ 1,15 g (LabSynth)

KCl 0,2 g (LabSynth)

Água destilada q.s.p. 1000 mL

LPS de *Salmonella abortus equi*

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

6. BIBLIOGRAFIA

Abbas, AK, Lichtman, AH, Pillai, S. In: Abbas, AK, Lichtman, AH, Pillai, S, editor. Cellular and Molecular Immunology. Saunders Elsevier; 2007. p. 19-46.

Adib-Conquy M, Adrie C, Moine P, Asehnoune K, Fitting C, Pinsky MR, *et al.* NF-kappaB expression in mononuclear cells of patients with sepsis resembles that observed in lipopolysaccharide tolerance. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000;162(5):1877-83.

Adib-Conquy M, Adrie C, Fitting C, Gattoliat O, Beyaert R, Cavaillon JM. Up-regulation of MyD88s and SIGIRR, molecules inhibiting Toll-like receptor signaling, in monocytes from septic patients. *Crit Care Med.* 2006;34(9):2377-85.

Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol.* 2004;4(7):499-511.

Anderson KV, Bokla L, Nüsslein-Volhard C. Establishment of dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo: the induction of polarity by the Toll gene product. *Cell.* 1985;42(3):791-8.

Besson PB. Development of tolerance to typhoid bacterial pyrogen and its abolition by reticulo-endothelial blockage. *Proc Soc Exp Bio Med.* 1946;61(3):248-250.

Biswas SK, Lopez-Collazo E. Endotoxin tolerance: new mechanisms, molecules and clinical significance.. *Trends Immunol.* 2009;30(10):475-87. Review.

Bohuslav, J, Kravchenko, VV, Parry, GC, Erlich, JH, Gerondakis, S, Mackman, N, *et al.* Regulation of an essential innate immune response by the p50 subunit of NF-kappaB. *J Clin Invest.* 1998;102(9):1645-1652.

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

Brunialti MK, Martins PS, Barbosa de Carvalho H, Machado FR, Barbosa LM, Salomao R. TLR2, TLR4, CD14, CD11B, and CD11C expressions on monocytes surface and cytokine production in patients with sepsis, severe sepsis, and septic shock.. *Shock.* 2006;25(4):351-7.

Cavaillon JM, Adrie C, Fitting C, Adib-Conquy M. Endotoxin tolerance: is there a clinical relevance? *J Endotoxin Res.* 2003;9(2):101-7.

Cavaillon JM, Adrie C, Fitting C, Adib-Conquy M. Reprogramming of circulatory cells in sepsis and SIRS. *J Endotoxin Res.* 2005;11(5):311-20.

Cavaillon JM, Adib-Conquy M. Bench-to-bedside review: endotoxin tolerance as a model of leukocyte reprogramming in sepsis. *Crit Care*. 2006;10(5):233.

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

Covert MW, Leung TH, Gaston JE, Baltimore D. Achieving stability of lipopolysaccharide-induced NF-kappaB activation. *Science*. 2005;309(5742):1854-7.

del Fresno C, García-Río F, Gómez-Piña V, Soares-Schanoski A, Fernández-Ruiz I, Jurado T, *et al*. Potent phagocytic activity with impaired antigen presentation identifying lipopolysaccharide-tolerant human monocytes: demonstration in isolated monocytes from cystic fibrosis patients. *J Immunol*. 2009;182(10):6494-507.

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

Dong, C, Davis, RJ, Flavell, RA. MAP kinases in the immune response. *Annu Rev Immunol*. 2002;20:55-72

Draisma A, Pickkers P, Bouw MP, van der Hoeven JG. Development of endotoxin tolerance in humans in vivo. *Crit Care Med*. 2009;37(4):1261-7.

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

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

Escoll P, del Fresno C, García L, Vallés G, Lendínez MJ, Arnalich F, *et al*. Rapid up-regulation of IRAK-M expression following a second endotoxin challenge in human monocytes and in monocytes isolated from septic patients. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003;311(2):465-72.

Foster SL, Hargreaves DC, Medzhitov R. Gene-specific control of inflammation by TLR-induced chromatin modifications. *Nature*. 2007;447(7147):972-8.

Foster SL, Medzhitov R. Gene-specific control of the TLR-induced inflammatory response. *Clin Immunol*. 2009;130(1):7-15.

Frankenberger M, Pechumer H, Ziegler-Heitbrock HW. Interleukin-10 is upregulated in LPS tolerance. *J Inflamm.* 1995;45(1):56-63.

Freudenberg MA, Galanos C. Induction of tolerance to lipopolysaccharide (LPS)-D-galactosamine lethality by pretreatment with LPS is mediated by macrophages. *Infect Immun.* 1988;56(5):1352-7.

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

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

Galanos, C, Freudenberg, MA, Katschinski, T, Salomao, R, Mossmann, H, Kumazawa, Y. Tumor Necrosis Factor and Host Response to Endotoxin. In *Bacterial Endotoxic Lipopolysaccharides*, Ryan, J.L., Morrison, D.C. 1992; pp 88-93. CRC Press.

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

Granowitz EV, Porat R, Mier JW, Orencole SF, Kaplanski G, Lynch EA, *et al.* Intravenous endotoxin suppresses the cytokine response of peripheral blood mononuclear cells of healthy humans. *J Immunol.* 1993;151(3):1637-45.

Härter L, Mica L, Stocker R, Trentz O, Keel M. Increased expression of toll-like receptor-2 and -4 on leukocytes from patients with sepsis. *Shock.* 2004;22(5):403-409.

Hashimoto C, Hudson KL, Anderson KV. The Toll gene of *Drosophila*, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell.* 1988;52:269-79.

Hayden MS, Ghosh S. Shared principles in NF-kappaB signaling. *Cell.* 2008;132(3):344-62.

Hehlgans T, Pfeffer K. The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. *Immunology.* 2005;115(1):1-20.

Heyman, A, Beeson, PB. Influence of various disease states upon the febrile response to intravenous injection of typhoid bacterial pyrogen; with particular reference to malaria and cirrhosis of the liver. *J Lab Clin Med.* 1949;34(10):1400-3.

- Hirohashi N, Morrison DC. Low-dose lipopolysaccharide (LPS) pretreatment of mouse macrophages modulates LPS-dependent interleukin-6 production in vitro. *Infect Immun.* 1996;64(3):1011-5.
- Hotchkiss RS, Karl IE. The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med.* 2003;348(2):138-50
- Janeway CA Jr. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 1989;54 Pt 1:1-13.
- Kawai T, Adachi O, Ogawa T, Takeda K, Akira S. Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. *Immunity.* 1999;11(1):115-22.
- Kawai T, Takeuchi O, Fujita T, Inoue J, Mühlradt PF, Sato S, *et al.* Lipopolysaccharide stimulates the MyD88-independent pathway and results in activation of IFN-regulatory factor 3 and the expression of a subset of lipopolysaccharide-inducible genes. *J Immunol.* 2001;167(10):5887-94.
- Kobayashi K, Hernandez LD, Galán JE, Janeway CA Jr, Medzhitov R, Flavell RA. IRAK-M is a negative regulator of Toll-like receptor signaling. *Cell.* 2002 Jul 26;110(2):191-202.
- Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffmann JA. The dorsoventral regulatory gene cassette *spätzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell.* 1996;86(6):973-83.
- Liew FY, Xu D, Brint EK, O'Neill LA. Negative regulation of toll-like receptor-mediated immune responses. *Nat Rev Immunol.* 2005;5(6):446-58.
- Madigan M, Martinko J, Parker J. Cell Biology. In: Madigan M, Martinko J, Parker J, editores. *Brock Biology of Microorganisms.* Upper Saddle River: Prentice-Hall, Inc.; 1997. p.77.
- Mages J, Dietrich H, Lang R. A genome-wide analysis of LPS tolerance in macrophages. *Immunobiology.* 2007;212(9-10):723-37.
- Marra MN, Wilde CG, Collins MS, Snable JL, Thornton MB, Scott RW. The role of bactericidal/permeability-increasing protein as a natural inhibitor of bacterial endotoxin. *J Immunol.* 1992;148(2):532-7.

Martins PS, Brunialti MK, Martos LS, Machado FR, Assunção MS, Blecher S, *et al.* Expression of cell surface receptors and oxidative metabolism modulation in the clinical continuum of sepsis. *Crit Care*. 2008;12(1):R25.

Medvedev, AE, Lentschat, A, Wahl, LM, Golenbock, DT, Vogel, SN. Dysregulation of LPS-induced Toll-like receptor 4-MyD88 complex formation and IL-1 receptor-associated kinase 1 activation in endotoxin-tolerant cells. *J Immunol*. 2002;169(9):5209-5216.

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

Monneret G, Venet F, Pachot A, Lepape A. Monitoring immune dysfunctions in the septic patient: a new skin for the old ceremony. *Mol Med*. 2008;14(1-2):64-78.

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

Nahid MA, Pauley KM, Satoh M, Chan EK. miR-146a is critical for endotoxin-induced tolerance: IMPLICATION IN INNATE IMMUNITY. *J Biol Chem*. 2009;284(50):34590-9.

Nakagawa R, Naka T, Tsutsui H, Fujimoto M, Kimura A, Abe T, *et al.* SOCS-1 participates in negative regulation of LPS responses. *Immunity*. 2002;17(5):677-87.

Neva, FA, Morgan, HR. Tolerance to the action of endotoxins of enteric bacilli in patients convalescent from typhoid and paratyphoid fevers. *J Lab Clin Med*. 1950;35(6):911-22.

O'Neill LA, Bowie AG. The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol*. 2007;7(5):353-64.

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

Piao W, Song C, Chen H, Diaz MA, Wahl LM, Fitzgerald KA, *et al.* Endotoxin tolerance dysregulates MyD88- and Toll/IL-1R domain-containing adapter inducing IFN-beta-dependent pathways and increases expression of negative regulators of TLR signaling. *J Leukoc Biol*. 2009;86(4):863-75.

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

Randow F, Syrbe U, Meisel C, Krausch D, Zuckermann H, Platzer C, *et al.* Mechanism of endotoxin desensitization: involvement of interleukin 10 and transforming growth factor beta. *J Exp Med.* 1995;181(5):1887-92.

Riedemann, NC, Guo, RF, Ward, PA. Novel strategies for the treatment of sepsis (2003). *Nat Med* 9(5): 517-524.

Rietschel ET, Schade U, Jensen M, Wollenweber HW, Luderitz O, Greisman SG. Bacterial endotoxins: chemical structure, biological activity and role in septicemia. *Scand J Infect Dis Suppl.* 1982;31:8-21.

Rietschel ET, Kirikae T, Schade FU, Mamat U, Schmidt G, Loppnow H *et al.* Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. *Faseb J.* 1994;8(2):217-25

Rigato O, Silva E, Kallas EG, Brunialti MK, Martins PS, Salomao R. Pathogenetic aspects of sepsis and possible targets for adjunctive therapy. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord.* 2001;1(1):13-30.

Rigato O, Salomao R. Impaired production of interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha but not of interleukin 10 in whole blood of patients with sepsis. *Shock.* 2003;19(2):113-6.

Salomao R, Wey SB, Pignatari AC, Castelo Filho A. [Epidemiology of bacteremias at a university hospital]. *Rev Assoc Med Bras.* 1992;38(2):62-6.

Salomao R, Castelo Filho A, Pignatari AC, Wey SB. Nosocomial and community acquired bacteremia: variables associated with outcomes. *Rev Paul Med.* 1993;111(6):456-61.

Salomao R, Rigato O, Pignatari AC, Freudenberg MA, Galanos C. Bloodstream infections: epidemiology, pathophysiology and therapeutic perspectives. *Infection.* 1999;27(1):1-11.

Salomao R, Brunialti MK, Kallás EG, Martins PS, Rigato O, Freudenberg M. Lipopolysaccharide-cell interaction and induced cellular activation in whole blood of septic patients. *J Endotoxin Res.* 2002;8(5):371-9.

Salomão R, Martins PS, Brunialti MK, Fernandes Mda L, Martos LS, Mendes ME, *et al.* TLR signaling pathway in patients with sepsis. *Shock.* 2008;30 Suppl 1:73-7. Review.

Salomao R, Brunialti MK, Gomes NE, Mendes ME, Diaz RS, Komninakis S, *et al.* Toll-like receptor pathway signaling is differently regulated in neutrophils and peripheral mononuclear cells of patients with sepsis, severe sepsis, and septic shock.. *Crit Care Med.* 2009;37(1):132-9.

Schumann RR, Leong SR, Flaggs GW, Gray PW, Wright SD, Mathison JC, *et al.* Structure and function of lipopolysaccharide binding protein. *Science.* 1990;249(4975):1429-31

Seatter SC, Li MH, Bubrick MP, West MA. Endotoxin pretreatment of human monocytes alters subsequent endotoxin-triggered release of inflammatory mediators. *Shock.* 1995;3(4):252-8.

Shimauchi H, Ogawa T, Okuda K, Kusumoto Y, Okada H. Autoregulatory effect of interleukin-10 on proinflammatory cytokine production by *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide-tolerant human monocytes. *Infect Immun.* 1999;67(5):2153-9.

Shimazu R, Akashi S, Ogata H, Nagai Y, Fukudome K, Miyake K, *et al.* MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *J Exp Med.* 1999;189(11):1777-82.

Silva E, Pedro Mde A, Sogayar AC, Mohovic T, Silva CL, Janiszewski M, *et al.* Brazilian Sepsis Epidemiological Study (BASES study). *Crit Care.* 2004;8(4):R251-60.

Sly LM, Rauh MJ, Kalesnikoff J, Song CH, Krystal G. LPS-induced upregulation of SHIP is essential for endotoxin tolerance. *Immunity.* 2004;21(2):227-39.

Taganov KD, Boldin MP, Chang KJ, Baltimore D. Proc Natl Acad Sci U S A. NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. 2006;103(33):12481-6.

Tominaga, K, Saito, S, Matsuura, M, Nakano, M. Lipopolysaccharide tolerance in murine peritoneal macrophages induces downregulation of the lipopolysaccharide signal transduction pathway through mitogen-activated protein kinase and nuclear factor-kappaB cascades, but not lipopolysaccharide-incorporation steps. *Biochim Biophys Acta.* 1999;1450(2):130-144.

van der Poll T, Coyle SM, Moldawer LL, Lowry SF. Changes in endotoxin-induced cytokine production by whole blood after in vivo exposure of normal humans to endotoxin. *J Infect Dis.* 1996;174(6):1356-60.

van Deuren M, van der Ven-Jongekrijg J, Demacker PN, Bartelink AK, van Dalen R, Sauerwein RW, *et al.* Differential expression of proinflammatory cytokines and their inhibitors during the course of meningococcal infections. *J Infect Dis.* 1994;169(1):157-61.

Weiss M, Fischer G, Barth E, Boneberg E, Schneider EM, Georgieff M, *et al.* Dissociation of LPS-induced monocytic ex vivo production of granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) and TNF-alpha in patients with septic shock. *Cytokine*. 2001;13(1):51-54.

West MA, Li MH, Seatter SC, Bubrick MP. Pre-exposure to hypoxia or septic stimuli differentially regulates endotoxin release of tumor necrosis factor, interleukin-6, interleukin-1, prostaglandin E2, nitric oxide, and superoxide by macrophages. *J Trauma*. 1994;37(1):82-9

Wolk K, Döcke WD, von Baehr V, Volk HD, Sabat R. Impaired antigen presentation by human monocytes during endotoxin tolerance. *Blood*. 2000;96(1):218-23.

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

Zhang, X, Morrison, DC. Lipopolysaccharide structure-function relationship in activation versus reprogramming of mouse peritoneal macrophages. *J Leukoc Biol*. 1993a;54(5):444-450.

Zhang X, Morrison DC. Lipopolysaccharide-induced selective priming effects on tumor necrosis factor alpha and nitric oxide production in mouse peritoneal macrophages. *J Exp Med*. 1993b;177(2):511-6.

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

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

Ziegler-Heitbrock, L. The p50-homodimer mechanism in tolerance to LPS. *J Endotoxin Res*. 2001;7(3):219-222.

Zuckerman SH, Evans GF, Butler LD. Endotoxin tolerance: independent regulation of interleukin-1 and tumor necrosis factor expression. *Infect Immun*. 1991;59(8):2774-80.

7. ABSTRACT

Pre-exposure to low doses of LPS induces resistance to a lethal challenge, a phenomenon known as endotoxin tolerance. In this study, tolerance was induced in human PBMC by culturing cells with 1 ng/mL LPS for 48 h. Cells were subsequently challenged with 100 ng/mL LPS for 2, 6 and 24 h, and the expression of 84 genes encoding proteins involved in the TLR signaling pathway was evaluated at each time point by PCR array. LPS pretreatment did not modulate the expression of TLR4 and CD14 on the surface of monocytes. A gene was defined as tolerized when LPS pretreatment reversed the effect of LPS challenge on the expression of the gene or as non-tolerized when LPS pretreatment did not reverse the effects of LPS challenge. We observed impaired signal transduction through the NF- κ B, JNK, ERK and TRIF pathways, whereas expression of p38 pathway-related genes was preserved in LPS-tolerant cells. These results show a distinct regulation of the TLR pathway cascades during tolerance; this may account for the differential gene expression of some inflammatory mediators, such as up-regulation of IL-10 and COX2 as well as down-regulation of TNF- α and IL-12. Depending on the effect of LPS-induced gene up-regulation or down-regulation, tolerance, as a reversion of such LPS effects, may result in repression or induction of gene expression.

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](#)