UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
LABORATÓRIO DE IMUNOPATOLOGIA KEIZO ASAMI
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA APLICADA À SAÚDE

BÁRBARA NAYANE ROSÁRIO FERNANDES SOUZA

NÍVEIS DA LECITINA COLESTEROL ACILTRANSFERASE (LCAT) E SUA ASSOCIAÇÃO COM A RESPOSTA INFLAMATÓRIA DURANTE A SEPSE EXPERIMENTAL E HUMANA.

Recife
2017

BÁRBARA NAYANE ROSÁRIO FERNANDES SOUZA

NÍVEIS DA LECITINA COLESTEROL ACILTRANSFERASE (LCAT) E SUA ASSOCIAÇÃO COM A RESPOSTA INFLAMATÓRIA DURANTE A SEPSE EXPERIMENTAL E HUMANA.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde, do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami – LIKA/UFPE, como requisito para obtenção do título de mestre.

Orientador: Fabrício Oliveira Souto

Coorientadora: Taciana Lima Salviano

Recife

2017

Catalogação na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Souza, Bárbara Nayane Rosário Fernandes

Níveis da lecitina colesterol aciltransferase (LCAT) e sua associação com a resposta inflamatória durante a sepse experimental e humana / Bárbara Nayane Rosário Fernandes Souza- Recife: O Autor, 2017.

81 folhas: il., fig., tab.
Orientador: Fabrício Oliveira Souto
Coorientadora: Taciana Lima Salviano
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Biologia Aplicada à Saúde, 2017.
Inclui referências e anexos

1. Septicemia 2. Lipoproteínas 3. Infecção I. Souto, Fabrício Oliveira (orientador) II. Salviano, Taciana Lima (coorientadora) III. Título

616.944 CDD (22.ed.) UFPE/CB-2017-252

BÁRBARA NAYANE ROSÁRIO FERNANDES SOUZA

NÍVEIS DA LECITINA COLESTEROL ACILTRANSFERASE (LCAT) E SUA ASSOCIAÇÃO COM A RESPOSTA INFLAMATÓRIA DURANTE A SEPSE EXPERIMENTAL E HUMANA.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde, do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami – LIKA/UFPE, como requisito para obtenção do título de mestre.

Orientador: Fabrício Oliveira Souto

Coorientadora: Taciana Lima Salviano

Aprovada em 22 de Fevereiro de 2017.

COMISSÃO EXAMINADORA

_____

Prof. Dr. Fabrício Oliveira Souto/UFPE

_____

Prof. Dr. Carlos Roberto Weber Sobrinho/UFPE

_____

Profª. Drª. Rosângela Ferreira Frade de Araújo/UFPE

Às pessoas mais importantes da minha vida:
meu pai Wilson, minha mãe Maria e
minha irmã Gabriella,

Dedico

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por sempre me dar forças nos momentos mais difíceis e por ter me abençoado colocando pessoas especiais em meu caminho.

Aos meus pais, por todo o apoio, confiança, orações, ensinamentos e pelo incentivo ao meu crescimento profissional desde sempre.

À minha irmã, pela amizade, ajuda, por me ouvir e pelas palavras de incentivo que foram fundamentais para finalização desta etapa.

À minha família, pelo carinho, apoio e por vibrar com minhas conquistas.

Ao meu orientador, Fabrício Souto, pela orientação deste trabalho, pelo acolhimento como sua primeira orientanda, pelas contribuições na realização dos experimentos, por me mostrar que eu poderia ir além do que eu imaginava, pela parceria, pelas conversas, cafezinhos e pelos ensinamentos científicos e pessoais.

À minha Coorientadora, Taciana Salviano, por toda ajuda.

Ao Prof. José Luiz de Lima Filho por todo o aprendizado e colaboração.

Ao Prof. Fernando de Queiroz Cunha, pelos aprendizados e oportunidade de conhecer o laboratório de Dor e Inflamação do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Aos pesquisadores do laboratório de Dor e Inflamação (FMRP-USP), em especial à Vanessa Borges por toda a ajuda, humildade, parceria, momentos alegres e pela amizade formada.

Aos amigos feitos em Ribeirão Preto, Bruno e Vander, pela calorosa acolhida na minha estadia em “Ribs”, por intermédio de Jeiminho, amigo da graduação.

Ao Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, pelo acolhimento nesses últimos anos, desde a iniciação cientifica até o mestrado.

Aos colegas e amigos do LIKA, BmC, SLC, Biomol, BT, ME, Imuno, Micro e Prospecmol, especialmente à Aline, Cida, Tony, Conceição, Natália, Iasmin, Mell, Fátima, Renata, Katyana, Luana, Rosilda, Roberta, Éden, Madson, Matheus, Suelen, Edson, Olávio, Rafael Padilha, Jana, Laís, Dani Rocha, Marília, Mariane, Victor e Larissa Chaves, pela convivência, pela amizade, pelas ajudas cientificas, pelos encontros no corredor e pelos bate-papos descontraídos.

Aos funcionários da secretária do LIKA, em especial ao secretário do PPGBAS, Fábio, pela ajuda, paciência e profissionalismo.

Aos funcionários do biotério, em especial à Maria Helena e Felipe, pelo suporte na criação, distribuição e cuidado com os animais utilizados neste estudo.

À Sandra Elisabeth, por toda paciência, disponibilidade e ajuda laboratorial.

À Vera Lúcia (Verinha), pelo carinho, momentos de descontração e pelos cafezinhos.

À Eduardo Adelino, pela amizade e convívio desde a graduação, IC e pós-graduação, pela paciência, pelos conselhos, pelos momentos de risadas e descontração, pelos desabafos e pelo incentivo.

Aos meus amigos, desde a graduação, Bela, Alex, Joana, Amanda Luíze e Edvaldo pela amizade, confiança e pelas nossas conversas.

À minha amiga Emiliana, pela amizade e confiança e por se fazer presente, mesmo na correria do dia-a-dia.

Aos pacientes que contribuíram para esta pesquisa. E que esta possa beneficiar os pacientes com sepse.

À todos os animais, o meu muito obrigado e, acima de tudo, respeito por tornarem possível o desenvolvimento desse trabalho mesmo sem poder escolher.

À Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE) pela concessão da bolsa.

À todos que de alguma forma fizeram parte desta dissertação, muito obrigada!

RESUMO

A sepse é uma síndrome clínica complexa resultante da resposta inflamatória sistêmica à infecção. Apesar dos avanços recentes, essa doença continua sendo uma das causas mais comuns de morbidade e mortalidade em unidades de terapia intensiva (UTIs) em todo o mundo, sendo, portanto, um grave problema de saúde pública. Essa síndrome resulta da incapacidade do hospedeiro de conter a infecção primária, resultando em uma inflamatória generalizada, levando a falha multiorgânica e morte. Novas evidências sugerem que os níveis séricos da lipoproteína de alta densidade (HDL) encontram-se reduzidos em condições de sepse e, isto está correlacionado fortemente com a gravidade da doença. No entanto, os mecanismos dessa redução, ainda não estão bem estabelecidos. A Lecitina colesterol aciltransferase (LCAT), enzima plasmática que esterifica o colesterol, é a responsável pela síntese e maturação das HDL circulantes. Assim, o presente estudo teve como objetivo principal avaliar a concentração plasmática da LCAT durante a sepse, experimental e humana, bem como sua associação com os níveis da HDL e resposta inflamatória nesta doença. Adicionalmente, foi avaliada a expressão relativa do RNA mensageiro (RNAm) da LCAT e da proteína de ligação à HDL (HDLBP) em tecido hepático dos camundongos submetidos à sepse experimental polimicrobiana (ligadura e perfuração do ceco – CLP). Os resultados demonstraram uma diminuição significativa na concentração da LCAT e HDL em pacientes sépticos, em comparação ao grupo controle. Além disso, a redução nos níveis da LCAT ocorreu concomitantemente com a perda do controle da infecção nos animais submetidos à sepse grave. A queda nos valores dessas proteínas pode estar associada à redução na síntese e/ou secreção das mesmas, visto que ambas são produzidas no fígado, o qual está alterado na sepse. Assim, esses resultados sugerem uma correlação direta entre a expressão do RNAm da LCAT e da HDLBP.

Palavras-chave: Sepse. CLP. LCAT. HDLBP.

ABSTRACT

Sepsis is a complex clinical syndrome resulting from the systemic inflammatory response to infection. Despite recent advances, this disease remains one of the most common causes of morbidity and mortality in intensive care units (ICUs) worldwide and, therefore, it is an important public health problem. This syndrome results from the inability of the host to control the primary infection, resulting in a widespread inflammation, which leads to multiorgan failure and death. Increasing evidence suggest that in sepsis the serum levels of high-density lipoprotein (HDL) are reduced and closely correlated with the severity of the illness. However, the mechanisms of sepsis-induced decrease in serum HDL levels are not currently well known. The Lecithin cholesterol acyltransferase (LCAT), a plasma enzyme that esterifies cholesterol, is responsible for the synthesis and maturation of circulating HDL. The present study aimed to assess the plasma concentration of LCAT during sepsis, murine and human, and its association with HDL levels and inflammatory response in sepsis. Moreover, the relative expression of messenger RNA (mRNA) of the LCAT and the HDL-binding protein (HDLBP) in hepatic tissue of the mice subject to polymicrobial sepsis (cecal ligation and pucture – CLP) was evaluated. A significant reduction in levels of HDL, as well as in the concentration of LCAT in septic patients, was obtained when compared to control subjects. In addition, the decrease of LCAT levels occurred simultaneously with the loss of infection control in animals submitted to severe sepsis. The reduction may be associated with decreased synthesis and / or secretion of LCAT and HDL, since both are produced in the liver, which has sepsis-associated liver dysfunction. The results suggest a direct correlation between mRNA expression of LCAT and HDLBP.

Keywords: Sepsis. CLP. LCAT. HDLBP.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1: Critérios diagnósticos para sepse _____ 19

Figura 1: Mecanismos fisiopatológicos envolvidos na evolução da sepse._____ 24

Figura 2: Classificação das lipoproteínas de acordo com a composição de apolipoproteínas e densidade._____ 27

Figura 3: Formação e maturação da HDL. _____ 29

Figura 4: Reação da LCAT._____ 31

Figura 5: Transformação da HDL em HDL de fase aguda. _____ 33

Figura 6: Modificações na capacidade de neutralização da LPS pela HDL._____ 34

Gráfico 1: Curva de sobrevivência de animais submetidos à CLP. A taxa de sobrevida dos animais foi registrada a cada 24h durante dez dias, após a indução da sepse. Os resultados são representativos de dois experimentos (n=10, para cada grupo). Os dados são expressos como porcentagem de sobrevida e foram analisados por Log-rank Mante-Cox Test. *p<0,05 quando comparado ao grupo *Sham* e ao SL-CLP._____ 42

Gráfico 2: Avaliação do número de neutrófilos no foco infeccioso 24 horas após a indução da sepse polimicrobiana (CLP). Os resultados são representativos de dois experimentos (n=7, para cada grupo). Os dados são expressos como número de neutrófilos x 10^6/cavidade peritoneal e foram analisadas por ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni. *p<0,05 quando comparado ao grupo *Sham*, ** p<0,05 quando comparado ao grupo SL-CLP, #p<0,05 quando comparado ao grupo SL-CLP. _____ 43

Gráfico 3: Quantificação de bactérias no foco infeccioso e no sangue após indução da sepse polimicrobiana (CLP). A carga bacteriana no lavado peritoneal (A) e no sangue (B) foi quantificada 24 horas após a indução da CLP. Os resultados são representativos de dois experimentos (n= 7, para cada grupo). Os dados são expressos como Log do número de unidades formadoras de colônia (UFC) por ml de amostra (Mann-Whitney U test). *p<0,05 quando comparado ao grupo *Sham*, ** p<0,05 quando comparado ao grupo SL-CLP, #p<0,05 quando comparado ao grupo SL-CLP. _____ 44

Gráfico 4: Infiltrado neutrofílico nos pulmões dos animais submetidos à CLP. Os resultados são representativos de dois experimentos (n= 7, para cada grupo). Os dados são expressos em número de neutrófilos x 10^3/mg de pulmão. O número de neutrófilos infiltrados foi determinado através da dosagem da atividade da enzima Mieloperoxidase (MPO) nos pulmões. Para comparação entre os grupos utilizou-se ANOVA seguida de Bonferroni. *p<0,05 quando comparado ao grupo *Sham*. _____ 45

Gráfico 5: Avaliação da expressão do RNAm da LCAT e HDLBP durante a sepse e correlação da expressão das do RNAm da HDL e LCAT durante a sepse. Foram avaliados os níveis hepáticos de RNAm da LCAT (A) e da HDLBP (B) nos diferentes graus de sepse e no

grupo controle. Para comparação entre os grupos utilizou-se ANOVA seguido de Bonferroni. *p<0,05 quando comparado ao grupo Sham, #p<0,05 quando comparado ao grupo SL-CLP. Ambos os resultados são representativos de dois experimentos (n= 7, para cada grupo). (C) Análise da regressão linear da expressão relativa do RNAm da HDLBP do grupo *Sham* e dos animais submetidos à CLP correlacionadas com os respectivos valores da expressão do RNAm da LCAT (r^2=0,02, *p<0,05). Análise estatística realizada por correlação e regressão linear. _____ 46

Gráfico 6: Dosagem da concentração sérica da LCAT durante a sepse experimental. O soro dos animais foi utilizado para determinação da concentração da LCAT, 24 horas após a CLP. A LCAT foi dosada pelo método de ELISA. Os resultados são representativos de dois experimentos (n= 7, para cada grupo). Os dados são expressos em ng de LCAT/mL de soro. A análise foi realizada por ANOVA, seguida pelo teste de Bonferroni. *p<0,05 quando comparado ao grupo *Sham*. _____ 47

Gráfico 7: Dosagem da concentração sérica da LCAT durante a sepse e a correlação entre os níveis da LCAT em relação aos índices prognósticos. (A) A avaliação dos níveis séricos da enzima foi realizada nos soros dos indivíduos controles (n= 9) e pacientes sépticos (n= 29). (B) Os níveis de LCAT entre os pacientes com APACHEII<25/SOFA<7 (n= 17) e com APACHEII≥25/SOFA≥7 (n= 12). A LCAT foi dosada pelo método ELISA. Os resultados são expressos em ng de LCAT/ml de soro. A análise foi realizada por ANOVA, seguida pelo teste de Bonferroni (*p<0,05). (C) A análise da regressão linear dos valores da LCAT de indivíduos controle (n= 9) e dos pacientes sépticos (n= 29) correlacionadas com os respectivos escores SOFA (r^2=0,12, *p<0,05) e (D) APACHE II (r^2=0,04, *p<0,05). A análise estatística realizada por correlação e regressão linear. _____ 49

Gráfico 8: Dosagem dos níveis séricos da HDL. Os níveis da HDL foram obtidos dos prontuários dos pacientes internados na UTI do PROCAPE, controles (n= 9) e pacientes sépticos (n= 29). Os resultados são expressos em mg de HDL/dL de soro. A análise foi realizada por ANOVA, seguida pelo teste de Bonferroni (*p<0,05). _____ 50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Avaliação de falha de órgãos relacionada à sepse pelo SOFA escore. _____ 20

Tabela 2: Sequência dos oligonucleotídeos *primers* utilizados nas reações de qPCR. _____ 41

Tabela 3: Perfil dos pacientes selecionados para o estudo. _____ 47

LISTA DE ABREVIAÇÕES E SIGLAS

ABCA1 - *ATP-Binding Cassette Transporter A1*

ABCG1 - *ATP-Binding Cassette Transporter G1*

ACCP - *American College of Chest Physicians*

APACHE II - *Acute Physiology and Chronic Health Evaluation*

Apo - Apolipoproteína

BASES - *Brazilian Sepsis Epidemiological Study*

CBA - *Cytokine Beads Array*

CCR2 - Receptor 2 de quimiocinas com dois resíduos de cisteínas (CC) adjacentes

CD14 - *Cluster of differentiation 14*

cDNA - DNA complementar

CETP - Proteína de transferência de colesterol esterificado

CLP - Ligação e perfuração do ceco

Ct - *Threshold cycle*

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

ELISA - *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

ESICM - *European Society of Intensive Care Medicine*

FED - Doença do olho de peixe

FLD - Deficiência de LCAT familiar

GSA - Aliança Global da Sepse

HDL - Lipoproteína de alta densidade

HDLBP - Proteína de ligação à lipoproteína de alta densidade

H-TAB - Brometo de hexadeciltrimetil amônio

IDL - Lipoproteína de densidade intermediária

IL - Interleucina

ILAS - Instituto Latino Americano de Sepse

JAMA - *Journal of the American Medical Association*

LBP - Proteína ligadora de LPS

LCAT - Lecitina colesterol aciltransferase

LDL - Lipoproteína de baixa densidade

LPL - Lipoproteína lipase

LPS - Lipopolissacarídeo

LTA - Ácido lipoteicóico

mg - Miligrama

mL - Mililitro

mM - Milimol

MPO - Mieloperoxidase

RNAm - RNA mensageiro

NaCl - Cloreto de sódio

oxLDL - Lipoproteína de baixa densidade oxidada

PaCO2 - Pressão parcial de gás carbônico

PAF-AH - Acetil-hidrolase do fator ativador de plaquetas

PAMP - Padrão molecular associado a patógenos

PBS - Tampão fosfato em salina

pH - Potencial hidrogeniônico

PLTP - Proteína de transferência de fosfolípides

PON-1 - Paraoxonase sérica humana

PROCAPE - Pronto-socorro Cardiológico de Pernambuco

PROGRESS - *Promoting Global Research Excellence in Severe Sepsis*

PRR - Receptor de reconhecimento padrão

qRT-PCR - PCR quantitativo em tempo real

qSOFA - *quick Sequential Organ Failure Assessment Score*

r^2 - Regressão linear

SAA - Proteína amilóide A sérica

SCCM - *Society of Critical Care Medicine*

SOFA - *Sepsis-related Organ Failure Assessment*

sPLA2 - Fosfolipase A2 secretória

SR-B1 - Receptor *scavenger* classe B tipo I

SRIS - Síndrome da resposta inflamatória sistêmica

TG - Triglicerídeos

Th - Células T *helper*

TLR - Receptor do tipo *Toll-like*

TLR2 - Receptor do tipo *Toll-like 2*

TLR4 - Receptor do tipo *Toll-like 4*

TNF - Fator de necrose tumoral

TMB - Tetrametilbenzidina

UFC=CFU - Unidades formadoras de colônia

UTI - Unidade de terapia intensiva

VLDL - Lipoproteína de muito baixa densidade

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 16

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 18

2.1 SEPSE 18

2.1.1 Considerações Gerais e Definições 18

2.1.2 Epidemiologia da Sepse 21

2.1.3 Fisiopatologia da Sepse 23

2.2 LIPOPROTEÍNAS 25

2.2.1 Funções Biológicas da HDL 28

2.2.2 Lecitina Colesterol Aciltransferase 29

2.3 ALTERAÇÕES LIPOPROTEICAS NA SEPSE 31

3 OBJETIVOS 36

3.1 OBJETIVO GERAL 36

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 36

4 MATERIAIS E MÉTODOS 37

4.1 EXPERIMENTOS EM HUMANOS 37

4.1.1 Controle e Pacientes Sépticos 37

4.1.2 Critérios de Inclusão e Exclusão 37

4.1.3 Coleta das Amostras 37

4.2 EXPERIMENTOS EM ANIMAIS 38

4.2.1 Modelo Experimental de Sepse por Ligadura e Perfuração do Ceco 38

4.2.2 Migração dos Neutrófilos para o Foco da Infecção 39

4.2.3 Quantificação das Bactérias 39

4.2.4 Determinação da Atividade da Mieloperoxidase 39

4.3 DOSAGEM DE LCAT POR ELISA 40

4.4 EXTRAÇÃO DE RNA E PCR QUANTITATIVO EM TEMPO REAL 40

4.5 ANÁLISE DOS RESULTADOS 41

5 RESULTADOS 42

5.1 MODELO EXPERIMENTAL DE SEPSE 42

5.1.1 Sobrevida de Animais Submetidos à Sepse Induzida por Ligadura e Perfuração do Ceco (CLP) 42

5.1.2 Migração de Neutrófilos para o Foco Infeccioso 42

5.1.3 Crescimento Bacteriano no Foco Infeccioso 43

5.1.4 Atividade da Mieloperoxidase 44

5.1.5 Análise Da Expressão Gênica da LCAT e HDL 45

5.1.6 Dosagem da LCAT 46

5.2 EXPERIMENTOS EM HUMANOS 47

5.2.1 Características da População Estudada 47

5.2.2 Dosagem da LCAT 48

5.2.3 Dosagem da HDL 49

6 DISCUSSÃO 51

7 CONCLUSÃO 55

REFERÊNCIAS 56

ANEXOS 66

1 INTRODUÇÃO

A sepse é definida atualmente como uma disfunção orgânica grave, resultante da resposta inflamatória sistêmica desregulada do hospedeiro à infecção, em geral por agentes bacterianos (SEYMOUR *et al*., 2016). Esta doença pode ainda estar associada a um quadro de anormalidades em nível circulatório e metabolismo celular, o que caracteriza o choque séptico, podendo evoluir para falência múltipla dos órgãos e sistemas e morte do paciente (ABRAHAM, 2016; SHANKAR-HARI *et al*., 2016).

A sepse é considerada um problema de saúde mundial. Apesar dos inúmeros avanços no diagnóstico e tratamento, dados recentes revelaram que a taxa anual de surgimento de novos casos é cerca de 30 milhões (GSA, 2017). Segundo o Instituto Latino Americano de Sepse (ILAS, 2015), a sepse é a maior responsável pela elevada taxa de mortalidade observada nas unidades de terapia intensiva (UTIs) e uma das principais causas de morte hospitalar tardia, superando acidente vascular isquêmico, infarto agudo do miocárdio, além do câncer de intestino e mama associados (GIACOMINI *et al*., 2015). Além disso, ela é responsável pela geração de altos custos financeiros, tanto nos setores públicos como nos privados, por conta dos medicamentos dispendiosos e a necessidade de equipamentos sofisticados (ILAS, 2015).

Essa doença é caracterizada por uma resposta inflamatória sistêmica que resulta da inabilidade do sistema de imunológico do organismo em controlar uma infecção (VINCENT *et al*., 2013). Como consequência, essa resposta inflamatória leva ao comprometimento de muitos órgãos gerando um quadro de choque séptico, que evolui para síndrome de múltiplos órgãos e sistemas, responsável pelas altas taxas de óbitos (SILVEIRA; FERREIRA; LAGE, 2014). Além desse processo inflamatório sistêmico característico da sepse, outras alterações também são relatadas em relação ao metabolismo celular que afetam, principalmente, o metabolismo de carboidratos, de lipídeos, bem como, suas lipoproteínas (CAPPI *et al*., 2012).

Em relação às lipoproteínas, estas desempenham um papel importante no transporte dos lipídeos, principalmente, do colesterol. A lipoproteína de alta densidade (HDL), através do transporte reverso do colesterol, é a responsável pela manutenção da homeostase do colesterol, prevenindo assim a formação de processos ateroscleróticos. Outras funções biológicas da HDL vêm sendo relatadas, inclusive como indicativo de bom prognóstico em quadros sépticos. A função desempenhada pela HDL só é possível pela ação de esterificação do colesterol realizada pela enzima Lecitina colesterol aciltransferase (LCAT) *(*ROUSSET *et al*., 2009).

A LCAT é responsável pela formação de ésteres de colesterol, favorecendo a maturação da HDL (SORCI-THOMAS; BHAT; THOMAS, 2009). Nos pacientes sépticos, os níveis da HDL encontram-se diminuídos quando comparados com os níveis de indivíduos saudáveis (CAPPI *et al*., 2012). No entanto, até o momento, poucos estudos observaram se há uma relação dos níveis reduzidos da LCAT com a baixa da HDL, e se esse fato poderia estar associado à disfunção da resposta inflamatória o que leva a fator de pior prognóstico na sepse (CHIEN *et al*., 2005; BARLAGE *et al*., 2009; CONTRERAS-DUARTE *et al*., 2014).

Diante disto, o objetivo do presente estudo foi avaliar as alterações que ocorrem na LCAT e na HDL, bem como investigar a associação entre elas na sepse. Essa análise ocorreu em condições de sepse, tanto em modelo experimental, como em humanos, com a finalidade de auxiliar o entendimento da fisiopatologia desta doença e, como isso pode servir no desenvolvimento de novas terapias adjuvantes no tratamento da sepse.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 SEPSE

2.1.1 Considerações Gerais e Definições

A palavra sepse, do grego *septikós*, significa putrefação ou decomposição da matéria orgânica por um agente infeccioso (SINGH; EVANS, 2012). Antigamente, a sepse era conhecida como septicemia, síndrome séptica ou infecção generalizada. Essa pluralidade nas definições para caracterizar um paciente com infecção grave gerava limitações tanto em nível assistencial, como de pesquisa. Como resultado, havia uma demora no diagnóstico, além de dificuldades na avaliação do tratamento e na comparação com outros estudos (ILAS, 2015).

Em 1991, houve a primeira tentativa de modificar essa problemática. A *Society Critical Care Medicine* (SCCM) e o *American College of Chest Physicians* (ACCP) se reuniram, pela primeira vez, com o objetivo de estabelecer uma nomenclatura padrão para a sepse e seus graus de variação. No ano seguinte, essas definições foram publicadas e, apesar das suas limitações, continuam sendo utilizadas até os dias atuais (BONE *et al*., 1992; CARVALHO; TROTTA, 2003; MATOS; VICTORINO, 2004). Assim, a sepse foi definida como uma síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SRIS) em decorrência a uma infecção, geralmente por agentes bacterianos. Essa síndrome é caracterizada pela presença de pelo menos dois ou mais sinais: temperatura corporal >38 ºC ou < 36 ºC; frequência cardíaca >90 bmp; frequência respiratória > 90 irpm ou $PaCO_2$ < 32 mmHg; contagem leucocitária superior a 12000/mm^3 ou inferior a 4000 /mm^3, ou ainda >10% bastões (SILVA, 2006).

O quadro de sepse grave apresenta-se como uma associação da sepse à disfunção de pelo menos um órgão. O choque séptico, forma mais grave da síndrome séptica, é caracterizado quando há a persistência do choque mesmo após reposição volêmica adequada, sendo necessária a utilização de vasopressores e intervenções imediatas a fim de evitar a progressão para o quadro de disfunção dos múltiplos órgãos e sistemas (SILVA, 2006; SILVA, 2008).

No ano de 2001, devido às inúmeras críticas sofridas pela falta de especificidade das definições propostas, essas mesmas sociedades se reuniram novamente na tentativa de padronizar novos critérios para a identificação precoce da sepse, ampliando a lista de sinais e sintomas que estão presentes nos pacientes sépticos (**Quadro 1**). Apesar de toda a polêmica, concluiu-se que a classificação anterior ainda era útil, apesar de não caracterizar de forma

precisa a resposta do organismo frente à infecção, mas continua sendo a mais utilizada na prática clínica (MATOS; VICTORINO, 2004).

Quadro 1: Critérios diagnósticos para sepse.

Variáveis gerais
• Febre e hipotermia • Taquicardia • Taquipneia • Alteração do estado mental • Edema ou balanço hídrico positivo • Hiperglicemia
Variáveis inflamatórias
• Leucocitose, leucopenia ou desvio à esquerda • Elevação de procalcitonina ou proteína C reativa
Variáveis hemodinâmicas
• Hipotensão arterial • Saturação venosa baixa • Débito cardíaco aumentado
Variáveis de disfunção orgânica
• Hipoxemia • Redução do débito urinário ou elevação creatinina • Alteração da coagulação ou plaquetopenia • Intolerância dieta (alteração da motilidade intestinal) • Alteração da função hepática (aumento de bilirrubinas)
Variáveis de perfusão tecidual
• Hiperlactatemia • Diminuição de enchimento capilar ou livedos

Fonte: Adaptado de LEVY *et al*. (2003).

Em 2016, o *Journal of the American Medical Association* (JAMA) publicou novas definições sobre sepse e choque séptico, elaborada pela *Society of Critical Care* Medicine (SCCM) e pela *European Society of Intensive Care Medicine* (ESICM). Essa atualização trouxe um novo conceito clínico de sepse, que passou a ser definida como uma disfunção orgânica grave, em decorrência a uma resposta inflamatória do organismo, desencadeada por uma infecção. Para identificar essa disfunção, deve utilizar-se agora o escore de disfunção orgânica, o *Sepsis-related Organ Failure Assessment* (SOFA). A alteração aguda de 2 pontos ou mais no SOFA, em associação à infecção, caracteriza o quadro séptico (**Tabela 1**)

(ABRAHAM, 2016; SEYMOUR *et al*., 2016; SHANKAR-HARI *et al*., 2016; SINGER *et al*., 2016).

Tabela 1: Avaliação de falha de órgãos relacionada à sepse pelo SOFA escore.

Tabela 1. Sequential [Sepsis-Related] Organ Failure Assessment Score[a]

	0	1	2	3	4
Respiratório PaO_2/FiO_2 **(mmHg)**	> 400	≤ 400	≤ 300	≤ 200 com suporte ventilatório	≤ 100 com suporte ventilatório
Coagulação *Plaquetas* ($x10^3/\mu L$)	> 150	≤ 150	≤ 100	≤ 50	≤ 20
Fígado *Bilirrubinas* (mg/dL)	< 1,2	1,2 - 1,9	2,0 - 5,9	6,0 – 11,9	> 12
Cardiovascular	Ausência de hipotensão	PAM < 70 mmHg	Dopamina ≤ 5 mg/kg/min ou Dobutamina (qualquer dose)	Dopamina ≥ 5 mg/kg/min ou epinefrina ou noradrenalina ≤ 0,1 mg/kg/min	Dopamina >15 mg/kg/min ou epinefrina ou noradrenalina > 0,1 mg/kg/min
Neurológico *Glasgow*[b]	15	13 a 14	10 a 12	6 a 9	< 6
Renal *Creatina* (mg/dL) *Débito urinário*	< 1,2	1,2 a 1,9	2,0 a 3,4	3,5 a 4,9 < 500 mL/dia	> 5,0 < 200 mL/dia

Abreviações: FiO_2, fração inspirada de oxigênio; PAM, pressão arterial média; PaO_2, pressão parcial de oxigênio.
[a]Adaptado de Vincent et al.,
[b]Escala Glasgow Coma os escores variam de 3 - 15; maior pontuação indica melhora na função neurologia.

Fonte: Adaptado de SINGER *et al*. (2016)

Além disso, houve a eliminação do conceito de SRIS, por entender que era inespecífico e pouco claro, bem como, o de sepse grave que se tornava redundante em relação à sepse. O choque séptico é definido como um conjunto de anormalidades circulatórias e do metabolismo celular, sendo caracterizado como a sepse associada à hipotensão refratária com necessidade de utilizar um vasopressor para conseguir manter a pressão arterial acima de 65 mmHg e lactato sérico > 2 mmol/L (18 mg/dL), na ausência de hipovolemia (SINGER *et al*., 2016).

Adicionalmente ao proposto em 2016, foi criado um novo escore que tem como base o SOFA, denominado de qSOFA (*quick SOFA – quick SEQUENTIAL ORGAN FAILURE ASSESSMENT SCORE*). Esse escore tem como função identificar possíveis pacientes com risco de desenvolver sepse, pois, ao contrário do SOFA original, ele não faz uso de nenhuma variável laboratorial, sendo mais fácil e prático a sua utilização à beira do leito. Seus critérios avaliam três variáveis, que são a pressão arterial sistólica < 100 mmHg, a frequência respiratória > 22/min e a alteração do estado mental (escala de coma de Glasgow < 15). Cada uma dessas contará com um ponto no escore, que varia de 0 a 3, sendo a pontuação ≥ 2 pontos indicativa de risco elevado de permanência na unidade de terapia intensiva (UTI) ou de mortalidade (SINGER *et al*., 2016).

Apesar disso, o Instituto Latino Americano de Sepse (ILAS), em conjunto com outras sociedades renomadas, como a *American College of Chest Physicians* e a *American College of Emergency Physicians*, não apoiaram as novas definições propostas, em razão da não

inserção de representantes dos países, conhecidos como de médios e baixos recursos, como o Brasil, além da falta de dados dos mesmos, uma vez que é sabido que a sepse se comporta de maneira diferenciada quando comparada aos de primeiro mundo. Outros pontos que o ILAS contestou foi em relação à utilização do qSOFA, de um preditor de morbimortalidade sem validação, como um instrumento de triagem de pacientes graves e, a retirada do nível de lactato como um dos critérios no SOFA escore. Diante disso, na prática clínica, ao menos no Brasil, essas mudanças conceituais não devem afetar as recomendações que continuarão seguindo as já adotadas (ILAS, 2016).

No contexto clínico, a *Acute Physiology and Chronic Health Evaluation* II (APACHE II) é o índice prognóstico mais utilizado e está validada como preditor de mortalidade em várias situações clínicas. Para determinar a gravidade da doença, o APACHE II utiliza os piores resultados de 12 critérios clínicos, fisiológicos e laboratoriais obtidos durante as primeiras 24 horas de internação na UTI, considerando ainda a idade e a presença de doença crônica prévia. A probabilidade de morte hospitalar do pacientes está correlacionada a valores elevados de escore APACHE II (KNAUS *et al*., 1985; CARDOSO; CHIAVONE, 2013).

2.1.2 Epidemiologia da Sepse

A sepse representa um importante problema de saúde pública mundial, uma vez que é a principal causa de morte nas UTIs não cardiológicas em todo o mundo (MAYR; YENDE; ANGUS, 2014; ILAS, 2015). De acordo com dados recentes da Aliança Global da Sepse (GSA, 2017), 30 milhões de novos pacientes no mundo anualmente surgem em decorrência da sepse, dos quais cerca de oito milhões chegam ao óbito. Entre estes, seis milhões acometem crianças e recém-nascidos e 10 milhões de mulheres desenvolve o quadro séptico na gravidez ou no parto. Além disso, sua taxa de mortalidade aumenta cerca de oito a 13% ao ano (KISSOON *et al*., 2011; REINHART; DANIELS; MACHADO, 2013).

Nos Estados Unidos, a sepse é a décima causa de morte sendo a principal responsável pelos óbitos nas UTIs hospitalares. A mortalidade e incidência permanecem elevadas por conta dos tratamentos invasivos necessários em pacientes com doenças graves e pelo aumento da expectativa de vida, que aumenta o número de pacientes idosos (ANGUS *et al*., 2001; RANGEL-FRAUSTO, 2005; VINCENT *et al*., 2002). Esses números superam as taxas de mortalidades da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) e a dos principais tipos de câncer (próstata e mama). Além disso, o tratamento de pacientes sépticos, por envolver uma estadia prolongada nas UTIs implica custos mais elevados para o país. Segundo a *Agency for*

Healthcare Research and Quality, os custos chegam a mais de 20 mil dólares por paciente, o que totaliza 16,7 bilhões de dólares ao ano (KOURY; LACERDA; BARROS NETO, 2006).

Na Europa, um estudo multicêntrico realizado em 198 UTIs de 24 países mostrou uma incidência de 37% decorrente da sepse, apresentando uma mortalidade geral de 24,1%. Em relação aos pacientes com sepse grave e choque séptico, a taxa de mortalidade foi de 32,2% e 54,1%, respectivamente (SILVA *et al*., 2004; VINCENT *et al*., 2006)

No Brasil, apesar dos poucos dados epidemiológicos sobre a sepse, alguns estudos foram realizados no sentido de determinar sua incidência. O primeiro estudo de grande porte foi o BASES (*Brazilian Sepsis Epidemiological Study*), no qual avaliou pacientes internados em cinco UTIs de duas regiões brasileiras (sul e sudeste) e, revelou que a incidência para sepse foi de 61,4%, e, que sepse grave e choque séptico apresentaram valores de 35,6% e 30%, respectivamente. Além disso, o índice de mortalidade nesses pacientes foi de 34,7% (sepse), 47,3% (sepse grave) e 52,2% (choque séptico) (SILVA *et al*., 2004; SIQUEIRA-BATISTA et al., 2011).

Sales Júnior e colaboradores (2006), no estudo Sepse Brasil, demonstraram que a sepse é responsável pela alta mortalidade nas UTIs no país. Este estudo avaliou 75 UTIs, distribuídas proporcionalmente em todas as regiões do país e, concluiu que a taxa de mortalidade dos pacientes com sepse foi de 16,7%, sepse grave foi de 34,4% e choque séptico encontrava-se 65,3%, uma das principais complicações observadas nessa síndrome (HENKIN *et al*., 2009).

Outro estudo, também multicêntrico, o PROGRESS (*Promoting Global Research Excellence in Severe Sepsis*), realizado em 7 UTIs, revelou ainda que as taxas de letalidade nas UTIs do Brasil eram maiores (56%) que aquelas observadas em outros países em desenvolvimento (45%) e em comparação aos países desenvolvidos (30%) (BEALE *et al*., 2009; SIQUEIRA-BATISTA *et al*., 2011). Em relação ao índice de morte em decorrência de choque séptico, este se mostrou bastante elevado no Brasil, girando em torno de 52,2% a 65,3%, quando comparado a nível mundial, que fica entre 30% à 40% (SOGAYAR; MACHADO; REA-NETO, 2008; BEALE *et al*., 2009). Taniguchi e colaboradores (2014) realizaram um estudo recente, no qual se analisou o Brasil num período entre 2002-2010 e, demonstrou que a taxa de mortalidade entre esses anos cresceu de 9,77%, em 2002, para 12,9%, no ano de 2010.

Em relação ao nordeste brasileiro, um estudo realizado por Koury e colaboradores (2006), num hospital privado de grande porte da cidade do Recife, observou que a incidência de sepse foi de 61,9% e, que as taxas de mortalidade de pacientes admitidos por sepse grave e

choque séptico foram de 36,3% e 63,8%, respectivamente, mostrando uma associação entre a gravidade da sepse e o risco de morte.

Corroborando com os dados anteriores, um protocolo elaborado pelo hospital Sírio-Libanês (2014) mostrou que a sepse é a principal causa de morte nas UTIs e, uma das principais causas de mortalidade hospitalar tardia, superando o infarto do miocárdio e alguns tipos de câncer (GIACOMINI *et al*., 2015). Ainda segundo esse protocolo, o choque séptico, forma mais grave da síndrome, possui uma elevada mortalidade no país, ultrapassando 60% dos casos, superando a média mundial que é de 37%.

De fato, a sepse é a principal geradora de custos nas UTIs dos setores público e privado. Isto é devido à necessidade de utilizar equipamentos sofisticados, medicamentos caros e exigir muito trabalho das equipes médicas. Segundo o ILAS (2015), no Brasil há uma estimativa de pelos menos 400 mil casos por ano, que resultam em cerca de 240 mil mortes e mais de R$ 20 bilhões destinados ao tratamento.

2.1.3 Fisiopatologia da Sepse

O processo inflamatório é uma resposta normal do organismo frente a um agente infeccioso (COTRAN; KUMAR; ROBBINS, 2000). No entanto, quando há uma falha nesse processo temos uma exacerbação desta resposta, o que desencadeia uma inflamação sistêmica. Este fato pode ser observado tanto na SRIS, como na sepse (JÚNIOR *et al*., 1998; CIANCIARULLO *et al*., 2008).

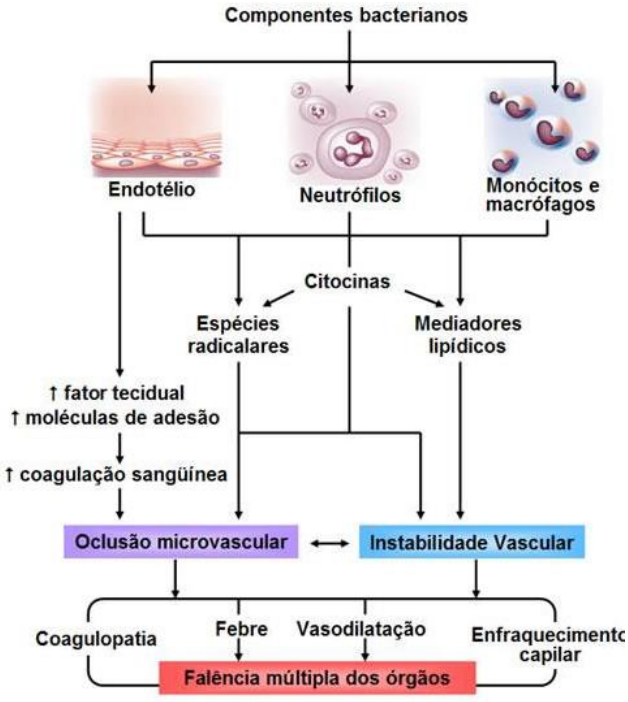
A sepse resulta de uma complexa interação entre o microrganismo e o hospedeiro. Essa interação tem início pelo reconhecimento das substâncias do patógeno expressas em sua superfície, denominadas padrões moleculares associados a patógenos (PAMP) (SIQUEIRA-BATISTA *et al*., 2011). Esses PAMPs são estruturas moleculares não-variáveis expressas por grupos de patógenos, as quais são cruciais para a virulência e/ou sobrevivência do agente. Os componentes da parede bacteriana são os principais exemplos dessas estruturas, como o ácido lipoteicóico (LTA), no caso dos microrganismos gram-positivos, e as endotoxinas dos gram-negativos, formados principalmente por lipopolissacarídeos (LPS), que estão entre os PAMPs mais bem estudados (JÚNIOR *et al*., 1998; KORTGEN; HOFMANN; BAUER, 2006; SIQUEIRA-BATISTA *et al*., 2011).

Os PAMPs são reconhecidos por receptores encontrados nas células do sistema imune inato, como macrófagos, neutrófilos e células dendríticas. Esses receptores são coletivamente denominados de receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) (FLOHÉ *et al*., 2006).

Entre os membros mais importantes dos PRRs, destacam-se os receptores do tipo *Toll-like* (TLRs) (TAKEDA; KAISHO; AKIRA, 2003). No caso das endotoxinas bacterianas, essas moléculas são transferidas aos receptores CD14 e TLR4, por uma proteína plasmática ligadora de LPS, a chamada LBP. Entretanto, nas infecções por gram-positivas, é o TLR2 o responsável pela sinalização dos proteoglicanos presentes nessas bactérias (SIQUEIRA-BATISTA *et al*., 2011).

A ligação dos componentes bacterianos com seus respectivos receptores desencadeia a ativação inicial de uma resposta inflamatória local. Essa resposta tem como consequência a ativação direta das células endoteliais, leucócitos, como neutrófilos, do sistema complemento e, há indiretamente a ativação da cascata inflamatória, pela indução da produção de citocinas, pelos macrófagos e monócitos (**Figura 1**) (JÚNIOR *et al*., 1998; MACHADO *et al*., 2004). Os neutrófilos são as primeiras células a chegarem ao foco inflamatório, principalmente aquele decorrente de um processo bacteriano (JÚNIOR *et al*., 1998).

Figura 1: Mecanismos fisiopatológicos envolvidos na evolução da sepse.



Fonte: Adaptado de LOLIS & BUCALA (2003)

Contudo, à medida que os produtos bacterianos alcançam a circulação, por conta do descontrole do processo infeccioso local, há a liberação de mediadores químicos que induz a uma resposta inflamatória generalizada, de fase aguda, a SRIS frente a um processo infeccioso, caracterizando sepse (COELHO; MARTINS, 2012; VINCENT *et al*., 2013;

SANTOS *et al*., 2016). A sepse ativa também a produção de diversas citocinas anti- e pró-inflamatórias, entre as quais, destacam-se as interleucinas: IL-1, IL-8, IL-10, IL-11, IL-12, IL-18 e IL-6, além do aumento do fator de necrose tumoral (TNF) α (JANEWAY; MEDZHITOV, 2002; LIMA; FRANCO, 2010).

As altas concentrações desses mediadores inflamatórios levam a um efeito lesivo e deletério, modificando desse modo a migração de leucócitos para o controle da infecção (ALVES-FILHO *et al*., 2006). Como exemplo, o TNF-α e a IL-8 que são importantes para a migração dos neutrófilos até o foco infeccioso, mas em altas concentrações acabam exercendo um papel contrário, pois diminuem essa capacidade migratória destas células (BENJAMIM et al., 2002). Outros mecanismos envolvidos também na falência de migração de neutrófilos para o local da infecção vêm sendo relatados, tais como: a ativação excessiva dos receptores TLRs, a perda de receptores quimiotáticos na superfície dos neutrófilos circulantes e o aumento da concentração de óxido nítrico. Além disso, dados da literatura mostram que a indução da expressão do receptor CCR2 nos neutrófilos está relacionada com o sequestro destas células para órgãos secundários, fenômeno este relacionado com a síndrome de disfunção múltipla de órgãos e sistemas na sepse (RIOS-SANTOS *et al*., 2007; ALVES-FILHO *et al*., 2009; ALVES-FILHO *et al*., 2010; SOUTO *et al*., 2011).

No entanto, mesmo diante dos recentes avanços para a compreensão do desenvolvimento da sepse, sua fisiopatologia ainda não está totalmente elucidada (CASTRO *et al*., 2008). Um número significativo de estudos busca, principalmente, o entendimento em relação às alterações inflamatórias e imunológicas presentes nessa doença. Existe ainda uma carência de estudos para melhor entendimento dos eventos fisiopatológicos acerca dos distúrbios do metabolismo das lipoproteínas e das enzimas que também ocorrem durante o quadro séptico. Neste sentido, esta dissertação visa auxiliar a compreensão da sua fisiopatologia, especificamente no que se refere às alterações do metabolismo das lipoproteínas, além de suas enzimas, em condições de sepse, e como estas podem servir como um possível alvo terapêutico.

2.2 LIPOPROTEÍNAS

Novos estudos têm sido realizados diante do crescente número de mortes anuais por conta da sepse, visando melhor compreender a sua fisiopatologia, bem como na busca por diferentes opções terapêuticas no seu tratamento. Apesar da carência de estudos que relacionem os distúrbios envolvendo o metabolismo lipoproteico nessa patologia, sabe-se que

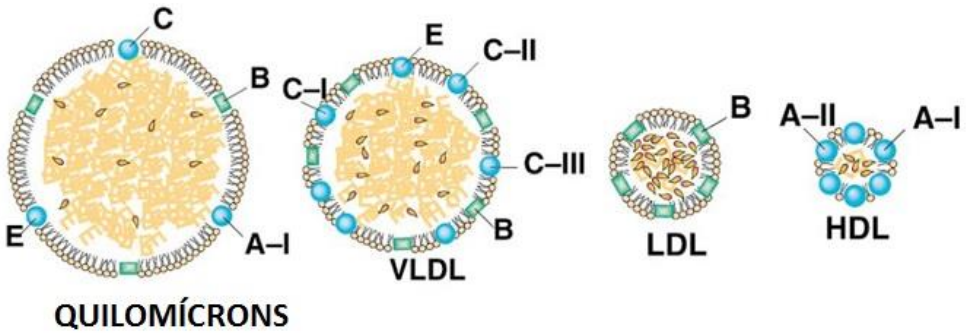
esta parece ser uma importante alternativa para o entendimento do seu desenvolvimento, além de servir como uma nova proposta de terapia para o tratamento desses pacientes (LEKKOU *et al*., 2014). Dessa forma, faz-se necessário uma abordagem geral sobre o metabolismo das lipoproteínas e as enzimas envolvidas nesse processo, além das funções desempenhadas pelos mesmos.

As lipoproteínas são partículas globulares compostas por um núcleo central hidrofóbico, formado principalmente por triglicerídeos (TG) e ésteres de colesterol, circundado por uma monocamada formada por lipídios anfipáticos, os fosfolipídeos e colesterol não-esterificado, associados à uma ou mais proteínas, denominadas apolipoproteínas (GENEST, 2003; BIGGERSTAFF; WOOTEN, 2004).

As apolipoproteínas (apo) são encontradas tanto na forma integral na estrutura das lipoproteínas, como presentes na parte periférica. Quando periféricas, as apo podem existir livres no plasma, bem como, serem trocadas entre as lipoproteínas plasmáticas. Elas, além de desempenharem um papel estrutural (apo B, E, A-I, A-II), funcionam também como sítios de ligação para os receptores de superfície da membrana celular (apo A-I, B-100, E). Atuam ainda na montagem e secreção de algumas lipoproteínas (apo B-100 e B-48) e servem como cofatores de enzimas envolvidas no metabolismo das lipoproteínas (apo A-I, C-II, C-III) (GENEST, 2003; MORENO; CARTAGENA; MORA, 2006).

As lipoproteínas plasmáticas são classificadas de acordo com o tamanho e densidade, que é inversamente proporcional ao seu teor de lipídios. Em relação ao tamanho relativo, quanto menor for à porcentagem de proteínas maior será o tamanho das partículas lipoproteicas. As quatro principais categorias de lipoproteínas são, em ordem crescente de concentração proteica, os quilomícrons, a lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL), a lipoproteína de baixa densidade (LDL) e, por fim, a lipoproteína de alta densidade (HDL) (**Figura 2**) (ARSENAULT; BOEKHOLDT; KASTELEIN, 2011; CONTRERAS-DUARTE *et al*., 2014).

Figura 2: Classificação das lipoproteínas de acordo com a composição de apolipoproteínas e densidade.[1]



Fonte: Adaptado de WILEY-LISS (1997)

Os quilomícrons, sintetizados nas células intestinais, são responsáveis pelo transporte dos lipídeos provenientes da dieta para os tecidos, chamado ciclo exógeno (HUSSAIN, 2000; ALVES *et al*., 2004). Nesse processo, essas partículas vão reduzindo de tamanho pela ação da enzima lipase lipoproteica (LPL), transformando-se nos chamados quilomícrons remanescentes. A LPL é encontrada na face luminal da membrana das células endoteliais dos capilares e é responsável pela hidrólise dos TG presentes no núcleo dos quilomícrons, liberando assim os ácidos graxos para os tecidos periféricos (GENEST, 2003).

De origem hepática, as VLDL têm como função transportar os TG e colesterol do fígado para os tecidos periféricos. Essa lipoproteína, assim como os quilomícrons, também sofre a ação da LPL, originando as lipoproteínas de densidade intermediária (IDL), que são partículas de tamanho intermediário ou remanescentes de VLDL (GENEST, 2003).

A LDL, por sua vez, é a principal transportadora de colesterol sérico. Além disso, ela fornece este lipídeo para os tecidos extra-hepáticos, através da ligação ao seu receptor na membrana plasmática (SIQUEIRA; ABDALLA; FERREIRA, 2006). No entanto, a LDL possui propriedades aterogênicas, ou seja, altas concentrações desta lipoproteína no plasma estão associadas a um fator de risco para a formação de ateromas, que são placas gordurosas formadas pela deposição de lipídeos, em especial o colesterol, nas paredes internas das artérias. Esses ateromas acabam por lesionar o endotélio, ocasionando uma resposta inflamatória crônica na parede arterial, processo que caracteriza a doença aterosclerótica (VON ECKARDSTEIN; NOFER; ASSMANN, 2001; DAVIGNON; GANZ, 2004; ABDALLA; SENA, 2008).

A lipoproteína HDL, diferentemente da LDL, faz o transporte no sentido inverso, pois remove o excesso de colesterol livre dos tecidos periféricos até o fígado, onde esse será novamente metabolizado ou excretado pela bile. Dessa forma, a HDL possui propriedades

[1]VLDL = lipoproteína de muito baixa densidade; LDL = lipoproteína de baixa densidade; HDL = lipoproteína de alta densidade; apolipoproteínas A-I, A-II, C, C-I, C-II, C-III, B, E.

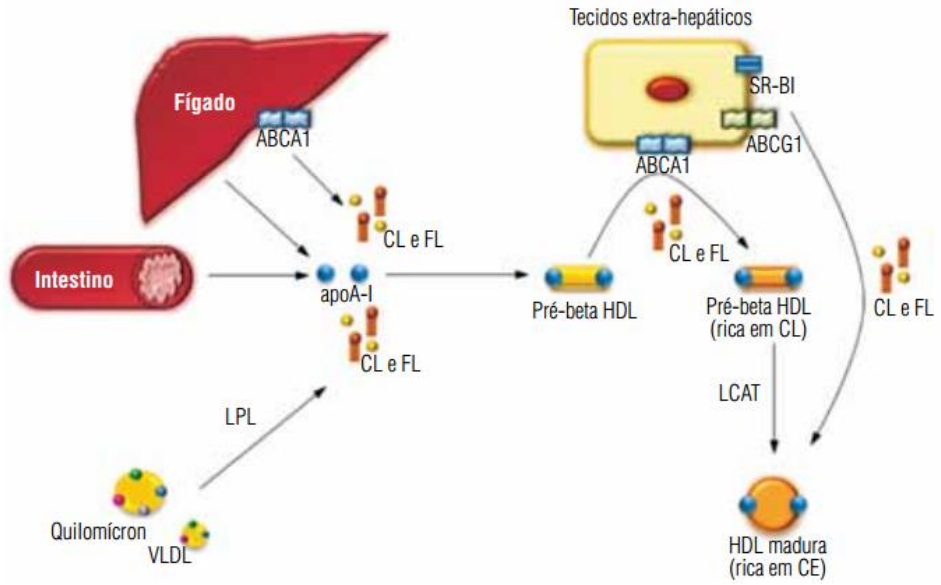
antiaterogênicas, gerando um efeito protetor contra o desenvolvimento da aterosclerose (VON ECKARDSTEIN; NOFER; ASSMANN, 2001; BARTER *et al*., 2003)

2.2.1 Funções Biológicas da HDL

A HDL tem como principal função o transporte reverso de colesterol livre, que é removido dos tecidos periféricos e conduzido para o fígado. Esse mecanismo resulta em uma menor propensão ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares (SANTOS *et al*., 2008; REMALEY; NORATA; CATAPANO, 2014). Outras funções da HDL vêm sendo descritas, tais como: proteção antioxidante; inibição da expressão de moléculas de adesão celular; ativação de leucócitos; estimulação da produção de óxido nítrico; regulação do processo de coagulação e fibrinólise e a inibição da atividade plaquetária (LIMA; COUTO, 2006; LEANÇA *et al*., 2010; GORDON *et al*., 2011; MINEO; SHAUL, 2012).

Em relação a sua síntese, a HDL tem início pela secreção de apolipoproteína A-I (apo A-I) no intestino e fígado. A apo A-I juntamente com os fosfolipídeos forma a chamada HDL nascente ou pré-beta HDL, uma partícula discoide, que é rica em proteínas e possui uma quantidade baixa de colesterol. Essas partículas recebem fosfolipídeos provenientes da hidrólise, realizada pela LPL, dos quilomícrons e das VLDL, por auxílio das proteínas de transferência de fosfolipídios (PLTP). As HDL nascentes obtêm ainda colesterol via transportadores ABCA1 (*ATP-binding cassette transporter A1*), ABCAG1 (*ATP-binding cassette transporter G1*) e o pelo receptor celular *scavenger* classe B tipo 1 (SR-B1) dos tecidos extra-hepáticos, incluindo macrófagos da parede arterial (**Figura 3**) (YANCEY *et al*., 2003; RHAINDS; BRISSETTE, 2004; CAVELIER *et al*., 2006; LEANÇA *et al*., 2010; CONTRERAS-DUARTE *et al*., 2014).

Figura 3: Formação e maturação da HDL.



Fonte: Adaptado de LEANÇA *et al*. (2010) [2]

A lecitina colesterol aciltransferase (LCAT) é uma enzima plasmática ativada pela apo A-I. Esta enzima tem como função esterificar o colesterol recém-adquirido, fazendo com que o mesmo migre para o núcleo da partícula, formando assim uma HDL esférica, enriquecida de colesterol, a chamada HDL madura ou α-HDL_3 (OSSOLI *et al*., 2016). A partir desse processo, os ésteres de colesterol são interiorizados devido ao gradiente de concentração gerado, mantendo o influxo de colesterol livre das células para a molécula de HDL, que dessa maneira passa a capturar mais colesterol e fosfolipídeos da superfície celular (LEANÇA *et al*., 2010; SOUPENE *et al*., 2016).

No fígado, esses ésteres de colesterol podem ser capturados por via direta, através do receptor SR-B1 hepático. Processo no qual, o colesterol presente no interior da partícula será transformado em sais biliares, e por fim, excretado. A captação desses ésteres pode ainda ocorrer de forma indireta pelo fígado, ou seja, através da troca do colesterol esterificado da HDL com os TG dos quilomícrons e as VLDL e, em menor escala LDL, pela proteína de transferência de éster de colesterol (CETP). Dessa maneira, essas lipoproteínas, agora, ricas em colesterol, podem ser então captadas por endocitose mediada pelos receptores presentes na superfície dos hepatócitos, sendo este colesterol excretado na bile (DURRINGTON, 2002; FORTI; DIAMENT, 2006; LEANÇA *et al*., 2010).

2.2.2 Lecitina Colesterol Aciltransferase

[2]CL= colesterol livre; FL= fosfolípides; apo A-I = apolipoproteína A-I; CE= colesterol esterificado.

Nos processos metabólicos, de remodelação e síntese, a HDL sofre influência de diversas proteínas, tais como o SR-B1, ABCA1, apo A-I e LCAT (ZANNIS; CHRONI; KRIEGER, 2006). Esta última destaca-se por conta do seu papel principal na regulação dos níveis de HDL e do colesterol presente na membrana celular (SCHAEFER; ANTHANONT; ASZTALOS, 2014).

A LCAT foi primeiramente identificada como uma enzima chave na esterificação do colesterol e na formação da HDL, por Glomset e colaboradores (1962). Pouco tempo após sua descoberta, ele também atribuiu a essa enzima um caráter antiaterogênico devido a sua importância no processo do transporte reverso do colesterol (GLOMSET *et al*., 1962; GLOMSET, 1962). Nesse processo, a HDL remove o excesso de colesterol das células que são transportados até o fígado para serem excretados (LIMA; COUTO, 2006; ROUSSET *et al*., 2009). O interesse sobre a LCAT aumentou devido ao seu papel na formação das moléculas de HDL e, por esta desempenhar importantes funções, como fator protetor para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares e na endotoxemia, impedindo o processo inflamatório desencadeado pelas endotoxinas bacterianas (LEANÇA *et al*., 2010; GUO *et al*., 2013).

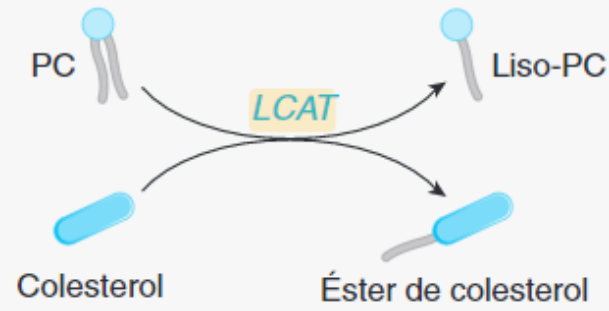
De fato, indivíduos que apresentam deficiência na produção da LCAT, embora raros, podem desenvolver algumas doenças devido ao acúmulo do colesterol não esterificado em alguns tecidos. Essas deficiências são caracterizadas de duas diferentes formas, total ou parcial. Nos casos de déficit completo, há a denominada deficiência de LCAT familiar (FLD), onde os pacientes possuem um quadro de anemia hemolítica e insuficiência renal que pode evoluir ainda para uma doença renal terminal. Quando a deficiência é parcial, os pacientes desenvolvem a chamada doença do olho de peixe (FED) que tem como característica principal a opacidade da córnea em decorrência ao acúmulo de colesterol no local (NG, 2004; LIMA *et al*., 2004; FORTI; DIAMENT, 2006; KUNNEN; VAN ECK, 2012).

A LCAT, sintetizada no fígado e secretada no plasma, é a enzima responsável pela esterificação do colesterol livre que migrará para o núcleo da partícula, tornando a HDL esférica e progressivamente maior, a HDL madura (LEANÇA *et al*., 2010; SANTOS-GALLEGO; BADIMON; ROSENSON, 2014; KRATZER; GIRAL; LANDMESSER, 2014).

Nessa reação unidirecional, que tem a apo A-I como cofator, o colesterol e a fosfatidilcolina (lecitina) da HDL são convertidos em ésteres de colesterol e lisofosfatidilcolina (**Figura 4**) (GLOMSET, 1962; JONAS, 2000; LIMA *et al*., 2004). Esses ésteres por serem formas mais hidrofóbicas de colesterol, acabam direcionando-se para o núcleo da partícula da HDL, gerando assim, um gradiente de concentração que promove o

influxo do colesterol das células para a HDL, além de gerar alterações morfológicas de maturação da mesma (DUFFY; RADER, 2009; JONAS, 2000; NG, 2004; SOUPENE *et al*., 2016).

Figura 4: Reação da LCAT.[3]



Fonte: Adaptado de GOLAN (2009)

Dessa forma, a LCAT é importante por manter diminuídos os níveis de colesterol livre tanto no plasma quanto em nível celular (LIMA *et al*., 2004). Assim, qualquer disfunção dessa enzima poderá, não só promover riscos à saúde, devido aos elevados índices de colesterol no organismo, como também pelos níveis reduzidos da HDL, em consequência da sua baixa maturação (DOBIÁSOVÁ; FROHLICH, 1998).

2.3 ALTERAÇÕES LIPOPROTEICAS NA SEPSE

É amplamente conhecido que o metabolismo de lipoproteínas é afetado por condições inflamatórias, incluindo processos infecciosos e sépticos. Essas alterações não ocorrem somente nos lipídios e nas apolipoproteínas, mas também em enzimas envolvidas no metabolismo lipoproteico. Durante a sepse, as mudanças do perfil lipídico ocorrem em razão da resposta de fase aguda do organismo, com aumento da síntese hepática de lipoproteínas ricas em TG (lipemia da sepse). Além disso, é observada uma redução nos valores séricos do colesterol total, especialmente nas HDL, que está associado à gravidade da doença, susceptibilidade a infecções e a mortalidade (VAN LEEUWEN *et al*., 2003; KHOVIDHUNKIT *et al*., 2004; SHOR *et al*., 2008; CONTRERAS-DUARTE *et al*., 2014).

Nos processos inflamatórios, assim como na sepse, os níveis plasmáticos dos TG e das VLDL apresentam-se elevados. Este fato pode ser devido a uma redução na atividade enzimática da LPL, o que dificultaria a disponibilidade dos TG para os tecidos periféricos,

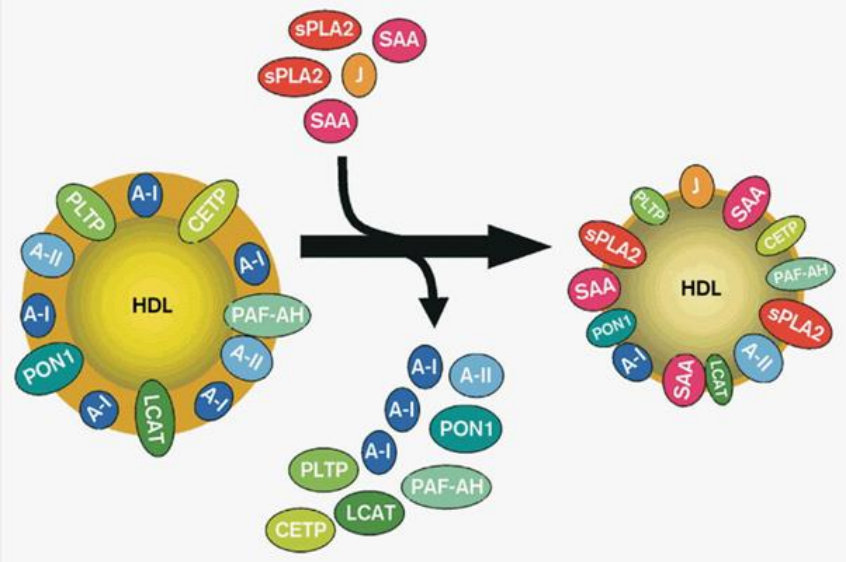
[3] PC= Fosfatidilcolina; LCAT= Lecitina colesterol aciltransferase; Liso-PC= Lisofosfatidilcolina.

diminuindo assim a oxidação dos ácidos graxos livres e favorecendo o aumento das concentrações séricas das VLDL e dos TG (CONTRERAS-DUARTE *et al*., 2014). Essa elevação nos níveis das VLDL pode gerar um efeito protetor, pois estas lipoproteínas são capazes de ligar-se à endotoxinas e facilitar a degradação destas no fígado (CARPENTIER; SOBOTKA, 2008).

Em relação ao colesterol, nos processos inflamatórios e infecciosos, sua concentração sérica apresenta-se reduzida tanto nas LDL como nas HDL. Essa hipocolesterolemia é correlacionada com a gravidade e com o aumento da morbidade e mortalidade dos pacientes sépticos. É observada também uma diminuição dessas lipoproteínas após o início do processo inflamatório da sepse (SOARES *et al*., 2007). Embora os níveis séricos da LDL encontrem-se reduzidos, observa-se um aumento nas suas formas menores e mais densas, que são mais susceptíveis ao processo de oxidação, ou seja, mais aterogênicas (WU; HINDS; THIEMERMANN, 2004; CAPPI *et al*., 2012; NASSAJI, GHORBANI, 2012).

Na sepse, bem como na inflamação, os valores da HDL estão diminuídos (VAN LEEUWEN *et al*., 2003; WENDEL *et al*., 2007; ZHENG; AIKAWA, 2012; CATAPANO *et al*., 2014). Os mecanismos responsáveis pela queda desses valores na sepse, no entanto, ainda não foram totalmente elucidados (NASSAJI, GHORBANI, 2012). Apesar disso, sabe-se que durante a fase aguda, tanto os níveis da HDL, quanto da apo A-I, sua apolipoproteína estrutural, encontram-se reduzidos (NORATA *et al*., 2012). Baixas concentrações de HDL estão inversamente relacionadas a um aumento tanto da gravidade da sepse, bem como na amplificação da resposta inflamatória sistêmica (VAN LEEUWEN *et al*., 2003). É sabido ainda que, proteínas de fase aguda são responsáveis pela redução na quantidade da HDL, como a fosfolipase A2 secretória (sPLA2), por induzir o aumento do catabolismo dos ésteres de colesterol e das apolipoproteínas. A proteína amiloide sérica A (SAA), é responsável também por aumentar o catabolismo das HDL. A SAA induz esse aumento ao deslocar a apo A-I das HDL, transformando-as em HDL de fase aguda, que são rapidamente degradadas no fígado e rins. Além disso, essa aceleração do catabolismo altera a função das HDL no transporte reverso do colesterol (papel antiaterogênico) (WENDEL *et al*., 2007). A incorporação da SAA pela HDL desloca ainda e altera o funcionamento de outras enzimas, como a PON1, PAF-AH e a LCAT, produzindo assim uma HDL com características pró-inflamatórias (**Figura 5**) (VAN LEEUWEN *et al*., 2003; CARPENTIER; SOBOTKA, 2008; GRAVERSEN *et al*., 2008; CATAPANO *et al*., 2014; PARRA; CASTRO; MASANA, 2015).

Figura 5: Transformação da HDL em HDL de fase aguda.



Fonte: Adaptado de ROHRER *et al*. (2004) [4]

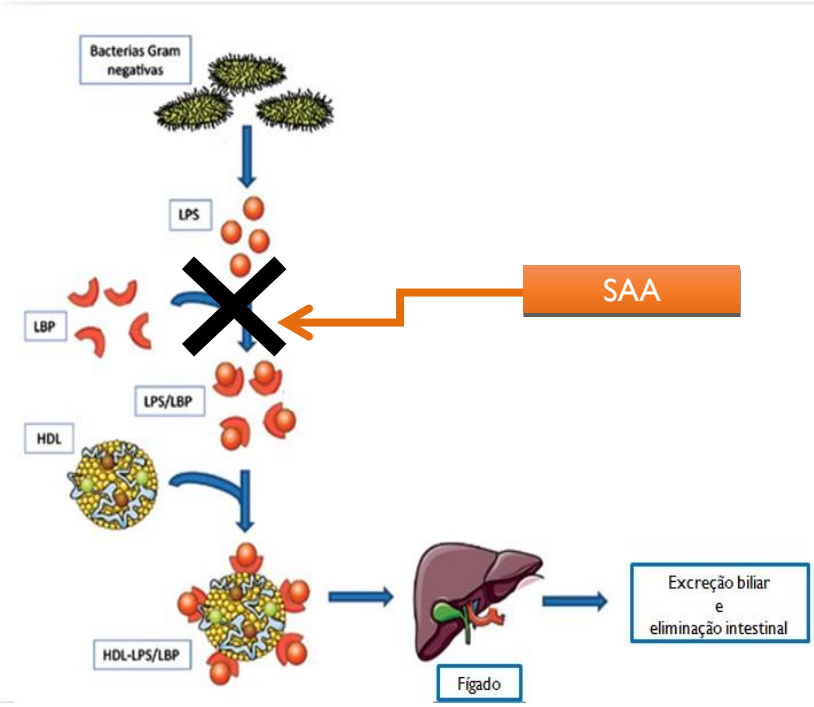
Fisiologicamente, o papel antiaterogênico da partícula de HDL é atribuído às suas atividades antioxidantes, antitrombóticas e anti-inflamatórias (LEANÇA *et al*., 2010). Essas funções estão relacionadas com as enzimas que compõem a molécula da HDL. Um exemplo de enzima é a paraoxonase sérica humana (PON-1), associada à HDL, que hidrolisa os produtos da peroxidação lipídica, prevenindo assim a oxidação das lipoproteínas (SANTOS-GALLEGO *et al*., 2014; SORAN; SCHOFIELD; DURRINGTON, 2015). Outra enzima, presente na HDL é a acetil-hidrolase do fator ativador de plaquetas (PAF-AH), que possui atividades anti- e pró-aterogênicas. A PAF-AH, ao hidrolisar os fosfolípideos oxidados, protege as LDL de sofrer oxidação. Por outro lado, ao hidrolisar a fosfatidilcolina, presente na superfície das LDL, acaba favorecendo a formação de ateromas, uma vez que esta reação leva a geração da lisofosfatidilcolina, molécula responsável por efeitos importantes nas lipoproteínas de baixa densidade oxidadas (OxLDL), tais como, indução das moléculas de adesão e a quimiotaxia dos monócitos (CAPPI *et al*., 2012). Em condições sépticas, as concentrações dessas enzimas estão alteradas, de modo que os níveis da PON-1 apresentam-se baixos, o que reduz as propriedades antioxidante da HDL, ao contrário dos níveis PAF-AH que se encontram elevados, tornando a molécula da HDL pró-aterogênica (CARPENTIER; SOBOTKA, 2008; PAIVA; DAVID; DOMONT, 2010; NASSAJI, GHORBANI, 2012; NORATA *et al*., 2012).

O efeito anti-inflamatório da HDL está relacionado à sua capacidade de neutralizar os LPS circulantes (MURCH *et al*., 2007; THABUT *et al*., 2007). A elevada afinidade do LPS

[4] J = apolipoproteína J.

pela HDL é devida ao fato desta ter a apo A-I como seu principal componente proteico. Porém, em condições de fase aguda, essa função encontra-se prejudicada, por conta da presença da SAA na estrutura da HDL, que leva ao deslocamento da apo A-I da composição da mesma (BARLAGE *et al*., 2001). Assim, por conta da ligação do LPS ao seu receptor celular CD14, presente em macrófagos, monócitos e neutrófilos, vai haver um aumento da ativação das vias inflamatórias, com rápida depuração da HDL, ocasionando uma baixa nos seus níveis, além de, aumentar e perpetuar a resposta inflamatória sistêmica, contribuindo para a falência dos diversos órgãos e sistemas (**Figura 6**) (PAIVA; DAVID; DOMONT, 2010). Dessa forma, a atividade anti-inflamatória da HDL, de se ligar as endotoxinas bacterianas e neutralizá-las, fica comprometida, levando a um pior prognóstico do quadro séptico (GUO *et al*., 2013). Corroborando com esses dados, Levels e colaboradores (2007) relataram que pacientes com deficiências genéticas para LCAT são mais susceptíveis as infecções e, além disso, pacientes submetidos à endotoxemia apresentam a atividade reduzida dessa enzima.

Figura 6: Modificações na capacidade de neutralização da LPS pela HDL.



Fonte: Adaptado de: CONTRERAS-DUARTE *et al*. (2014)

Outro mecanismo que também parece estar envolvido na redução dos níveis da HDL na sepse, embora ainda não muito caracterizado, é a inadequada esterificação do colesterol, pela redução da atividade da LCAT (BARLAGE *et al*., 2001). É relatado que em processos inflamatórios e infecciosos há uma provável redução na atividade enzimática da LCAT, o que

leva a uma formação diminuída de ésteres de colesterol afetando a maturação das partículas de HDL (LEVELS *et al*., 2007). Modificações na composição lipídica da HDL, a regulação de certas citocinas, a exemplo da IL-2, pró-inflamatória, ou ainda, pela presença da SAA em substituição a apo A-I, cofator da enzima, foram relatados como possíveis responsáveis pela baixa na atividade da LCAT, tanto em situações de processos inflamatórios, como em sepse (BARLAGE *et al*., 2001).

Diante do exposto, este trabalho visou contribuir para melhor compreensão no que se relaciona ao funcionamento da LCAT em condições de sepse, tanto por meio de modelo experimental, como em humanos. O papel desempenhado por esta enzima é importante para a maturação e consequente realização do transporte reverso do colesterol pelas partículas de HDL, além do que, níveis reduzidos desta lipoproteína estão relacionados à piores prognósticos nos pacientes sépticos. Entender como a LCAT se comporta em condições de sepse é importante para um melhor entendimento de como esta enzima está relacionada à fisiopatologia desta doença, além de abrir um novo rumo na pesquisa para a busca de diferentes alvos terapêuticos adjuvantes no tratamento da sepse.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- Correlacionar os níveis plasmáticos da LCAT na sepse experimental e em pacientes sépticos com a resposta inflamatória da doença.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Padronizar o modelo de sepse experimental nas condições do nosso laboratório;
- Avaliar os níveis sistêmicos da LCAT em diferentes graus de sepse experimental;
- Analisar o parâmetro inflamatório de migração de leucócitos e carga bacteriana (local e sistêmica) na sepse experimental;
- Analisar a expressão gênica da LCAT e da HDLBP em modelo experimental;
- Avaliar a atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) no infiltrado neutrofílico no pulmão de animais submetidos a diferentes graus de sepse experimental;
- Quantificar os níveis séricos da LCAT em pacientes sépticos;
- Correlacionar os níveis da LCAT com os valores de APACHE II e SOFA;
- Avaliar os níveis da LCAT e correlacionar com os níveis de HDL nos pacientes sépticos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 EXPERIMENTOS EM HUMANOS

4.1.1 Controle e Pacientes Sépticos

Foram incluídos nove pacientes internados na UTI do Hospital Cardiológico de Pernambuco (PROCAPE) como indivíduos controles. Foram incluídos 29 pacientes com indicativo de sepse, também admitidos na UTI do PROCAPE. Esses pacientes foram divididos em dois grupos. O primeiro grupo foi constituído por 17 pacientes que apresentavam valores de APACHE II $\geq$ 25/SOFA $\geq$ 7. O outro grupo foi formado por 12 pacientes com APACHE II <25/SOFA <7.

A medição dos índices prognósticos realizou-se da seguinte forma: nas primeiras 24 horas de internação na UTI todos os pacientes tiveram escore APACHE II (**ANEXO A**) calculado. A pontuação SOFA foi calculada com os piores valores dos parâmetros observados nos 1º, 2º, 3º, 5º, 7º, 14º e 28º dias de internação (**ANEXO B**).

4.1.2 Critérios de Inclusão e Exclusão

Foram incluídos os pacientes com idade igual ou superior a 18 anos, classificados com sepse e que possuíam um período de internação na UTI superior a 24 horas. Além disso, foram também incluídos os pacientes cujos níveis das interleucinas, IL-6 e IL-10, apresentavam-se elevados (valores de referência normais são considerados < 5,9pg/ml e < 9,1pg/ml, respectivamente), caracterizando o quadro de sepse (OLIVEIRA FILHO *et al*., dados não publicados). As interleucinas foram previamente[5] determinadas por citometria de fluxo com kit CBA Th1/Th2 (BD™ Biosciences) e lidas no citômetro de fluxo Accuri C6 (BD).

Os pacientes que apresentavam doenças hepáticas, que faziam uso prévio de esteroides ou quimioterápicos, pacientes grávidas, pacientes que morreram ou foram transferidos da UTI no período inferior às 24 horas, e, os pacientes cujos prontuários não possuíam todas as informações necessárias para a coleta dos dados foram excluídos do estudo.

4.1.3 Coleta das Amostras

[5] OLIVEIRA FILHO, R. A. de. *Associação entre polimorfismos genéticos de interleucinas e marcadores de inflamação e de prognóstico em pacientes portadores de sepse*. 2016. 75 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife. 2016.

As amostras foram obtidas do banco de soro do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA-UFPE). O período de coleta foi de Janeiro de 2014 até Fevereiro de 2016. Essas amostras foram armazenadas em alíquotas e estocadas a -80 °C (VIP Series Ultra-Low Temperature Freezer, Sanyo Scientific, Bensenville, IL). Todos os pacientes concordaram em participar e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido. As coletas foram aprovadas pelo comitê de ética em pesquisa da Universidade Federal de Pernambuco (Processo n° 08412412.2.0000.5192)[6] (**ANEXO C**).

4.2 EXPERIMENTOS EM ANIMAIS

Foram utilizados camundongos machos adultos (18-22g) Balb/c (*Mus musculus*) provenientes do Biotério do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami da Universidade Federal de Pernambuco (LIKA-UFPE). Os animais foram mantidos com acesso livre à ração e água. Os protocolos experimentais e todos os procedimentos foram realizados segundo os Princípios Éticos de Experimentação Animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). O estudo foi submetido ao Comitê de Ética no Uso de Animais do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEUA-UFPE), recebendo parecer favorável (Processo n° 23076.025265/2015-27) (**ANEXO D**).

4.2.1 Modelo Experimental de Sepse por Ligadura e Perfuração do Ceco

A sepse polimicrobiana foi induzida usando o modelo de ligadura e perfuração do ceco (CLP) com algumas modificações (SOUTO *et al*., 2011). Os animais foram anestesiados via intraperitoneal com uma solução de cloridrato de ketamina (25 mg/kg) e cloridrato de xilazina (20 mg/kg). Em seguida foi feita a laparotomia. O ceco foi mobilizado, ligado abaixo da válvula ileocecal com fio de algodão 4-0, sem obstrução total. Após a ligadura, o ceco foi perfurado de acordo com o grau de gravidade desejado e os animais foram divididos em três grupos (n= 10, para cada grupo), da seguinte ordem:

- Grupo 1, Sub-letal (SL-CLP): os camundongos foram perfurados 5 vezes com agulha 0,30X13mm (30G) na extremidade do ceco, para indução deste grau de sepse.
- Grupo 2, Moderado (M-CLP): os camundongos foram perfurados 5 vezes com agulha 0,45X13mm (26G) na extremidade do ceco, para indução deste grau de sepse.

[6] OLIVEIRA FILHO, R. A. de. *Associação entre polimorfismos genéticos de interleucinas e marcadores de inflamação e de prognóstico em pacientes portadores de sepse*. 2016. 75 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife. 2016.

- Grupo 3, Letal (L-CLP): os camundongos tiveram o ceco transfixado com uma agulha 1,2X40mm (18G) para a indução deste grau de sepse.
- Grupo 4, *Sham* ou falso operado: os camundongos foram anestesiados mas não houve ligadura, nem perfuração do ceco.

Em seguida, o órgão foi pressionado gentilmente a fim de favorecer a saída das fezes e, em seguida, foi colocado novamente na cavidade peritoneal. O abdômen foi suturado com fio de nylon 4-0 (BC suture®). Ao final do procedimento os animais foi hidratados com 1 mL de solução de cloreto de sódio 0,9% estéril, via subcutânea e, foram mantidos aquecidos durante a recuperação do anestésico (lâmpada halógena, 60 watts). A sobrevida foi avaliada durante o período de dez dias após a indução da sepse. Para a avaliação da migração de neutrófilos e outros experimentos, os camundongos foram sacrificados após 24 horas da CLP.

4.2.2 Migração dos Neutrófilos para o Foco da Infecção

Após 24 horas da indução de sepse por CLP, os camundongos foram eutanasiados e a cavidade peritoneal foi lavada com 1,5mL de solução salina tamponada fosfatada (PBS) contendo EDTA (1mM). A contagem total dos leucócitos foi determinada pela câmara de Neubauer e expressos como número de 10^6células/mL. A contagem diferencial foi realizada com 100 células a partir do lavado preparado em citocentrífuga (Serocito® modelo 2400 Fanem) e corado pelo método May Grunwald Giemsa (Panótico rápido corante para uso hematológico, Laborclin Ltda, Pinhais-SP, Brasil). Os resultados foram expressos como número de neutrófilos x 10^6/cavidade.

4.2.3 Quantificação das Bactérias

O grau de infecção foi determinado através da contagem do número de unidades formadoras de colônia (UFC) presentes no sangue e no lavado peritoneal dos animais submetidos à CLP. Do sangue heparinizado (5U/mL) foi utilizado 10 µL para o semeio. O lavado peritoneal foi diluído (1:10; 1:100; 1:1000; 1:10.000) em PBS estéril e, 10 µL dessa solução foi retirado para o semeio em placas de Petri contendo Ágar Mueller Hinton (Biolife, Itália). Todo o procedimento foi realizado sob condições estéreis. Após o semeio, as placas foram incubadas por 18 horas a 37 ºC e o número de UFC foi quantificado manualmente. Os resultados foram expressos como Log de UFC/mL do sangue e do lavado peritoneal.

4.2.4 Determinação da Atividade da Mieloperoxidase

A quantificação do sequestro de neutrófilos no pulmão foi obtida pelo ensaio da mieloperoxidase (MPO). Os camundongos, após eutanásia, foram perfundidos com PBS (10 ml) através do ventrículo esquerdo cardíaco e, em seguida, o lobo pulmonar esquerdo foi coletado e imerso em 200 µL de solução tampão 1 em pH 4,7 (NaCl 0,1M; NaPO 0,02M; NaEDTA 0,012M). O pulmão de cada animal foi pesado e posteriormente a amostra pulmonar foi homogeneizada com o auxílio do triturador (Homomix D-130, Biosystems, PR, Brasil) em 5000 rpm, as hemácias foram lisadas em solução NaCl 0,2% e os leucócitos em solução $NaPO_4$ 0,05M (pH 5,4) contendo 0,05% de H-TAB (Sigma Aldrich). A reação de mieloperoxidase procedeu-se pela adição de peróxido de hidrogênio (0,5mM) e revelada com TMB 3,845mg/mL (Sigma Aldrich). A absorbância foi medida em leitor de ELISA (Multiskan FC Microplate Photometer, Thermo Fisher Scientific) no comprimento de onda de 450 nm. Resultados foram expressos como número de neutrófilos/mg de tecido.

Para a quantificação dos neutrófilos foi utilizada uma curva padrão (neutrófilos obtidos da cavidade peritoneal dos camundongos seis horas após serem injetados com 1mL de glicogênio de ostra-tipo II (Sigma Aldrich) à 1% e diluídos seriadamente em $NaPO_4$ 0,08 M (1x105 neutrófilos/poço/50 µL).

4.3 DOSAGEM DA LCAT POR ELISA

Para a dosagem da LCAT foi realizado o método imunoenzimático (ELISA) de competição seguindo os procedimentos recomendados pelo fabricante do kit (Cell Biolabs, Inc., San Diego, CA, STA-616).

4.4 EXTRAÇÃO DE RNA E PCR QUANTITATIVO EM TEMPO REAL

As amostras de fígado dos animais foram coletadas 24 horas após a indução da CLP e armazenadas em Trizol® (Invitrogen-Life Technologies, CA, EUA). O RNA foi extraído segundo recomendações do fabricante. Para a transcrição reversa, o RNA extraído foi sintetizado em DNA complementar (cDNA) utilizando o kit QuantiTect Reverse Transcription Kit® (Qiagen, USA), de acordo com as instruções do fabricante. Todas as amostras de cDNA foram quantificadas usando o aparelho de espectrofotômetro NanoDrop® – 2000 Spectrophotometer (Thermo Scientific, Wilmington, DE) antes de serem usadas para as análises da qPCR.

A PCR em tempo real foi realizada seguindo condições de ciclagem: desnaturação inicial 95ºC por 10 min, seguida por 40 ciclos de 95ºC por 15s, 60ºC por 50s e 72ºC por 30s.

Para a reação utilizou-se o fluoróforo SyBr® Green Master Mix (Applied Biosystems, CA, USA) e o gene da β-actina, como controle endógeno da reação (gene de referência). As sequências dos oligonucleotídeos *primers* utilizados foram sintetizados pela *Exxtend* e encontram-se na **Tabela 2**. As leituras da fluorescência foram realizadas pelo equipamento 7500 Real-Time PCR (Applied Biosystems, CA, USA) a cada ciclo de amplificação e, posteriormente, analisados com o auxílio dos softwares ABI PRISM 7500 SDS (versão 2.0.6).

Tabela 2: Sequência dos oligonucleotídeos *primers* utilizados nas reações de qPCR.[7]

Gene (*mus musculus*)	Sequência dos *primers*
LCAT 1_fw	AATGCCATCCTACTGGGTGC
LCAT 1_rev	TTTATTCAGGGGGTGGGGGA
HDLBP_fw	TCCGTGAAGAGAGCAACACC
HDLBP_rev	ATAGACAGAATCCGGCTGCG
β-ACTINA_fw	CGGTTCCGATGCCCTGAGGCTCTT
β-ACTINA_rev	CGTCACACTTCATGATGGAATTGA

Fonte: O autor (2017).

4.5 ANÁLISE DOS RESULTADOS

Os resultados foram plotados e analisados utilizando o programa Prisma 6 (GraphPad). O teste de análise de variância (ANOVA) foi utilizado para comparar as alterações entre os grupos. As comparações individuais foram testadas com teste t de Bonferroni (comparações múltiplas) ou teste *t de Student* (comparações entre duas amostras) para amostras não pareadas. A regressão linear simples foi utilizada para determinar as correlações. Para a análise estatística das curvas de sobrevida foi utilizado o teste Mantel-Cox logrank (X^2 "chi-squared"), e foram considerados estatisticamente diferentes os valores de $p<0,05$.

[7] (fw= *forward*, rev= *reverse*).

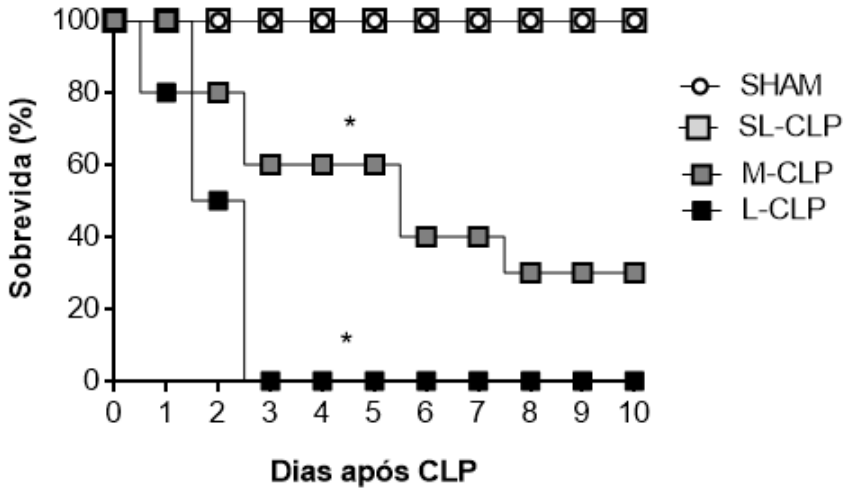
5 RESULTADOS

5.1 MODELO EXPERIMENTAL DE SEPSE

5.1.1 Sobrevida de Animais Submetidos à Sepse Induzida por Ligadura e Perfuração do Ceco (CLP)

As taxas de sobrevidas das diferentes gravidades da sepse e do grupo controle foram avaliadas durante dez dias (**Gráfico 1**). O grupo *Sham* (falso-operados) apresentou taxa de sobrevivência de 100%, comprovando que a manipulação cirúrgica foi realizada em condições assépticas. O grupo da sepse subletal (SL-CLP) apresentou taxa de sobrevida de 100% e o grupo sepse moderada (M-CLP) obteve 30%. Como o esperado, os animais submetidos à sepse letal (L-CLP) apresentaram 0% de sobrevida em até 48 horas após a indução da mesma.

Gráfico 1: Curva de sobrevivência de animais submetidos à CLP. A taxa de sobrevida dos animais foi registrada a cada 24h durante dez dias, após a indução da sepse. Os resultados são representativos de dois experimentos (n=10, para cada grupo). Os dados são expressos como porcentagem de sobrevida e foram analisados por Log-rank Mante-Cox Test. *p<0,05 quando comparado ao grupo *Sham* e ao SL-CLP.

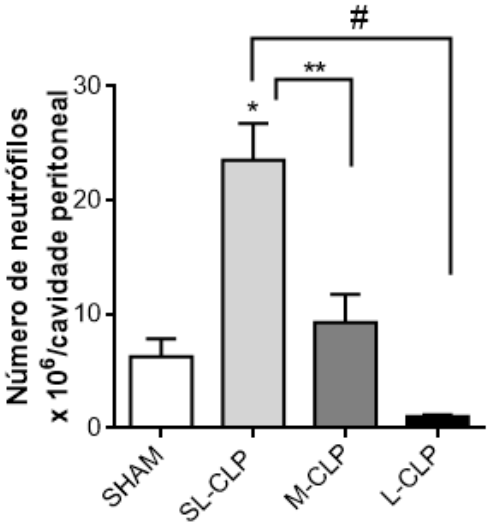


Fonte: O autor (2017).

5.1.2 Migração de Neutrófilos para o Foco Infeccioso

O grupo SL-CLP apresentou um aumento expressivo na migração dos neutrófilos para a cavidade peritoneal quando comparados ao grupo L-CLP (**Gráfico 2**).

Gráfico 2: Avaliação do número de neutrófilos no foco infeccioso 24 horas após a indução da sepse polimicrobiana (CLP). Os resultados são representativos de dois experimentos (n=7, para cada grupo). Os dados são expressos como número de neutrófilos x 10^6/cavidade peritoneal e foram analisadas por ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni. *p<0,05 quando comparado ao grupo *Sham*, ** p<0,05 quando comparado ao grupo SL-CLP, #p<0,05 quando comparado ao grupo SL-CLP.

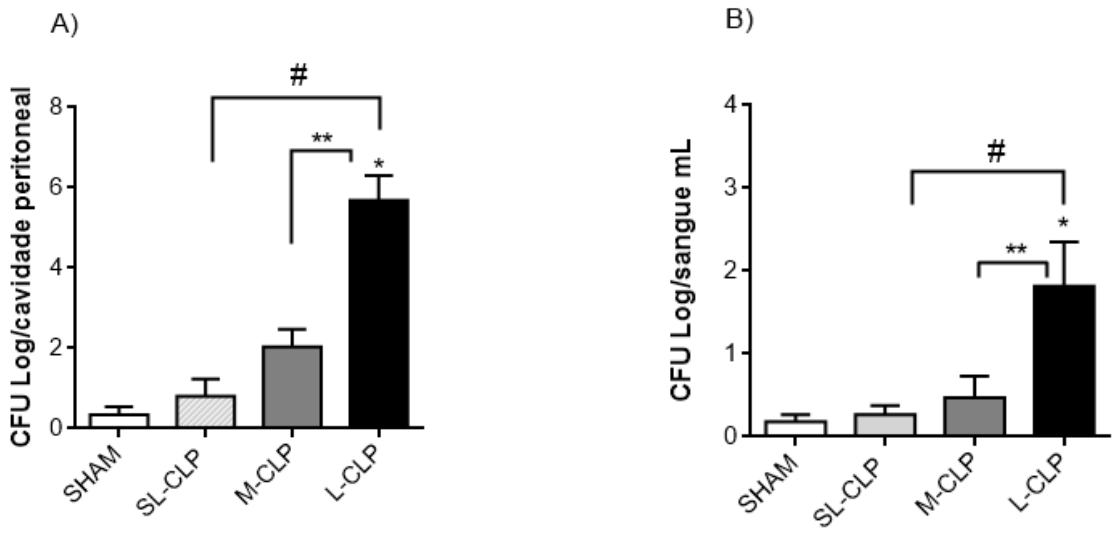


Fonte: O autor (2017).

5.1.3 Crescimento Bacteriano no Foco Infeccioso

O número de bactérias presentes no sangue e no lavado peritoneal dos animais foi quantificado 24 após a CLP (**Gráfico 3**). O grupo S*ham* não apresentou bactérias no sangue e no lavado. Como observado anteriormente, os animais do grupo SL-CLP, que obtiveram elevada migração neutrofílica para cavidade peritoneal, apresentaram número reduzido de bactérias tanto no sítio da infecção (**Figura 3A**), como no sangue (Figura 3B) quando comparados aos grupos M-CLP e L-CLP.

Gráfico 3: Quantificação de bactérias no foco infeccioso e no sangue após indução da sepse polimicrobiana (CLP). A carga bacteriana no lavado peritoneal (A) e no sangue (B) foi quantificada 24 horas após a indução da CLP. Os resultados são representativos de dois experimentos (n= 7, para cada grupo). Os dados são expressos como Log do número de unidades formadoras de colônia (UFC) por ml de amostra (Mann-Whitney U test). *p<0,05 quando comparado ao grupo *Sham*, ** p<0,05 quando comparado ao grupo SL-CLP, #p<0,05 quando comparado ao grupo SL-CLP.



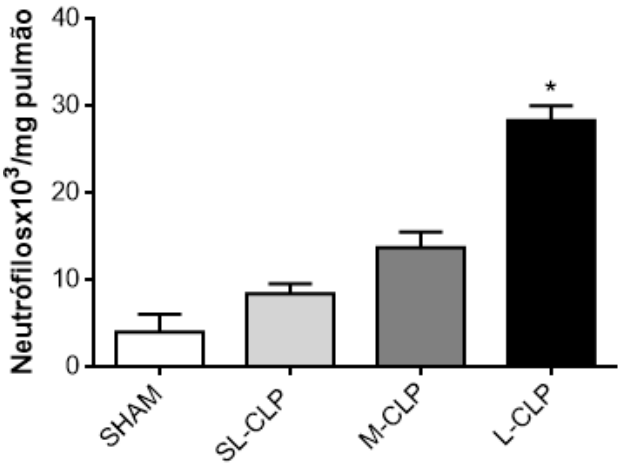
Fonte: O autor (2017).

5.1.4 Atividade da Mieloperoxidase

Tendo em vista que durante a sepse há uma considerável lesão orgânica e essa é decorrente principalmente do infiltrado neutrofílico em órgãos secundários a infecção (ALVES-FILHO *et al*., 2010), fomos confirmar esse fato nas nossas condições experimentais através da quantificação da mieloperoxidase (MPO) neutrofílica no pulmão. A dosagem da atividade da enzima MPO indicou um aumento do infiltrado de neutrófilos nos pulmões dos animais submetidos à sepse de maneira gravidade dependente. No entanto, os animais submetidos a L-CLP apresentaram um aumento significativo do infiltrado neutrofílico para seus pulmões quando comparados ao grupo *sham*, em análise feita no tempo de 24 horas (**Gráfico 4**).

Em conjunto, os resultados até aqui apresentados corroboram com os dados da literatura, demonstrando que nas nossas condições experimentais houve a caracterização do modelo experimental de sepse induzido por CLP.

Gráfico 4: Infiltrado neutrofílico nos pulmões dos animais submetidos à CLP. Os resultados são representativos de dois experimentos (n= 7, para cada grupo). Os dados são expressos em número de neutrófilos x 10^3/mg de pulmão. O número de neutrófilos infiltrados foi determinado através da dosagem da atividade da enzima Mieloperoxidase (MPO) nos pulmões. Para comparação entre os grupos utilizou-se ANOVA seguida de Bonferroni. *p<0,05 quando comparado ao grupo *Sham*.

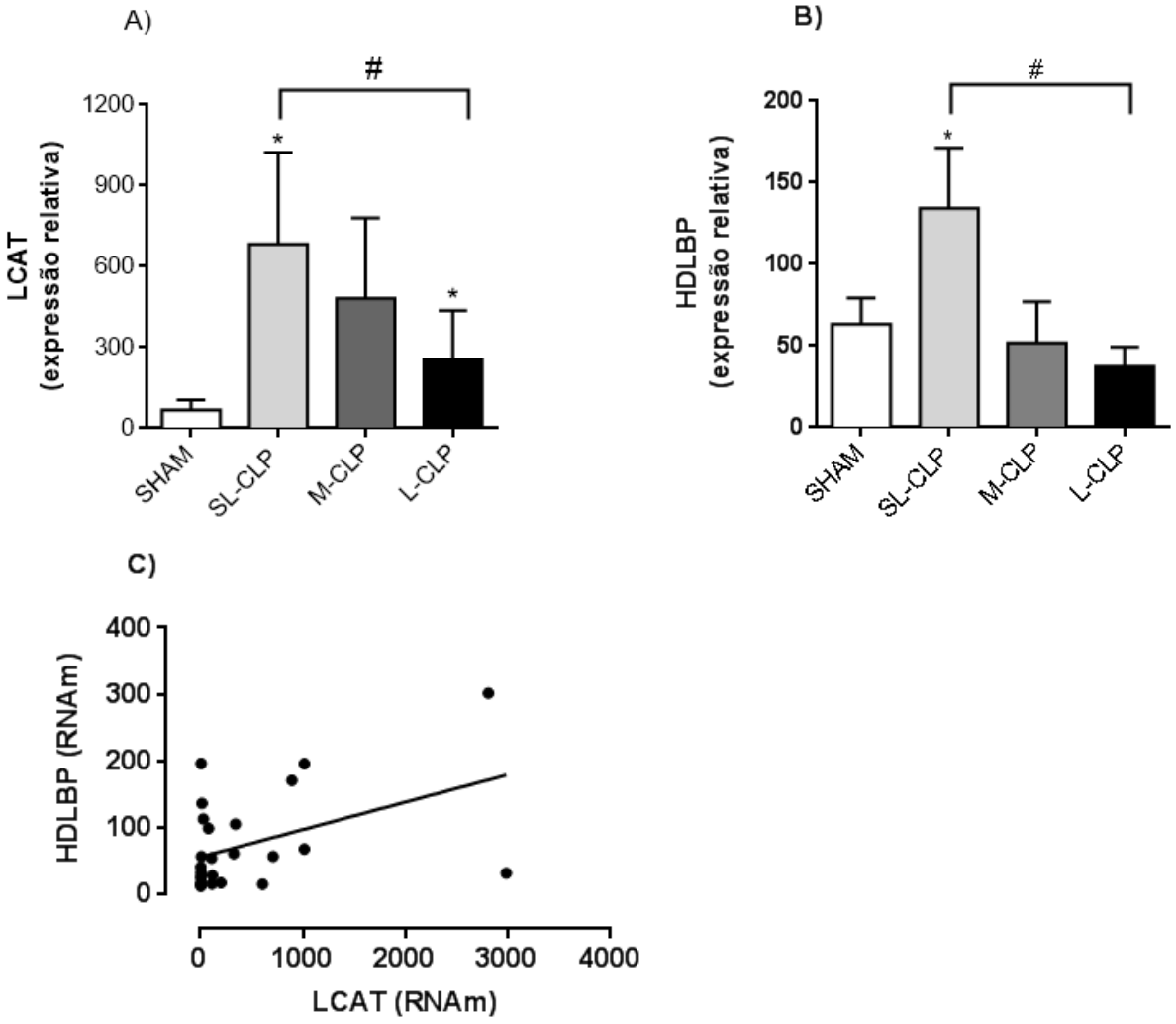


Fonte: O autor (2017).

5.1.5 Análise Da Expressão Gênica da LCAT e HDL

Na segunda fase do estudo, o objetivo foi determinar os níveis plasmáticos da LCAT na sepse experimental e em pacientes sépticos, correlacionando com a resposta inflamatória durante a sepse. Inicialmente, quantificamos a expressão do RNAm dos genes LCAT e HDLBP no fígado através do PCRq em tempo real, 24 horas após a indução da sepse experimental (**Gráfico 5**). O aumento da expressão do RNAm da LCAT foi observada no grupo SL-CLP quando comparados aos grupos M-CLP e L-CLP (**Gráfico 5A**). O mesmo foi observado nos níveis de expressão gênica da HDLBP (**Gráfico 5B**). A correlação entre a expressão relativa da HDLBP se mostrou positiva e significativa em relação à expressão da LCAT (**Gráfico 5C**).

Gráfico 5: Avaliação da expressão do RNAm da LCAT e HDLBP durante a sepse e correlação da expressão das do RNAm da HDL e LCAT durante a sepse. Foram avaliados os níveis hepáticos de RNAm da LCAT (A) e da HDLBP (B) nos diferentes graus de sepse e no grupo controle. Para comparação entre os grupos utilizou-se ANOVA seguido de Bonferroni. *p<0,05 quando comparado ao grupo Sham, #p<0,05 quando comparado ao grupo SL-CLP. Ambos os resultados são representativos de dois experimentos (n= 7, para cada grupo). (C) Análise da regressão linear da expressão relativa do RNAm da HDLBP do grupo *Sham* e dos animais submetidos à CLP correlacionadas com os respectivos valores da expressão do RNAm da LCAT (r^2=0,02, *p<0,05). Análise estatística realizada por correlação e regressão linear.

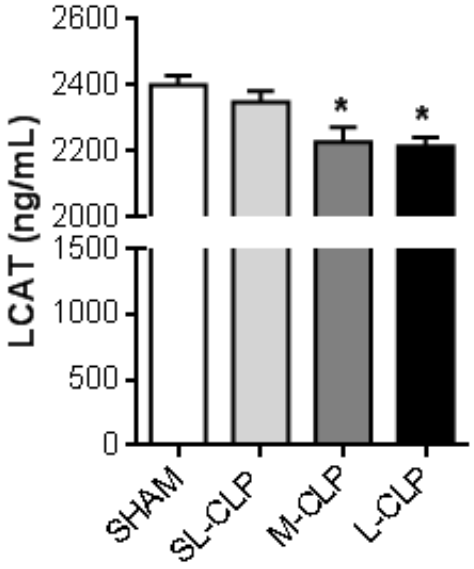


Fonte: O autor (2017).

5.1.6 Dosagem da LCAT

Uma vez determinada a expressão do RNAm da LCAT e HDL, analisou-se os níveis plasmáticos da LCAT nos animais sépticos. Após 24 horas da indução da sepse, os níveis séricos da enzima LCAT apresentaram-se reduzidos nos grupos M-CLP e L-CLP quando comparados aos níveis dos animais do grupo *Sham* (**Gráfico 6**).

Gráfico 6: Dosagem da concentração sérica da LCAT durante a sepse experimental. O soro dos animais foi utilizado para determinação da concentração da LCAT, 24 horas após a CLP. A LCAT foi dosada pelo método de ELISA. Os resultados são representativos de dois experimentos (n= 7, para cada grupo). Os dados são expressos em ng de LCAT/mL de soro. A análise foi realizada por ANOVA, seguida pelo teste de Bonferroni. *p<0,05 quando comparado ao grupo *Sham*.



Fonte: O autor (2017).

5.2 EXPERIMENTOS EM HUMANOS

5.2.1 Características da População Estudada

Na **tabela 3** estão características dos pacientes sépticos e do grupo controle selecionados.

Tabela 3: Perfil dos pacientes selecionados para o estudo.[8]

	Pacientes sépticos (n=29)	Pacientes controle (n=9)
Idade (anos)	62,68 ± 15,99	56,66 ± 12,78
Gênero (% masculino)	66%	44%
APACHE II	30,94 ± 4,77	ND
Escore <25	(n=12) 41%	ND
Escore ≥25	(n=17) 59%	ND
SOFA	11,23 ± 2,48	ND
Escore <7	(n=12) 41%	ND
Escore ≥7	(n=17) 59%	ND
IL-6	241,5 ± 457,3	9,08 ± 6,38
IL-10	10,5 ±14,6	0,58 ±1,39
Sítio de infecção	(n=1) 5% Cutâneo	ND
	(n=2) 11% Urinário	ND
	(n=16) 84% Respiratório	ND

[8] **ND= não determinado*

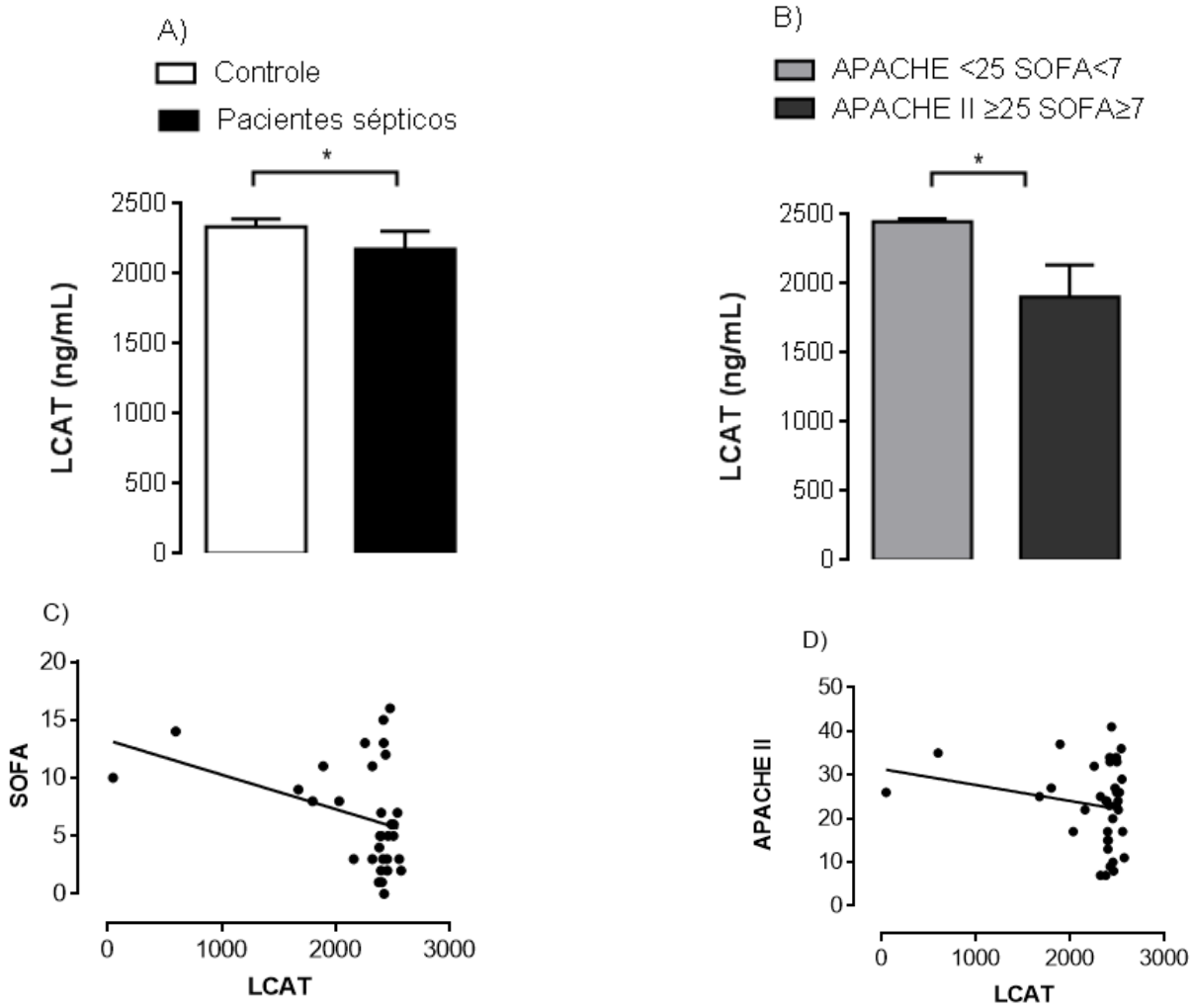
Fonte: O autor (2017).

5.2.2 Dosagem da LCAT

Uma vez que foi observada uma redução dos níveis da LCAT nos animais submetidos à sepse, tanto no M-CLP como no L-CLP, acreditamos que tal fato poderia ser encontrado em pacientes sépticos. Sendo assim, foi dosada a enzima nesses pacientes. De modo interessante, os níveis de LCAT apresentaram-se diminuídos nos pacientes sépticos quando comparada ao grupo controle (**Gráfico 7A**).

Entre os grupos dos pacientes sépticos, o nível da LCAT do grupo com valores de APACHE II ≥ 25/SOFA ≥ 7 mostrou-se reduzido quando comparado ao grupo com valores de APACHE II < 25/SOFA < 7 (**Gráfico 7B**). Os níveis da LCAT apresentaram correlação negativa com valores de SOFA (**Gráfico 7C**). Não foi observada correlação significativa entre os níveis da LCAT com valores de APACHE II (**Gráfico 7D**).

Gráfico 7: Dosagem da concentração sérica da LCAT durante a sepse e a correlação entre os níveis da LCAT em relação aos índices prognósticos. (A) A avaliação dos níveis séricos da enzima foi realizada nos soros dos indivíduos controles (n= 9) e pacientes sépticos (n= 29). (B) Os níveis de LCAT entre os pacientes com APACHEII<25/SOFA<7 (n= 17) e com APACHEII≥25/SOFA≥7 (n= 12). A LCAT foi dosada pelo método ELISA. Os resultados são expressos em ng de LCAT/ml de soro. A análise foi realizada por ANOVA, seguida pelo teste de Bonferroni (*p<0,05). (C) A análise da regressão linear dos valores da LCAT de indivíduos controle (n= 9) e dos pacientes sépticos (n= 29) correlacionadas com os respectivos escores SOFA (r^2=0,12, *p<0,05) e (D) APACHE II (r^2=0,04, *p<0,05). A análise estatística realizada por correlação e regressão linear.

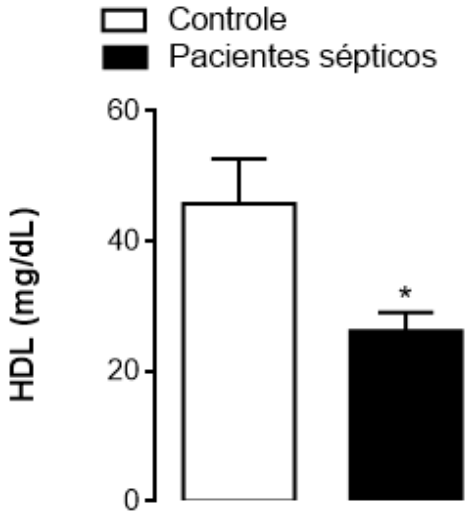


Fonte: O autor (2017).

5.2.3 Dosagem da HDL

Uma vez que os níveis plasmáticos da LCAT foi quantificado, nos pacientes sépticos, fomos buscar os valores séricos da HDL, com objetivo de avaliar se ambos os valores poderiam estar reduzidos concomitantemente nos pacientes sépticos. Os valores da HDL dos pacientes sépticos e controles foram dosados no primeiro dia de internação na UTI. Foi observado que os pacientes sépticos apresentaram níveis reduzidos de HDL em relação ao controle, de maneira semelhante ao observado com LCAT (**Gráfico 8**).

Gráfico 8: Dosagem dos níveis séricos da HDL. Os níveis da HDL foram obtidos dos prontuários dos pacientes internados na UTI do PROCAPE, controles (n= 9) e pacientes sépticos (n= 29). Os resultados são expressos em mg de HDL/dL de soro. A análise foi realizada por ANOVA, seguida pelo teste de Bonferroni (*p<0,05).



Fonte: O autor (2017).

6 DISCUSSÃO

O presente trabalho foi demonstrado que animais submetidos à sepse, induzida pelo modelo de CLP (ligadura e perfuração do ceco), apresentaram uma perda do controle da infecção e redução na concentração plasmática da LCAT, de maneira gravidade dependente. De forma equivalente, nos pacientes sépticos houve também redução desta enzima. Ainda, observamos uma associação da redução dos níveis de LCAT com o aumento do escore SOFA e APACHE II.

Apesar de não termos avaliado a atividade da enzima, um estudo anterior relatou haver uma relação direta e positiva entre a concentração da LCAT e sua atividade (MACIEL *et al*., dados não publicados). Ainda, dados da literatura mostraram que há redução na atividade da LCAT em pacientes sépticos e em indivíduos submetidos à endotoxemia. Segundo os autores, este resultado pode ser possivelmente explicado devido a uma diminuição em nível de síntese da LCAT (LEVELS *et al*., 2007). De fato, ao avaliar-se a expressão relativa do RNAm dessa enzima, em tecidos hepáticos, obtidas dos animais submetidos à CLP, encontramos uma redução do RNAm da LCAT nos animais pertencentes ao grupo letal (L-CLP) e moderado (M-CLP) em comparação ao grupo *Sham* (falso-operados) e ao grupo SL-CLP. Tendo em vista que observamos uma redução dos níveis da LCAT e, também do RNAm para esta enzima, em condições de sepse moderada e letal, pode-se sugerir que este evento pode estar relacionado a uma disfunção hepática, uma vez que essa LCAT é produzida no fígado (JONAS, 2000).

A ocorrência de disfunção orgânica é uma característica presente durante o quadro séptico. Essa disfunção é observada em órgãos como pulmão, rins, coração, fígado, entre outros e, é responsável pelas elevadas taxas de morbidade e mortalidade nesta doença (LIMA *et al*., 2011; WANG; YIN; YAO, 2014). Dessa forma, nossos achados sugerem que, em condições de sepse, a redução na síntese da LCAT pode ser devido às alterações encontradas no fígado, órgão produtor dessa enzima. Estudos recentes revelaram que a disfunção hepática é um fenômeno precoce durante a sepse (MARSHALL, 2012). Além disso, sabe-se que sua incidência está associada a um prognóstico grave (NESSELER *et al*., 2012). Corroborando com nossos achados, dados da literatura demonstram a ocorrência de um aumento de transaminases e marcadores de lesão hepática de maneira gravidade dependente na sepse experimental (DIAS, 2002; ZAVARIZ *et al*., 2006; LIMA *et al*., 2011; SOUTO *et al*., 2011)

Em relação aos resultados da concentração da HDL humana, esta se apresentou também reduzida nos pacientes sépticos. Em conformidade com nossos resultados, dados da

literatura têm demonstrado que os níveis dessa lipoproteína encontram-se diminuídos na sepse e no choque séptico e, que há uma forte correlação entre essa redução com a gravidade da doença (VAN LEEUWEN *et al*., 2003; WU; HINDS; THIEMERMANN, 2004; CAPPI *et al*., 2012). No entanto, os mecanismos envolvidos nessa redução até o momento não tinham sido totalmente esclarecidos. E apesar de estudos anteriores mostrarem que durante o quadro inflamatório e infeccioso, há uma diminuição nos níveis da LCAT (SHIH; SLIGAR; SCHULTEN, 2009; FEINGOLD, GRUNFELD, 2015), nenhum estudo correlacionou a queda na concentração da HDL em decorrência dos valores da LCAT.

Em virtude disso, o estudo buscou demonstrar uma possível relação entre baixos níveis da HDL resultante da diminuição da concentração da LCAT na sepse. Como visto previamente, nossos dados mostraram que a concentração de ambas as proteínas estavam reduzidas, confirmando assim nossa hipótese inicial. Desta forma, nosso estudo conseguiu propor, de fato, uma correlação significativa entre a HDL e a LCAT. Isto sugere que em consequência da diminuição da LCAT, ocorre uma alteração no processo de esterificação do colesterol, passo limitante para a maturação da HDL, o que é responsável por reduzir os níveis dessa lipoproteína.

Visto que ocorre uma disfunção hepática durante a sepse, e que a HDL é produzida em grande parte no fígado (CONTRERAS-DUARTE *et al*., 2014), avaliamos também a expressão do RNAm da HDL no tecido hepático dos animais submetidos a sepse experimental. Os resultados observou-se uma redução na expressão relativa do RNAm da HDL no grupo L-CLP quando comparada ao grupo SL-CLP, devido à menor lesão hepática neste grupo, por ser uma sepse considerada de baixa gravidade (BENJAMIM; FERREIRA; CUNHA, 2000). Esse achado mostrou haver uma associação positiva e significativa entre a expressão de RNAm da HDL e da LCAT, citada anteriormente. Até o momento, nenhum outro estudo publicado quantificou e comparou a expressão relativa do RNAm da HDL e da LCAT dos hepatócitos entre camundongos com e sem sepse. Os resultados sugerem uma hipótese de que, em condições de sepse, os níveis da HDL estão reduzidos possivelmente em consequência tanto da diminuição da sua síntese, pela disfunção do fígado, como da redução da concentração da LCAT, na qual compromete a maturação da HDL.

Como foram encontrados valores reduzidos da LCAT nos pacientes sépticos, comparou-se esses dados com os índices prognósticos mais utilizados nas UTIs, são eles o SOFA e o APACHE II, considerados bons indicadores de mortalidade (SILVA *et al*., 2004). Os resultados mostraram que aqueles pacientes que possuíam níveis de LCAT elevados, ou semelhantes aos controles, possuíam um valor de SOFA reduzido, indicativo de melhor

prognóstico. Assim, observamos que houve uma correlação negativa entre esses dois parâmetros com r^2=0,12. Embora esse valor não seja tão alto, é notório que valores de SOFA reduzidos estão relacionados com valores aumentados da LCAT. Isso pode ser explicado uma vez que o SOFA é um escore mais específico para avaliar pacientes sépticos, por quantificar a extensão e a gravidade da disfunção dos órgãos (KEEGAN; SOARES, 2016). Em relação ao escore APACHE II, não foi evidenciado correlação significativa entre este com os níveis da LCAT dosados nos pacientes sépticos, talvez por este apresentar outras variáveis não observadas diretamente em pacientes sépticos (HISSA *et al*., 2013).

Como mencionado anteriormente, demonstramos também que a concentração da LCAT encontrava-se reduzida no grupo submetido à sepse letal em modelo animal, induzida por CLP. Além disso, nesse grupo observamos uma redução na migração de neutrófilos para o local da infecção. Um estudo anterior relatou que durante a fase letal da sepse há um prejuízo na migração de neutrófilos para o foco infeccioso. Além disso, há uma associação entre a falha na migração destas células com o aumento no número de bactérias no peritônio e no sangue, com consequente inflamação sistêmica e redução na sobrevida desses animais (ALVES-FILHO *et al*., 2010). Isso justifica nossos achados, no qual tanto no sangue, como no lavado desses animais observou crescimento bacteriano, visto que os neutrófilos, células importantes para a eliminação de patógenos e controle das infecções, principalmente por bactérias, encontram-se ineficientes e/ou reduzidos (BENJAMIM; FERREIRA; CUNHA, 2000; CROSARA-ALBERTO *et al*., 2002; ALVES-FILHO *et al*., 2005). Embora não podemos inferir uma relação direta com os fenômenos relacionados com a perda do controle da infecção na sepse letal com os níveis reduzidos da LCAT, podemos sugerir que os níveis reduzidos dessa enzima podem afetar de alguma forma o controle da infecção.

Diferentemente do grupo letal, os animais submetidos à sepse subletal apresentaram sobrevivência de 100% quando avaliados durante sete dias após indução da CLP. Este fato é explicado por se tratar de um quadro séptico de baixa gravidade, havendo, portanto, controle da doença. Nesse grupo, foi possível observar que houve recrutamento dos neutrófilos, primeiras células a migrarem, sendo as responsáveis pelo controle do foco infeccioso (TEIXEIRA; ABRAMO; MUNK, 2007). Como consequência, foi evidenciada uma diminuição no crescimento bacteriano tanto no sangue, bem como no lavado peritoneal. Embora também não possamos estabelecer uma correlação direta, nossos resultados mostraram, de modo interessante, que quando os níveis da LCAT estão elevados ou semelhantes aos controles, a resposta do hospedeiro foi eficaz e houve um controle na infecção.

Em relação à atuação de neutrófilos e da HDL, com o objetivo de impedir a proliferação de bactérias, os mecanismos envolvidos são diferentes (BENJAMIM; FERREIRA; CUNHA, 2000; CONTRERAS-DUARTE *et al*., 2014). Estudos *in vitro*, mostraram que a partícula de HDL ao se ligar aos lipopolissacarídeos ou endotoxinas, presente nas bactérias gram-negativas, exerce papel anti-endotoxêmico (WU; HINDS; THIEMERMANN, 2004; PAIVA; DAVID; DOMONT, 2010). Essa função, na verdade, é realizada devido à existência da apo A-I, que é o principal componente proteico da HDL (LEVINSON; WAGNER, 2015). Essa apolipoproteína interage com a proteína de ligação do LPS (LBP), facilitando sua ligação com a molécula da HDL, neutralizando assim a ação da LPS. No entanto, dados da literatura mostram que os níveis de expressão da apo A-I encontram-se baixos durante o quadro séptico grave (HARRIS, 2005; PAIVA; DAVID; DOMONT, 2010).

De modo indireto, avaliamos também o recrutamento dos neutrófilos através da quantificação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) nas amostras de pulmões dos animais, como estabelecido em materiais e métodos. A MPO encontra-se em maior quantidade no interior dos neutrófilos (KLEBANOFF, 2005). Nossos resultados mostraram um aumento no número de neutrófilos infiltrados dos animais do grupo letal em comparação ao grupo controle, indicando que houve lesão tecidual do pulmão, em consequência da indução da sepse, o qual apresentou níveis reduzidos de LCAT. Este fato é justificado pelo recrutamento inapropriada de neutrófilos, gerando infiltrado ou acumulo prejudicial dessas células em órgãos distantes do foco da infecção (ALVES-FILHO *et al*., 2008; ZHANG *et al*., 2009). Além disso, dados da literatura demonstram que níveis elevados da MPO comprometem a atividade da LCAT, indiretamente por alterar resíduos proteicos da apo A-I, cofator desta enzima, presente na superfície da HDL (WANG; SUBBAIAH, 2000; DULLAART *et al*., 2014).

Dessa forma, evidenciamos que a diminuição da concentração sérica da enzima LCAT está associada à redução nos níveis da lipoproteína HDL nos paciente sépticos. Além disso, observamos que a redução dos níveis da LCAT ocorreu concomitantemente com a perda do controle da infecção nos animais submetidos à sepse grave.

7 CONCLUSÃO

Diante do exposto, sugerimos que a redução da LCAT e da HDL pode estar relacionada a uma deficiência na síntese dessas proteínas em condições de sepse, possivelmente pela ocorrência de disfunção hepática nesta doença. Ainda, nossos resultados apontam para um papel chave da LCAT na fisiopatologia da sepse, tendo em vista sua função na maturação da HDL, que pode servir como neutralizador de endotoxinas. Estendendo nossas observações, acreditamos que o uso da LCAT recombinante poderia funcionar como um futuro alvo na terapia adjuvante da sepse.

REFERÊNCIAS

ABDALLA, D. S. P.; SENA, K. C. M. Biomarcadores de peroxidação lipídica na aterosclerose. **Revista de Nutrição**, v. 21, n. 6, p. 749–756, 2008.

ABRAHAM, E. New definitions for sepsis and septic shock: Continuing evolution but with much still to be done. **Jama**, v. 315, n. 8, p. 757–759, 2016.

ALVES, R. J. et al. Ausência de Efeito do Captopril no Metabolismo de uma Emulsão Lipídica Artificial Semelhante aos Quilomícrons em Pacientes Hipertensos e Hipercolesterolêmicos. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 83, n. 6, p. 508–511, 2004.

ALVES-FILHO, J. C. et al. Failure of neutrophil migration toward infectious focus in severe sepsis: A critical event for the outcome of this syndrome. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. SUPPL. 1, p. 223–226, 2005.

ALVES-FILHO, J. C. et al. Toll-like receptor 4 signaling leads to neutrophil migration impairment in polymicrobial sepsis. **Critical care medicine**, v. 34, n. 2, p. 461–470, 2006.

ALVES-FILHO J.C. et al. The role of neutrophils in severe sepsis. **Shock**, v.30 Suppl 1, Oct, p.3-9. 2008.

ALVES-FILHO, J. C. et al. Regulation of chemokine receptor by Toll-like receptor 2 is critical to neutrophil migration and resistance to polymicrobial sepsis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 10, p. 4018–23, 2009.

ALVES-FILHO, J. C. et al. Interleukin-33 attenuates sepsis by enhancing neutrophil influx to the site of infection. **Nature medicine**, v. 16, n. 6, p. 708–712, 2010.

ANGUS, D. C. et al. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. **Critical care medicine**, v. 29, n. 7, p. 1303–1310, 2001.

ARSENAULT, B. J.; BOEKHOLDT, S. M.; KASTELEIN, J. J. P. Lipid parameters for measuring risk of cardiovascular disease. **Nature reviews. Cardiology**, v. 8, n. 4, p. 197–206, 2011.

BARLAGE, S. et al. ApoE-containing high density lipoproteins and phospholipid transfer protein activity increase in patients with a systemic inflammatory response. **Journal of lipid research**, v. 42, n. 2, p. 281-290, 2001.

BARLAGE, S. et al. Changes in HDL-associated apolipoproteins relate to mortality in human sepsis and correlate to monocyte and platelet activation. **Intensive Care Medicine**, v. 35, n. 11, p. 1877–1885, 2009.

BARTER, P. et al. High density lipoproteins (HDLs) and atherosclerosis; the unanswered questions. **Atherosclerosis**, v. 168, n. 2, p. 195–211, 2003.

BEALE, R. et al. Promoting global research excellence in severe sepsis (PROGRESS): Lessons from an international sepsis registry. **Infection**, v. 37, n. 3, p. 222–232, 2009.

BENJAMIM, C. F.; FERREIRA, S. H.; CUNHA, F. Q. Role of nitric oxide in the failure of neutrophil migration in sepsis. **The Journal of infectious diseases**, v. 182, n. 1, p. 214–223, 2000.

BENJAMIM, C. et al. Inhibition of leukocyte rolling by nitric oxide during sepsis leads to reduced migration of active microbicidal neutrophils. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 7, p. 3602–3610, 2002.

BIGGERSTAFF, K. D.; WOOTEN, J. S. Understanding lipoproteins as transporters of cholesterol and other lipids. **Advances in physiology education**, v. 28, n. 1–4, p. 105–106, 2004.

BONE, R. et al. accplsccm consensus conference for Sepsis and Organ Failure and. **Chest**, v. 101, p. 1644–1655, 1992.

CAPPI, S. B. et al. Dyslipidemia: A prospective controlled randomized trial of intensive glycemic control in sepsis. **Intensive Care Medicine**, v. 38, n. 4, p. 634–641, 2012.

CARDOSO, L. G. S.; CHIAVONE, P. A. APACHE II medido na saída dos pacientes da Unidade de Terapia Intensiva na previsão da mortalidade. **Revista Latino-Americana de Enfermagem**, v. 21, n. 3, p. 811-819, 2013.

CARPENTIER, Y.; SOBOTKA, L. Basics in clinical nutrition: Lipid metabolism. **e-SPEN**, v. 3, n. 5, p. 188–191, 2008.

CARVALHO, P. R. A.; TROTTA, E. D. A. Avanços no diagnóstico e tratamento da sepse Advances in sepsis diagnosis and treatment. **Jornal de Pediatria**, v. 79, p. 195–204, 2003.

CASTRO, E. O. et al. Sepse e choque séptico na gestação : manejo clínico. **Revista Brasileira Ginecologia e Obstetrícia**, v. 30, p. 631–8, 2008.

CATAPANO, A. L. et al. HDL in innate and adaptive immunity. **Cardiovascular Research**, v. 103, n. 3, p. 372–383, 2014.

CAVELIER, C. et al. Lipid efflux by the ATP-binding cassette transporters ABCA1 and ABCG1. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1761, n. 7, p. 655–666, 2006.

CHIEN, J-Y. et al. Low serum level of high-density lipoprotein cholesterol is a poor prognostic factor for severe sepsis. **Critical care medicine**, v. 33, n. 8, p. 1688-1693, 2005.

CIANCIARULLO, M. A. et al. Novos x antigos marcadores de infecção no diagnóstico de sepse neonatal: visão crítica. **Pediatria (São Paulo)**, v. 30, n. 2, p. 107-17, 2008.

COELHO, F. R.; MARTINS, J. O. Diagnostic methods in sepsis: the need of speed. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 58, n. 4, p. 498-504, 2012.

CONTRERAS-DUARTE, S. et al. Papel protector de las lipoproteínas de alta densidad en sepsis: aspectos básicos e implicancias clínicas. **Revista chilena de infectología**, v. 1, n. 1, p.

34–43, 2014.

COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S.L. Patologia estrutural e funcional. 6.ed. Rio de Janeiro : **Guanabara Koogan**, 2000. 1400p.

CROSARA-ALBERTO, D. P. et al. Involvement of NO in the failure of neutrophil migration in sepsis induced by Staphylococcus aureus. **British journal of pharmacology**, v. 136, n. 5, p. 645-658, 2002.

DAVIGNON, J; GANZ, P. Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. **Circulation**, v. 109, n. 23 suppl 1, p. III-27-III-32, 2004.

DIAS, F.S. Choque. Porto Alegre: **EDIPUCRS**; 2002.

DOBIÁSOVÁ, M.; FROHLICH, J. J. Assays of Lecithin Cholesterol Acyltransferase (LCAT). **Lipoprotein Protocols**, v. 110, p. 217–230, 1998.

Documento preparado pelo comitê executivo do protocolo de diagnóstico e tratamento precoce da sepse grave no adulto. Atualização 2014, Hospital Sírio-Libânes. Disponível em: <http://www.hospitalsiriolibanes.org.br/institucional/gestao-da-qualidade/Documents/protocolo-sepse-0314.pdf >. Acesso em 14 de jan. 2016.

DULLAART, R. P. F. et al. Alterations in plasma lecithin: cholesterol acyltransferase and myeloperoxidase in acute myocardial infarction: implications for cardiac outcome. **Atherosclerosis**, v. 234, n. 1, p. 185-192, 2014.

DUFFY, D.; RADER, D. J. Update on strategies to increase HDL quantity and function. **Nature reviews. Cardiology**, v. 6, n. 7, p. 455–463, 2009.

DURRINGTON, P. HDL in risk prediction and its direct and indirect involvement in atherogenesis. **Atherosclerosis Supplements**, v. 3, n. 4, p. 3–12, 2002.

FEINGOLD, K. R.; GRUNFELD, C. The effect of inflammation and infection on lipids and lipoproteins. 2015.

FLOHÉ, S. B. et al. Dendritic cells during polymicrobial sepsis rapidly mature but fail to initiate a protective Th1-type immune response. **Journal of leukocyte biology**, v. 79, n. 3, p. 473–481, 2006.

FORTI, N.; DIAMENT, J. Lipoproteínas de alta densidade: aspectos metabólicos, clínicos, epidemiológicos e de intervenção terapêutica. Atualização para os clínicos. **Arq Bras Cardiol**, v. 87, n. 5, p. 671-679, 2006.

GENEST, J. Lipoprotein disorders and cardiovascular risk. **Journal of inherited metabolic disease**, v. 26, n. 2–3, p. 267–87, 2003.

GIACOMINI, M. G. et al. Septic shock: A major cause of hospital death after intensive care unit discharge. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 27, n. 1, p. 51–56, 2015.

GLOBAL SEPSIS ALLIANCE. Disponível em: <http://globalsepsisalliance.com/gsa-news-and-info/ >. Acesso em 17 de dez. 2016.

GLOMSET, J. A. The mechanism of the plasma cholesterol esterification reaction: plasma fatty acid transferase. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 65, n. I, p. 128–35, 1962.

GLOMSET, J. A. et al. The esterification in vitro of free cholesterol in human and rat plasma. **Biochimica et biophysica acta**, v. 58, n. 3, p. 398-406, 1962.

GOLAN, D. et al. **Princípios de farmacologia: a base fisiopatológica da farmacoterapia**. Guanabara Koogan, 2009.

GORDON, S. M. et al. High density lipoprotein: It's not just about lipid transport anymore. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 22, n. 1, p. 9–15, 2011.

GRAVERSEN, J. H. et al. A Pivotal Role of the Human Kidney in Catabolism of HDL Protein Components Apolipoprotein A-I and A-IV but not of A-II. **Lipids**, v. 43, n. 5, p. 467–470, 2008.

GUO, L. et al. High density lipoprotein protects against polymicrobe-induced sepsis in mice. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 25, p. 17947–17953, 2013.

HARRIS, H. W. Apolipoprotein E: from Alzheimer's to sepsis. **Critical care medicine**, v. 33, n. 11, p. 2696-2697, 2005.

HENKIN, C. S. et al. Sepse: uma visão atual. **Sci Med**, v. 19, n. 3, p. 135-45, 2009.

HISSA, P. N. G. et al. Análise comparativa entre dois escores na previsão de mortalidade em unidade terapia intensiva. **Rev Bras Clin Med**, v. 11, n. 1, p. 21-6, 2013.

HUSSAIN, M. A proposed model for the assembly of chylomicrons. **Atherosclerosis**, v. 148, n. 1, p. 1–15, 2000.

INSTITUTO LATINO AMERICANO DE SEPSE. **Campanha Sobrevivendo a Sepse. Relatório Nacional, 2015.** Disponível em: <http://www.ilas.org.br/upfiles/fckeditor/file/Relat%C3%B3rio%20Nacional%20fev%202015.pdf>. Acesso em 15 de out. 2015.

INSTITUTO LATINO AMERICANO DE SEPSE. **Propostas De Mudanças Relatório ILAS, 2016**. Disponível em: <http://ilas.org.br/assets/arquivos/upload/declaracao%20sepse%203.0%20ILAS.pdf Acesso em 14 de out. 2016.

JANEWAY, C. A.; MEDZHITOV, R. Innate immune recognition. **Annual review of immunology**, v. 20, n. 1, p. 197-216, 2002.

JONAS, A. Lecithin cholesterol acyltransferase. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1529, n. 1–3, p. 245–256, 2000.

JÚNIOR, G. A. P. et al. Fisiopatologia da sepse e suas implicações terapêuticas. Medicina (**Ribeirão Preto. Online**), v. 31, n. 3, p. 349-362, 1998.

KEEGAN, M. T.; SOARES, M. O que todo intensivista deveria saber sobre os sistemas de escore prognóstico e mortalidade ajustada ao risco. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 28, n. 3, p. 264-269, 2016.

KHOVIDHUNKIT, W. et al. Effects of infection and inflammation on lipid and lipoprotein metabolism: mechanisms and consequences to the host. **Journal of lipid research**, v. 45, n. 7,

p. 1169–1196, 2004.

KISSOON, N. et al. World Federation of Pediatric Intensive Care and Critical Care Societies: Global Sepsis Initiative. **Pediatric critical care medicine : a journal of the Society of Critical Care Medicine and the World Federation of Pediatric Intensive and Critical Care Societies**, v. 12, n. 5, p. 494–503, 2011.

KLEBANOFF, S. J. Myeloperoxidase: friend and foe. **Journal of leukocyte biology**, v. 77, n. 5, p. 598-625, 2005.

KNAUS, W. A. et al. APACHE II: a severity of disease classification system. **Critical care medicine**, v. 13, n. 10, p. 818-829, 1985.

KORTGEN, A.; HOFMANN, G.; BAUER, M. Sepsis - Current aspects of pathophysiology and implications for diagnosis and management. **European Journal of Trauma**, v. 32, n. 1, p. 3–9, 2006.

KOURY, J. C. DE A.; LACERDA, H. R.; BARROS NETO, A. J. DE. Características da população com sepse em unidade de terapia intensiva de hospital terciário e privado da cidade do Recife. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 18, n. 1, p. 52–58, mar. 2006.

KRATZER, A.; GIRAL, H.; LANDMESSER, U. High density lipoproteins as modulators of endothelial cell functions–alterations in patients with coronary artery disease. **Cardiovascular research**, p. cvu139, 2014.

KUNNEN, S.; VAN ECK, M. Lecithin:cholesterol acyltransferase: old friend or foe in atherosclerosis? **The Journal of Lipid Research**, v. 53, n. 9, p. 1783–1799, 2012.

LEANÇA, C. C. et al. HDL: o yin-yang da doença cardiovascular. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 54, n. 9, p. 777-784, 2010.

LEKKOU, A. et al. Serum lipid profile, cytokine production, and clinical outcome in patients with severe sepsis. **Journal of Critical Care**, v. 29, n. 5, p. 723–727, 2014.

LEVINSON, S. S.; WAGNER, S. G. Implications of reverse cholesterol transport: Recent studies. **Clinica Chimica Acta**, v. 439, p. 154-161, 2015.

LEVELS, J. H. M. et al. Alterations in lipoprotein homeostasis during human experimental endotoxemia and clinical sepsis. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1771, n. 12, p. 1429–1438, 2007.

LEVY, M. M. et al. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. **Critical care medicine**, v. 31, n. 0090–3493 (Print), p. 1250–1256, 2003.

LIMA, E. S.; COUTO, R. D. Estrutura, metabolismo e funções fisiológicas da lipoproteína de alta densidade. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 42, n. 3, p. 169–178, 2006.

LIMA, V. L. M. et al. Lecithin-cholesterol acyltransferase (LCAT) as a plasma glycoprotein: An overview. **Carbohydrate Polymers**, v. 55, n. 2, p. 179–191, 2004.

LIMA, A. F. K. T.; FRANCO, R. P. Síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SRIS), um desafio diagnóstico. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 3, n. 4, p. 123-131, 2010.

LIMA, J. et al. SÍNDROME DE DISFUNÇÃO DE MÚLTIPLOS ÓRGÃOS INDUZIDA POR SEPSE: ESTUDO EXPERIMENTAL EM RATOS Sepsis inducing syndrome of multiple organ dysfunction: an experimental study in rats. **ABCD Arq Bras Cir Dig Artigo Original**, v. 24, n. 2, p. 95–102, 2011.

LOLIS, E.; BUCALA, R. Therapeutic approaches to innate immunity: severe sepsis and septic shock. **Nature reviews Drug discovery**, v. 2, n. 8, p. 635-645, 2003.

LUND-KATZ, S.; PHILLIPS, M. C. High density lipoprotein structure–function and role in reverse cholesterol transport. In: **Cholesterol Binding and Cholesterol Transport Proteins:**. Springer Netherlands, 2010. p. 183-227.

MACHADO, P. R. L. et al. Mecanismos de resposta imune às infecções. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 79, n. 6, p. 647–664, 2004.

MACIEL, G. R. *Perfil lipídico e correlação entre concentração e atividade de lecitina: colesterol aciltransferase (LCAT) em plasma de pacientes com esquistossomose mansônica hepatointestinal e hepatoesplênica*. 2009. 43 f. **Dissertação (Mestrado) -** Universidade Federal de Pernambuco, Recife. 2009.

MARSHALL, J. C. New translational research provides insights into liver dysfunction in sepsis. **PLoS Med**, v. 9, n. 11, p. e1001341, 2012.

MATOS, G. F. J. DE; VICTORINO, J. A. Critérios para o Diagnóstico de Sepse, Sepse Grave e Choque Séptico. **Revista de Terapia Intensiva**, p. 102–104, 2004.

MAYR, F. B.; YENDE, S.; ANGUS, D. C. Epidemiology of severe sepsis. **Virulence**, v. 5, n. 1, p. 4–11, 2014.

MINEO, C.; SHAUL, P. W. Novel biological functions of high-density lipoprotein cholesterol. **Circulation research**, v. 111, n. 8, p. 1079-1090, 2012.

MORENO, V. A.; CARTAGENA, P. Á. E.; MORA, P. G. Apolipoproteína E Y Enfermedad Cardiovascular. **Rev Fac Med Univ Nac Colomb**, v. 54, n. 1, p. 53–66, 2006.

MURCH, O. et al. Lipoproteins in inflammation and sepsis. I. Basic science. **Intensive Care Medicine**, v. 33, n. 1, p. 13–24, 2007.

NASSAJI, M.; GHORBANI, R. Plasma lipid levels in patients with acute bacterial infections. **Turk J Med Sci**, v. 42, n. 3, p. 465–469, 2012.

NESSELER, N. et al. Clinical review: The liver in sepsis. **Critical care (London, England)**, v. 16, n. 5, p. 235, 2012.

NG, D. S. Insight into the role of LCAT from mouse models. **Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders**, v. 5, n. 4, p. 311–318, 2004.

NORATA, G. D. et al. Emerging role of high density lipoproteins as a player in the immune system. **Atherosclerosis**, v. 220, n. 1, p. 11–21, 2012.

OLIVEIRA FILHO, R. A. de. *Associação entre polimorfismos genéticos de interleucinas e marcadores de inflamação e de prognóstico em pacientes portadores de sepse*. 2016. 75 f. **Dissertação (Mestrado)** – Universidade Federal de Pernambuco, Recife. 2016.

OSSOLI, A. et al. High-Density Lipoprotein, Lecithin: Cholesterol Acyltransferase, and Atherosclerosis. **Endocrinol Metab**, v. 31, p. 223–229, 2016.

PAIVA, R. A. de; DAVID, C. M.; DOMONT, G. B. Proteômica na sepse: estudo piloto. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 22, n. 4, p. 403-412, 2010.

PARRA, S.; CASTRO, A.; MASANA, L. The pleiotropic role of HDL in autoimmune diseases. **Clínica e Investigación en Arteriosclerosis**, v. 27, n. 2, p. 97-106, 2015.

PHILLIPSON, M.; KUBES, P. The neutrophil in vascular inflammation. **Nature Medicine**, v. 17, n. 11, p. 1381–1390, 2011.

RANGEL-FRAUSTO, M. S. Sepsis: Still going strong. **Archives of Medical Research**, v. 36, n. 6, p. 672–681, 2005.

REINHART, K.; DANIELS, R.; MACHADO, F. R. O ônus da sepse: uma chamada em apoio ao Dia Mundial da Sepse 2013. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 25, n. 1, p. 3-5, 2013.

REMALEY, A. T.; NORATA, G. D.; CATAPANO, A. L. Novel concepts in HDL pharmacology. **Cardiovascular Research**, v. 103, n. 3, p. 423–428, 2014.

RHAINDS, D.; BRISSETTE, L. The role of scavenger receptor class B type I (SR-BI) in lipid trafficking: Defining the rules for lipid traders. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 36, n. 1, p. 39–77, 2004.

RIOS-SANTOS, F. et al. Down-regulation of CXCR2 on neutrophils in severe sepsis is mediated by inducible nitric oxide synthase-derived nitric oxide. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 175, n. 5, p. 490–497, 2007.

ROHRER, L. et al. High density lipoproteins in the intersection of diabetes mellitus, inflammation and cardiovascular disease. **Current opinion in lipidology**, v. 15, n. 3, p. 269-278, 2004.

ROUSSET, X. et al. Lecithin: cholesterol acyltransferase--from biochemistry to role in cardiovascular disease. **Current opinion in endocrinology, diabetes, and obesity**, v. 16, n. 2, p. 163–71, 2009.

SALES JÚNIOR, J. A. L. et al. Sepse Brasil: Estudo Epidemiológico da Sepse em Unidades de terapia intensiva Brasileiras* An Epidemiological Study of Sepsis in Intensive Care Units. Sepsis Brazil Study. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 18, n. 1, p. 9–17, 2006.

SANTOS, M. G. et al. Fatores de risco no desenvolvimento da aterosclerose na infância e adolescência. **Arq Bras Cardiol**, v. 90, n. 4, p. 301-308, 2008.

SANTOS, A. M. et al. Sepse em adultos na unidade de terapia intensiva: características clínicas. **Arq Med Hosp Fac Cienc Med Santa Casa São Paulo**, v.61, n.1, p 3-7, 2016.

SANTOS-GALLEGO, C. G.; BADIMON, J. J.; ROSENSON, R. S. Beginning to understand high-density lipoproteins. **Endocrinology and Metabolism Clinics of North America**, v. 43, n. 4, p. 913–947, 2014.

SCHAEFER, E. J.; ANTHANONT, P.; ASZTALOS, B. F. High-density lipoprotein metabolism, composition, function, and deficiency. **Current Opinion in Lipidology**, v. 25, n.

3, p. 194–199, 2014.

SEYMOUR, C. W. et al. Assessment of Clinical Criteria for Sepsis: For the Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). **Jama**, v. 315, n. 8, p. 762–74, 2016.

SHANKAR-HARI, M. et al. Developing a New Definition and Assessing New Clinical Criteria for Septic Shock. **Jama**, v. 315, n. 8, p. 775, 2016.

SHIH, A. Y.; SLIGAR, Stephen G.; SCHULTEN, Klaus. Maturation of high-density lipoproteins. **Journal of The Royal Society Interface**, p. 863, 2009.

SHOR, R. et al. Low HDL levels and the risk of death, sepsis and malignancy. **Clinical Research in Cardiology**, v. 97, n. 4, p. 227–233, 2008.

SILVA, C. A. et al. Efeito de tratamento cirúrgico sobre a atividade da enzima hepática lecitina: colesterol aciltransferase (LCAT) na esquistossomose mansônica. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 17, p. 28–30, 2002.

SILVA, E. et al. Brazilian Sepsis Epidemiological Study (BASES study). **Critical care (London, England)**, v. 8, n. 4, p. R251–R260, 2004.

SILVA, E. Surviving Sepsis Campaign: um esforço mundial para mudar a trajetória da sepse grave. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 18, n. 4, p. 325–7, 2006.

SILVA, E. Sepse Manual: Instituto Latino-Americano para Estudos da Sepse. 2 ed. São Paulo: **Atheneu**, 2008.

SILVEIRA, S.R.; FERREIRA, L.F.L.; LAGE, M.H.H. Fisiopatologia da sepse: revisão de literatura. **PUBVET**, Londrina, V. 8, N. 9, Ed. 258, Art. 1709, Maio, 2014.

SINGER, M. et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). **Jama**, v. 315, n. 8, p. 801–10, 2016.

SINGH, S.; EVANS, T. W. Organ dysfunction during sepsis. **Applied Physiology in Intensive Care Medicine 1: Physiological Notes - Technical Notes - Seminal Studies in Intensive Care, Third Edition**, p. 331–342, 2012.

SIQUEIRA-BATISTA, R. et al. Sepse : atualidades e perspectivas. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva.** v. 23, n. 2, p. 207–216, 2011.

SIQUEIRA, A. F. A.; ABDALLA, D. S. P.; FERREIRA, S. R. G. LDL: da síndrome metabólica à instabilização da placa aterosclerótica. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 50, n. 2, p. 334–343, 2006.

SOARES, A. J. C. et al. Proteômica e sepse: novas perspectivas para o diagnóstico. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 19, n. 1, p. 14–22, 2007.

SOGAYAR, A.; MACHADO, F.; REA-NETO, A. A multicentre, prospective study to evaluate costs of septic patients in Brazilian intensive care units. **PharmacoEconomics**, v. 26, n. 5, p. 425–434, 2008.

SORCI-THOMAS, M. G.; BHAT, S.; THOMAS, M. J. Activation of lecithin:cholesterol acyltransferase by HDL ApoA-I central helices. **Clinical Lipidology**, v. 4, n. 1, p. 113–124,

2009.

SORAN, H.; SCHOFIELD, J. D.; DURRINGTON, P. N. Antioxidant properties of HDL. **Frontiers in Pharmacology**, v. 6, n. OCT, p. 222, 2015.

SOUPENE, E. et al. Featured Article: Alterations of lecithin cholesterol acyltransferase activity and apolipoprotein A-I functionality in human sickle blood. **Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.)**, v. 241, n. 17, p. 1933–1942, 2016.

SOUTO, F. O. et al. Essential role of CCR2 in neutrophil tissue infiltration and multiple organ dysfunction in sepsis. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 183, n. 2, p. 234–242, 2011.

THABUT, D. et al. High-density lipoprotein administration attenuates liver proinflammatory response, restores liver endothelial nitric oxide synthase activity, and lowers portal pressure in cirrhotic rats. **Hepatology**, v. 46, n. 6, p. 1893–1906, 2007.

TAKEDA, K.; KAISHO, T.; AKIRA, S. T. Toll-like receptors. **Annual Review of Immunology**, v. 21, n. 1, p. 335–376, 2003.

TANIGUCHI, L. U. et al. Sepsis-related deaths in Brazil: an analysis of the national mortality registry from 2002 to 2010. **Critical care (London, England)**, v. 18, n. 6, p. 608, 2014.

TEIXEIRA, H. C. ABRAMO, C.; MUNK, M. E. Diagnóstico imunológico da tuberculose: problemas e estratégias para o sucesso. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 33, n. 3, p. 323-334, 2007.

VAN LEEUWEN, H. J. et al. Lipoprotein metabolism in patients with severe sepsis. **Critical care medicine**, v. 31, n. 5, p. 1359-1366, 2003.

VINCENT, J.-L. et al. Reducing mortality in sepsis: new directions. **Critical care (London, England)**, v. 6 Suppl 3, p. S1–S18, 2002.

VINCENT, J.-L. et al. Sepsis in European intensive care units: results of the SOAP study. **Critical care medicine**, v. 34, n. 2, p. 344–353, 2006.

VINCENT, J.-L. et al. Sepsis definitions: Time for change. **The Lancet**, v. 381, n. 9868, p. 774–775, 2013.

VON ECKARDSTEIN, A.; NOFER, J-R.; ASSMANN, G. High density lipoproteins and arteriosclerosis. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 21, n. 1, p. 13-27, 2001.

WANG, K.; SUBBAIAH, P. V. Importance of the free sulfhydryl groups of lecithin-cholesterol acyltransferase for its sensitivity to oxidative inactivation. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1488, n. 3, p. 268-277, 2000.

WANG, D.; YIN, Y.; YAO, Y. Advances in sepsis-associated liver dysfunction. **Burns & Trauma**, v. 2, n. 3, p. 97, 2014.

WENDEL, M.; PAUL, R.; HELLER, A. R. Lipoproteins in inflammation and sepsis. II. Clinical aspects. **Intensive Care Medicine**, v. 33, n. 1, p. 25–35, 2007.

WU, A.; HINDS, C. J.; THIEMERMANN, C. High-density lipoproteins in sepsis and septic

shock: metabolism, actions, and therapeutic applications. **Shock (Augusta, Ga.)**, v. 21, n. 3, p. 210–221, 2004.

YANCEY, P. G. et al. Importance of different pathways of cellular cholesterol efflux. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 23, n. 5, p. 712-719, 2003.

ZANNIS, V. I.; CHRONI, A.; KRIEGER, M. Role of apoA-I, ABCA1, LCAT, and SR-BI in the biogenesis of HDL. **Journal of Molecular Medicine**, v. 84, n. 4, p. 276–294, 2006.

ZAVARIZ, S. M. R et al. Marcadores laboratoriais do choque séptico. **Scientia Medica, Porto Alegre: PUCRS**, v. 16, n. 1, 2006.

ZHANG, F. et al. Glutamine attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung injury. **Nutrition**, Mar 13. 2009.

ZHENG, C.; AIKAWA, M. High-density lipoproteins: from function to therapy. **Journal of the American College of Cardiology**. v. 60, n. 23, 2012.

ANEXOS

ANEXO A – Escore APACHE II

PRONTO-SOCORRO CARDIOLÓGICO UNIVERSITÁRIO DE PERNAMBUCO PROFº LUIZ TAVARES
PROCAPE

Nome:_____ Idade:_____anos Leito:_____

Prontuário:_____ Data de admissão:_____

1 - Variáveis fisiológicas e laboratoriais coletadas nas primeiras 24 h

	+4	+3	+2	+1	0	+1	+2	+3	+4
Temperatura (°C)	≥41	39-40,9		38,5-38,9	36-38,4	34-35,9	32-33,9	30-31,9	≤29,9
Pressão arterial média (mmHg)	≥160	130-159	110-129		70-109		50-69		≤49
Frequência cardíaca (bpm)	≥180	140-179	110-139		70-109		55-69	40-54	≤39
Frequência respiratória (rpm)	≥50	35-49		25-34	12-24	10-11	6-9		≤≤5
(A-a) com FiO2 ≥ 0,5	>500	350-499	200-349		≤200				
PO_2 com FiO_2 < 0,5					>70	61-70		55-60	≤55
pH arterial	≥7,7	7,6-7,69		7,5-7,59	7,3-7,49		7,25-7,3	7,15-7,2	<7,15
Sódio sérico (mEq/L)	≥180	160-179	155-159	150-154	130-149		120-129	111-119	≤110
Potássio sérico (mEq/L)	≥7	6-6,9		5,5-5,9	3,5-5,4	3-3,4	2,5-2,9		≤2,5
Creatinina sérica (mg%)	≥3,5	2-3,4	1,5-1,9		0,6-1,4		<0,6		
Hematócrito (%)	≥60		50-59,9	46-49,9	30-45,9		20-29,9		≤20
Leucócitos (x1000mm³)	≥40		20-39,9	15-19,9	3-14,9		1-2,9		≤≤1

2 - Escala de Glasgow

3 - Idade (anos): ≤44:0 ; 45-54:2 ; 55-64:3 ; 65-74:5 ; ≥75:6

4 - Doenças crônicas: clínico: 5; cirúrgico de urgência: 5 ; cirúrgico eletivo:2

TOTAL DE PONTOS:____ 0-4: 4% NÃO-OP., 1% PÓS-0P / 5-9:8%, 3% / 10-14: 15%, 7% / 15-19: 24%,12% 20-24: 40%, 30% / 25-29: 55%, 35% / 30-34: 73%, 73%/ 35-100: 85%, 88%.

ANEXO B – Escore SOFA

PRONTO-SOCORRO CARDIOLÓGICO UNIVERSITÁRIO DE PERNAMBUCO PROFº LUIZ TAVARES
PROCAPE

Nome:_____ Idade:_____anos Leito:_____

Prontuário:_____ Data de admissão:_____

1 - Variáveis fisiológicas e laboratoriais coletadas no primeiro, segundo, terceiro, quinto, sétimo, 14° e 28° dia de internação.

PONTUAÇÃO / VARIÁVEL	0	1	2	3	4
PaO_2/FiO_2	> 400	≤ 400	≤ 300	≤200±VM	≤100±VM
Plaquetas ($x10^3$)	> 150	≤ 150	≤ 100	≤50	≤20
Bilirrubinas (mg%)	< 1,2	1,2 – 1,9	2,0 – 5,9	6,0 – 11,9	>12
Cardiovascular	PAM Normal	PAM < 70	Dopa < 5 e/ou Dobutamina	Dopa > 5 Epi ≤ 0,1 Nor ≤ 0,1	Dopa > 15 Epi > 0,1 Nor > 0,1
Escala de Glasgow	15	13 – 14	10 – 12	6 – 9	< 6
Creatinina (mg%) ou Diurese (mL/dia)	< 1,2	1,2 – 1,9	2,0 – 3,4	3,5 – 4,9 ou <500	3,5 – 4,9 ou <500

Dopa = Dopamina (µg/Kg/min); Epi = Epinefrina (µg/Kg/min); Nor = Noradrenalina (µg/Kg/min)

PAM = Pressão Arterial Média; PaO2/FiO2 = Pressão Arterial de Oxigênio/Fração Inspirada de Oxigênio; VM = Ventilação Mecânica.

ANEXO C – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

1. Dados do participante:

Nome: _____

RG: _____CPF:_____

Data de Nascimento: _____/_____/_____ Sexo: ( ) Masculino ( ) Feminino

Endereço: _____n°:_____

Complemento: _____

Bairro: _____ Cidade: _____

Estado: _____ CEP: _____

Telefone/Operadora: (____) _____ - _____

2. Título do Protocolo de Pesquisa:

ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS DE INTERLEUCINAS À MORTALIDADE EM PACIENTES ADMITIDOS NA UNIDADE DE TERAPIA INTENSIVA DE UM HOSPITAL CARDIOLÓGICO CONSIDERANDO DIFERENTES SCORES PROGNÓSTICOS E MARCADORES DE INFLAMAÇÃO

3. Dados do Investigador Principal:

Profa. Dra. Rosângela Ferreira Frade de Araújo

Dados para contato: Universidade Federal de Pernambuco, Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, Av. Professor Moraes Rêgo S/N, Cidade Universitária, Recife-PE. CEP 50670-901 - Fone: 87731888/ 21268587

4. Avaliação do Risco da Pesquisa:

( ) Risco mínimo (X) Risco baixo ( ) Risco médio ( ) Risco maior

(probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como consequência imediata ou tardia do estudo).

5. Duração da Pesquisa: 3 anos.

Termo de consentimento livre e esclarecido conforme as diretrizes da resolução CNS 196/96 para projeto: Escores clínicos e biomarcadores associados à mortalidade em pacientes admitidos na unidade de terapia intensiva de um hospital cardiológico.

O estudo intitulado **"ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS DE INTERLEUCINAS E RECEPTORES TOLL-LIKE À MORTALIDADE EM PACIENTES ADMITIDOS NA UNIDADE DE TERAPIA INTENSIVA DE UM HOSPITAL CARDIOLÓGICO CONSIDERANDO DIFERENTES SCORES PROGNÓSTICOS E MARCADORES DE INFLAMAÇÃO"**, sob a responsabilidade de Dra. Rosângela Ferreira Frade de Araújo, a ser realizado no Pronto Socorro Cardiológico de Pernambuco (PROCAPE) – Unidade Coronária I (UCO I) e no LIKA – UFPE tem como objetivo verificar a associação entre fatores de risco com a mortalidade em pacientes admitidos na UTI.

Você foi convidado a participar desse estudo por ser admitido na UCO I do PROCAPE, caso concorde em participar, sua colaboração no estudo consistirá nas seguintes etapas:

1- Como protocolo da UCO I, exames laboratoriais são solicitados diariamente para a sua monitorização durante o período de internação. Nas primeiras 24 horas de admissão na UCO I amostras de seu sangue venoso, 10 mL, serão coletadas como de rotina para exames laboratoriais, utilizaremos estas amostras para a dosagem de procalcitonina, proteína C reativa ultrassensível. Interleucina (IL)-3, IL-6, IL-8, IL-10 e polimorfismo das interleucinas (IL-6 e IL-10). Os resultados dos seus exames de NRBCs, eosinófilos, plaquetas, leucócitos, creatinina, bilirrubinas, alanina aminotransferase, sódio, potássio, gasometria e tempo de protrombina serão copilados dos exames laboratoriais de rotina para o seu acompanhamento diário.

2- Seu prontuário hospitalar será consultado para avaliar a sua pontuação do escore *Acute Physiology And Chronic Health Evaluation II* (APACHE II) e escore *Sepsis Related Organ Failure Assessment* (SOFA), modelos de risco de gravidade da doença utilizados na UCO I.

3- O projeto não fornece benefício ou compensação financeira para a sua participação no estudo.

4- Se você concordar, sua amostra de sangue poderá ser guardada e poderá ser utilizada em estudos futuros desde que aprovados por Comitê de Ética em Pesquisa.

Riscos:

1- Existe um pequeno risco nas coletas de sangue como a formação de um hematoma e dor. As coletas de sangue serão feitas por profissional treinado. O Hospital lhe dará a mesma assistência caso isto ocorra com você.

Técnica de punção venosa e arterial: inicialmente, deve-se explicar todo o procedimento ao paciente, seguindo-se da colocação do torniquete na porção proximal do braço para facilitar a visualização da veia a ser puncionada. Segue-se com a assepsia rigorosa do sítio de punção realizada com soluções degermantes a base de clorexidina, polivinilpirrolidona-iodo (PVP-I) ou com álcool a 70%. A utilização de luvas e máscara é obrigatória. Então, realiza-se a punção venosa ou arterial com agulha e seringa descartáveis para colheita do sangue para exames laboratoriais e em seguida, nova assepsia e compressa local. Quanto às possíveis complicações podemos ter: formação de hematomas, trombose venosa e tromboflebites. Para cada complicação, deve-se proceder à sua resolução imediata.

Técnica líquido cefalorraquidiano (LCR): A coleta de LCR será feita por meio de uma punção, em ambiente hospitalar, que pode ser suboccipital (logo abaixo do crânio) ou lombar (entre a terceira, a quarta e a quinta vértebra lombares) é imprescindível que o procedimento seja totalmente estéril e realizado por um profissional treinado. Por conseguinte a coleta, o paciente deve permanecer em repouso por, no mínimo, 12 horas e hidratação forçada. Quanto às possíveis complicações podemos ter: sangramento, cefaleia e lombalgia. Para cada complicação, deve-se proceder à sua resolução imediata.

2- Você tem a garantia que suas informações pessoais serão mantidas em sigilo e que manteremos os resultados deste estudo confidencial. Tanto o questionário quanto as amostras serão identificados por número código e não por seu nome.

Benefícios:

Você não é obrigado a participar deste estudo e a qualquer momento você poderá tirar a sua permissão de participação. O projeto não lhe fornecerá nenhum benefício pessoal ou compensação financeira por sua participação. Participando, você contribuirá para o melhor entendimento sobre biomarcadores que indiquem o prognóstico dos pacientes de UTI, como a gravidade da doença, presença de infecção ou resposta inflamatória sistêmica, a fim de se obter alternativas terapêuticas precoces, mais seletivas e menos danosas para os pacientes. Se, a qualquer momento, você retirar sua permissão de participação no estudo, suas amostras de sangue serão descartadas.

Esclarecimentos:

Você tem a garantia de qualquer esclarecimento, pelos pesquisadores responsáveis, antes e durante o curso da pesquisa. Nosso estudo não resultará em despesas para a instituição, para você e nem para seus familiares.

Consentimento para guarda da amostra de sangue e uso em estudo futuro:

Sua amostra de sangue poderá ser guardada e poderá ser utilizada em outros estudos futuros se aprovados por Comitê de Ética em Pesquisa

***Assinale apenas uma das alternativas abaixo:**

( ) Sim, eu permito que minha amostra seja guardada para possível utilização em outros estudos, se aprovado pela Comissão de Ética e eu não preciso ser contatado na ocasião.

( ) Sim, eu permito que minha amostra seja guardada para possível utilização em outros estudos, se aprovado pela Comissão de Ética, mas eu quero ser contatado na ocasião para novo consentimento. Número de telefone para contato:_____

( ) Não, eu não permito que minha amostra seja guardada para possível utilização em outros estudos.

DECLARO QUE LI E ENTENDI TODAS AS INFORMAÇÕES E CONCORDO NA MINHA PARTICIPAÇÃO NA PESQUISA ACIMA. TENHO LIBERDADE DE RETIRAR O MEU CONSENTIMENTO EM QUALQUER FASE DA PESQUISA, CASO NÃO QUEIRA CONTINUAR PARTICIPANDO DA MESMA, SEM PREJUÍZO ALGUM.

Nome do participante: _____

Assinatura: _____

Data: _____/_____/_____

SE VOCÊ NÃO ESTIVER EM CONDIÇÕES FÍSICAS OU MENTAIS DE DECIDIR SOBRE SUA PARTICIPAÇÃO NESTE ESTUDO, SEU REPRESENTANTE LEGAL PODERÁ ASSINAR ESTE TERMO.

Nome do representante legal: _____

Assinatura: _____

Data: _____/_____/_____

_____

Assinatura do pesquisador responsável

ANEXO D – Comitê de Ética no Uso de Animais

Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas

Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
50670-420 / Recife - PE - Brasil
fones: (55 81) 2126 8840 | 2126 8351
fax: (55 81) 2126 8350
www.ccb.ufpe.br

Recife, 09 de outubro de 2015.

Ofício nº 98/15

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE
Para: **Prof. Fabrício Oliveira Souto**
Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami
Universidade Federal de Pernambuco
Processo nº 23076.025265/2015-27

Os membros da Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEUA-UFPE) avaliaram seu projeto de pesquisa intitulado, **"Expressão da lectina colesterol acetiltransferase (LCAT) e sua relação com a sepse experimental e humana"**.

Concluímos que os procedimentos descritos para a utilização experimental dos animais encontram-se de acordo com as normas sugeridas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal e com as normas internacionais estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals as quais são adotadas como critérios de avaliação e julgamento pela CEUA-UFPE.

Encontra-se de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 11.794 de 08 de outubro de 2008, que trata da questão do uso de animais para fins científicos e didáticos.

Diante do exposto, emitimos **parecer favorável** aos protocolos experimentais a serem realizados.

Origem dos animais: Biotério do LIKA-UFPE; Animais: camundongos isogênicos BALB; Idade: 60 dias; Peso: 18-22g; Nº total de animais: 50.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Pedro V. Carelli
Presidente da CEUA / CCB - UFPE
UFPE SIAPE 1801584

ANEXO E – Artigo Científico em Colaboração

Atividades desenvolvidas durante o mestrado

AAPS PharmSciTech (# 2015)
DOI: 10.1208/s12249-015-0375-0

Research Article

Glutamine-Loaded Liposomes: Preliminary Investigation, Characterization, and Evaluation of Neutrophil Viability

Larissa Chaves Costa,[1,4] **Bárbara Nayane Rosário Fernandes Souza**,[1] Fábio Fidélis Almeida,[1] Cláudia Jacques Lagranha,[2] Pabyton Gonçalves Cadena,[1,3] Nereide Stela Santos-Magalhães,[1,4] and Mariane Cajubá de Britto Lira-Nogueira[1,2,5]

Received 27 March 2015; accepted 16 July 2015

Abstract. Glutamine has received attention due to its ability to ameliorate the immune system response. Once conventional liposomes are readily recognized and captured by immune system cells, the encapsulation of glutamine into those nanosystems could be an alternative to reduce glutamine dosage and target then to neutrophils. Our goals were to nanoencapsulate glutamine into conventional liposomes (Gln-L), develop an analytical high-performance liquid chromatography (HPLC) method for its quantification, and evaluate the viability of neutrophils treated with Gln-L. Liposomes were prepared using the thin-film hydration technique followed by sonication and characterized according to pH, mean size, zeta potential, and drug encapsulation efficiency (EE%). We also aimed to study the effect of liposomal constituent concentrations on liposomal characteristics. The viability of neutrophils was assessed using flow cytometry after intraperitoneal administration of free glutamine (Gln), Gln-L, unloaded-liposome (UL), and saline solution as control (C) in healthy Wistar rats. The selected liposomal formulation had a mean vesicle size of 114.65±1.82 nm with a polydispersity index of 0.30±0.00, a positive surface charge of 36.30±1.38 mV, and an EE% of 39.49±0.74%. The developed chromatographic method was efficient for the quantification of encapsulated glutamine, with a retention time at 3.8 min. A greater viability was observed in the group treated with glutamine encapsulated compared to the control group (17%), although neutrophils remain viable in all groups. Thus, glutamine encapsulated into liposomes was able to increase the number of viable neutrophils at low doses, thereby representing a promising strategy for the treatment of immunodeficiency conditions.

KEY WORDS: cell viability; glutamine; liposomes; neutrophils.

INTRODUCTION

Glutamine (Gln) is the most abundant free amino acid in plasma and muscle tissue and can also be found at relatively high concentrations in other tissues (1). The synthesis of this amino acid occurs primarily in skeletal muscle, as well as in the lung, liver, and brain. However, its consumption occurs primarily in the kidney, immune system, and gastrointestinal tract cells. The liver is the only organ able to consume and synthesize glutamine (2). Despite being classified as nonessential, glutamine is currently considered to be conditionally essential; in specific critical contexts, such as surgery, trauma, and exhaustive exercise, the synthesis of glutamine does not supply the demand required by the body, resulting in immunocompetence and an increased incidence of infections (3–5).

Glutamine plays a major role in cell proliferation particularly in the immune system, in which it has been used at high rates by lymphocytes as a source of energy, providing an ideal condition for the biosynthesis of nucleotides and thus cell replication (6). Regarding leukocytes, they are largely dependent on skeletal muscle glutamine synthesis and are also released into the blood to satisfy their metabolic requirements. This is due to the absence of glutamine synthetase, which catalyzes the synthesis of glutamine from ammonia and glutamate (7).

Neutrophils constitute 60% of circulating leukocytes and act as the first line of defense in the plasma and perform phagocytosis either alone or in cooperation with antigen-specific defenses. Processes of endocytosis, secretion of active compounds, and generation of reactive oxygen species are mostly dependent on glutamine metabolism in neutrophils (8).

Because neutrophils use glutamine at high rates compared to other cells of the immune system, researchers have investigated the effect of this amino acid on the cell parameters of human and rat neutrophils (9,10).

[1] Laboratório de Imunopatologia Keizo-Asami, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brazil.
[2] Centro Acadêmico de Vitória, Universidade Federal de Pernambuco, Rua do Alto do Reservatório s/n, Bela Vista, CEP: 55608-680, Vitória de Santo Antão, PE, Brazil.
[3] Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE, Brazil.
[4] Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brazil.
[5] To whom correspondence should be addressed. (e-mail: marianelira@gmail.com)

1530-9932/15/0000-0001/0 # 2015 American Association of Pharmaceutical Scientists
Published online: 31 July 2015

Moreover, glutamine is a component of proteins, it transports ammonia between tissues, is a source of carbon skeleton for gluconeogenesis, contributes to acid-base balance, and participates in the synthesis of nucleotides and nucleic acids (4,11); thus, it is of great importance for the maintenance and proper functioning of an organism.

The events of metabolic stress or diseases, such as dengue, cancer, AIDS, burns, surgeries, and intense and prolonged exercise, are some situations in which there is an excessive consumption of glutamine, surpassing its synthesis by the body (12). Previous studies have demonstrated that a decrease in the intramuscular and plasma concentrations of glutamine may be partially responsible for the depression of immunological function and the administration of glutamine may reduce this state (13–15), thereby providing an improved recovery of patients with such diseases (16,17).

Despite presenting significant benefits in some situations, previous studies have reported that glutamine supplementation can promote renal failure and may exacerbate the clinical situation of chronic kidney disease, particularly in diabetic patients (11,18,19). Moreover, it has a solubility in water of 48 g/l at 30°C (pKa_1=2.17 and pKa_2=9.13) and is unstable in solution, which may undergo breakdown depending on temperature, pH, and anion concentration (20,21). An approach to overcome these physicochemical limitations and to reduce adverse effects, while increasing its therapeutic effect, is the development of a pharmaceutical dosage form that is able to target the bioactive compound to a specific site of action, thereby increasing therapeutic efficacy. Thus, drug delivery systems, such as liposomes, may offer advantages to overcome these limitations.

Liposomes are spherical vesicles consisting of one or more concentric bilayers of phospholipids that isolate one or more aqueous inner compartments of the external environment (22). Liposomes are classified as conventional and consist of phospholipids and cholesterol; this type is quickly recognized and taken up by the immune system and is ideal for carrying drugs to neutrophils (23). We propose that the use of glutamine-loaded conventional liposomes could be a promising approach to target this amino acid to neutrophils, thereby enhancing their activity.

Within this framework, the goal of this research was to first develop conventional liposomes containing glutamine and to select a typical formulation after experimental design. Second, we aimed to develop an analytical method to determine and quantify the nanoencapsulated glutamine using high-performance liquid chromatography (HPLC), and finally, we evaluated the neutrophil viability, after the administration of glutamine-loaded conventional liposomes in Wistar rats.

MATERIAL AND METHODS

Reagents

L - Glutamine (Gln ≥ 99%), cholesterol (Chol), stearylamine (SA), glycogen from oyster type II, and propidium iodide were purchased from Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA). 98% Soya phosphatidylcholine (PC) was obtained from Lipoid GmbH (Ludwigshafen, Germany). Solvents and other chemicals were supplied by Merck (Darmstadt, Germany).

Methodology

Experimental Design

First, a two-level 2^{4-1} fractional experimental design was performed to study the effect of constituent concentrations on the properties of liposomes. Four formulation factors, which mainly affect liposome physicochemical characteristics, were evaluated at two levels and a central point. The factors were defined as follows: A [PC]=15.63, 31.27, and 46.91 mM; B [Chol]=4.42, 8.84, and 13.26 mM; C [SA]=0, 4.19, and 8.38 mM; and D [Gln]=27.37, 41.05, and 54.74 mM.

The pH, mean size of the vesicles, polydispersity index (PDI), zeta potential, (ζ, mV), and drug encapsulation efficiency (EE%) of the liposomes were analyzed, as described below, and used as the response variables of the design study.

Next, a two-level 2^2 full experimental design was performed to study the effect of PC and Chol concentrations, as well as their second-order interactions, on the physicochemical characteristics. The design was performed using a matrix of seven experiments with a central point, and the factors defined were as follows: A [PC]=31.27, 39.09, and 46.91 mM and B [Chol]=8.84, 11.05, and 13.26 mM.

The same response variables of the fractional design study were used to analyze the full experimental design study.

Preparation of Glutamine-Loaded Conventional Liposomes

Glutamine-loaded liposomes were prepared using the modified thin-lipid-film method (24). Briefly, lipids consisting of soya phosphatidylcholine and cholesterol, with or without stearylamine, a positive charged lipid, were dissolved in a mixture of $CHCl_3$:MeOH (3:1 v/v) under magnetic stirring. The solvents were removed under pressure at 37±1°C, 80 rpm for 60 min, forming a thin lipid film. This film was then hydrated with 10 ml of phosphate buffer solution at pH 7.4, containing glutamine (27.37, 41.05, and 54.74 mM) that had been previously dissolved, resulting in the formation of multilamellar liposomes. Finally, the liposomal suspension was sonicated (Vibra Cell, Branson, USA) at 200 W and 40 Hz for 400 s under low temperature (4°C) to form small unilamellar liposomes.

Physicochemical Characterization of Glutamine-Loaded Conventional Liposomes

Liposome formulations were characterized by the measurement of pH, mean hydrodynamic diameter, PDI, and surface charge (zeta potential) of vesicles. The pH of the liposome dispersions was measured using a digital pH meter (Micronal B474, São Paulo, SP, Brazil) at 25°C. The polydispersity index and diameter of the liposomes were quantified using photon correlation spectroscopy (Delsa™ Nano S Particle analyzer, Beckman Coulter, Brea, CA, USA), at 25°C at a fixed angle of 90°. For the analysis, the samples were adequately diluted using 300 μl of liposomes and 700 μl of purified water. The zeta potential (ζ, mV) was measured at 25°C using the electrophoresis technique (Malvern Zetasizer Nano ZS90,

Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, UK). In these analyses, liposome dispersions (50 µl) were diluted with 950 µl of purified water. The results represent the average of three determinations.

The drug EE% was determined using the ultrafiltration/ultracentrifugation technique with Ultrafree® units (Millipore Corporation, Bedford, MA, USA) (24). Liposomal samples (400 µl) were inserted into the filtration unit and subjected to centrifugation (Ultracentrifuge KT-20000, Kubota, Japan) at 8776×g for 1 h at 4°C. The content of Gln in the supernatant was measured using the HPLC method as detailed below.

Extraction and Determination of the Glutamine Content into Conventional Liposomes

The method for glutamine extraction was developed according to the two-phase system previously described by Bligh and Dyer (25), which obtained the organic (lipids) and aqueous (glutamine) phases. Briefly, for Gln extraction, 200 µl of liposomes was diluted into 400 µl of a mixture of $CHCl_3$:MeOH (1:1) and subsequently sonicated for 3 min. Next, 1 and 1.7 ml of chloroform and methanol, respectively, were added and sonicated for more than 3 min. For the two-phase system formation, purified water was added to a final volume of 5 ml. After visual separation, the aqueous fraction was filtered and analyzed, to determine the glutamine content, using the HPLC method.

The HPLC method for determining and quantifying the glutamine content into liposomes was performed using a liquid chromatographer (Waters Alliance e2695-2998, Waters, Milford, MA, USA) coupled with a photodiode array detector and operated by Empower™ software. The chromatographic run was performed using a reversed-phase Waters C18 XBridge® column (4.6×250 mm i.d. particle 3.5 µm) with 50 µl of sample injection volume at 37°C. HPLC analysis of Gln was performed using a mobile phase consisting of methanol and double-deionized water (6:4 v/v) at a flow rate of 0.7 ml/min and detection at 204 nm. Standard curves were assayed using glutamine solutions at concentrations ranging from 80 to 400 µg/ml. The assays were performed in triplicate.

In Vivo Experiment

Animals

The in vivo study was performed according to Lagranha and co-workers (10). This study was performed according to the Ethics Committee for Experiments on Animals of the Federal University of Pernambuco (CEUA-UFPE, Recife, Brazil) with protocol approval (#23076.013231/2012-47). Female Wistar rats (200±20 g) were maintained in collective cages until the day of the experiment, at a temperature of 22 ±2°C and relative humidity of 60% and under a cycle of 12 h light/12 h darkness with unrestricted access to water and food (commercial chow). The animals were randomly divided into five following groups of three rats each: Gln-IP (glutamine in solution by intraperitoneal route), Gln-GAV (glutamine in solution by gavage), Gln-L (glutamine-loaded liposomes), UL (unloaded liposomes), and C (control/saline as placebo). The rats did not present a metabolic disorder, such as diabetes, and were not subjected to intense exercise or surgical procedures.

Recruitment of Neutrophils

With the purpose of causing an inflammatory stimulus and the substantial migration of neutrophils into the intraperitoneal cavity, 15 ml of sterile oyster glycogen solution type II (1%) in PBS was administered intraperitoneally to the rats prior to the experiments.

Treatment

After 2 h of neutrophil recruitment, the rats received free Gln, Gln-L, UL, and saline solution as the C. Glutamine in its free form was administered via two different routes: orally (1 g/kg) according to Lagranha and colleagues (10,26) and intraperitoneally (0.06 g/kg). Gln-L (0.06 g/kg), UL, and saline solution were administered intraperitoneally (2 ml each, with the same volume, which corresponded to the glutamine- loaded liposomes).

Collecting Neutrophils

Rats were anesthetized with Urethane® (1.25 g/kg) and sacrificed by cervical dislocation 2 h after treatment. Neutrophils were obtained by intraperitoneal (i.p.) lavage with 40 ml sterile phosphate-buffered saline. The cells were centrifuged (1000×g for 10 min), washed twice with PBS, and then quantified in a Neubauer chamber using the Trypan Blue solution (1% in PBS) and optical microscopy (Olympus, USA).

Neutrophil Viability Assay

The viability of neutrophils was assessed using a flow cytometer (FACSCalibur, Becton Dickinson Systems, San Jose, CA, USA). The percentage of viable cells in each sample was determined using propidium iodide staining (solution at 0.05% in PBS) to identify dead cells. Data of 15.000 events were analyzed per sample. The fluorescence of the propidium iodide was detected at 630/622 nm.

Statistical Analysis

Experimental designs were performed in a random order. Statistical analyses were achieved using the OriginPro Academic 2015 (Origin Lab., Northampton, MA, USA). Statistically significant differences were determined using the Tukey multiple comparisons test, with p values less than 0.05 as the minimal level of significance.

RESULTS AND DISCUSSION

Experimental Design of Liposomal Formulations

Several factors related to the development of nanosystems may affect their characteristics, and a small change in even one factor may significantly change the properties of the entire system. According to the strategy of Cadena and colleagues (27), two experimental designs were performed aimed to study the effect of four factors in the formulation, i.e., the

concentration of constituents on the physicochemical properties of Gln-L, thereby obtaining optimized formulations.

The experiments were randomly assayed to nullify the effect of inappropriate nuisance variables in both experimental designs. The nine runs of the two-level 2^{4-1} fractional experimental design and their response variables are shown in Table I. Each response variable was individually analyzed, and it was observed that a lower level of stearylamine (SA) and a higher level of soya phosphatidylcholine (PC) reduced the mean size of the vesicles (runs 2 and 4). However, a higher level of SA increased the pH (runs 5 and 8) and a higher level of SA, PC, and Chol reduced the PDI values (run 8). It was also observed that a higher level of SA increased the zeta potential (runs 5 and 8). The glutamine encapsulation efficiency (EE%) was not affected by the factors studied ($p<0.05$). The higher G ln level (54.74 mM) and centr al point (41.05 mM) presented no statistically significant difference on the EE% of 43.20±0.86 and 38.74±0.78%, respectively. However, run 8 had a mean size of 315.71±16.2, which is higher than the run found in the central point (177.7 ±7.8 nm). Thus, a concentration of 41.05 mM Gln was used in further experiments due to the smaller size of liposomes.

A scatterplot (Fig. 1) was used to identify the best liposomal formulation obtained in the fractional experimental design study, in which the central point (run 9) showed a zeta potential of 32.73±0.63 mV, an EE% of 38.74±0.78, and a mean vesicle size of 177.7±7.76, and maintained its stability in suspension for at least 45 days. Finally, run 9 was used as the typical formulation for the new experimental design.

The two-level 2^2 full experimental design was developed to study the effect of PC and Chol concentrations and their interactions on liposomal characteristics, once they are the main relevant lipids, which directly affected the physicochemical parameters studied above.

The concentration of SA (4.19 mM) was maintained because it did not statistically demonstrate significant differences ($p<0.05$) between the higher level and central point in the zeta potential, reducing the amount of SA used. Secondly, the presence of SA promoted a zeta potential value above 30 mV (runs 5–9), which, as reported in the literature, is an ideal value (even negative or positive) to avoid vesicle aggregation by electrostatic repulsion (28).

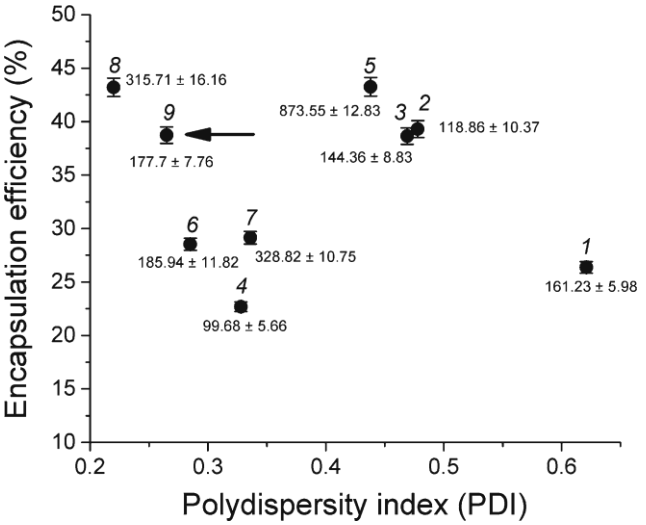


Fig. 1. Scatterplot of the formulations produced using a 2^{4-1} fractional experimental design and the effects of response variables: polydispersity index (PDI) and drug encapsulation efficiency (%). The arrow points the best liposomal formulation. Formulation run numbers and the mean size (nm) of liposomes are indicated above each point

Table I shows the results obtained in the design study. It was observed that only the mean size was significantly affected by PC and Chol concentrations ($p<0.05$), where the PC had the main statistically significant negative effect, and the higher level of PC (46.91 mM) decreased the mean size of the liposomes. The second-order interactions between the PC and CH concentration values had a positive effect, meaning that the main mean size was slightly enhanced by raising the levels of the two factors together. The results are shown in Table II.

With regard to the hydrophilic drug EE%, previous studies have reported values at approximately 14 to 23% as described by Wieber and colleagues (29), when encapsulating a

Table I. Experimental Design and Physicochemical Properties of Glutamine-Loaded Liposomes

Runs	PC (mM)	Chol (mM)	SA (mM)	Gln (mM)	pH	Size (nm)	PDI	ζ (mV)	EE (%)
A. Two-level 2^{4-1} fractional experimental design									
1	15.63	4.42	0	27.37	7.49	161.23±5.98	0.621±0.00	0.01±0.07	26.37±0.53
2	46.91	4.42	0	54.74	7.43	118.86±10.37	0.478±0.03	−14.73±1.19	39.30±0.79
3	15.63	13.26	0	54.74	7.49	144.36±8.83	0.469±0.04	1.94±0.14	38.66±0.77
4	46.91	13.26	0	27.37	7.54	99.68±5.66	0.328±0.01	5.73±0.30	22.68±0.45
5	15.63	4.42	8.38	54.74	7.58	873.55±12.83	0.438±0.01	31.96±1.35	43.25±0.87
6	46.91	4.42	8.38	27.37	7.62	185.94±11.82	0.285±0.02	33.73±1.58	28.53±0.57
7	15.63	13.26	8.38	27.37	7.65	328.82±10.75	0.336±0.01	31.40±1.21	29.14±0.58
8	46.91	13.26	8.38	54.74	7.68	315.71±16.16	0.220±0.01	33.20±1.25	43.20±0.86
9 (cp)	31.27	8.84	4.19	41.05	7.54	177.7±7.76	0.265±0.01	32.73±0.63	38.74±0.78
B. Two-level 2^2 full experimental design									
1	31.27	8.84	4.19	41.05	7.74	165.66±3.09	0.297±0.01	39.50±1.91	44.67±0.26
2	31.27	13.26	4.19	41.05	7.76	130.36±3.42	0.307±0.01	36.30±0.10	32.91±0.34
3	46.91	8.84	4.19	41.05	7.75	85.51±2.80	0.294±0.00	32. 93±1.01	7.35±1.00
4	46.91	13.26	4.19	41.05	7.75	96.16±1.23	0.274±0.01	36.90±1.50	28.29±0.07
5 (cp)	39.09	11.05	4.19	41.05	7.69	114.65±1.82	0.300±0.00	36.30±1.38	39.49±0.74

PC phosphatidylcholine, Chol cholesterol, SA stearylamine, Gln glutamine, PDI polydispersity index, ζ surface charge, EE encapsulation efficiency

Table II. ANOVA Table for the Full Experimental Design

Factors	Sums of square	Degrees of freedom	Mean square	F	p value
(1) PC (mM)[a]	3268.98	1	3268.98	122.87	0.008041
(2) Chol (mM)	151.90	1	151.90	5.71	0.139429
1 by 2[a]	527.85	1	527.85	19.84	0.046887
Error	133.13	1	133.13	5.00	0.154750
Total	53.21	2	26.60		

PC phosphatidylcholine, Chol cholesterol
[a] Significant response

decapeptide with a concentration varying from 0.25 to 0.75 mg/ml. Xu and colleagues (2012) also demonstrated a low encapsulation efficiency for hydrophilic compounds, such as the drug tenofovir (Mw 287.2113). The authors varied the lipid concentrations and observed that lowering the amount of lipids promoted low drug encapsulation, while very high lipid concentrations (152.9 mM) showed an EE% of 9 to 45% using a drug concentration of 0.5, 1, 2.5, and 6.9 mg/ml. Importantly, a high amount of some lipids, particularly stearylamine, in liposome formulations could be toxic for cells (30). Our results corroborate with previous work in this field, in which we also obtained low encapsulation efficiency. However, in contrast to other studies that used a low drug concentration, we varied the glutamine concentration from 4 to 8 mg/ml, thereby obtaining a maximum encapsulation efficiency of 44%, which is a significant result.

On the basis of the results obtained in the two-level 2^2 full experimental design, specifically related to EE%, the central point (run 5 and EE% of 39.49±0.74%) was selected for the in vivo experiments, which had the lowest size (114.65 ±1.82 nm) and an acceptable PDI (0.300±0.00). After 45 days, in suspension form under low temperature (4°C), the formulation presented a mean size of 180±4.90 nm (PDI=0.30± 0.01).

Determination of Glutamine Content into Liposomes

In our study, as the glutamine was encapsulated into liposomes, which contained lipids, it was necessary to develop an efficient extraction method in parallel to an HPLC method, which would be able to quantify the glutamine without lipid interference, at a wavelength ranging from 190 to 210 nm (31). Thus, an extraction method based on the two-phase liquid-liquid system was first obtained to separate the aqueous and organic phases of the liposomes, which contained glutamine and lipids, respectively. Samples from the aqueous phase were withdrawn and analyzed using HPLC according to the parameters previously described. The chromatograms of glutamine, glutamine-loaded liposomes, and unloaded liposomes are shown in Fig. 2a, b. The standard curve of glutamine was plotted with nine concentrations and Gln peak areas allowing a following regression linear equation: $A=16348.56\times[Gln_{\mu g/ml}]-19853.12$; $r^2=0.99514$.

As observed, free glutamine had a retention time of approximately 3.80 min, and the same retention time was observed in the glutamine-loaded liposome chromatogram. Compared to the unloaded liposomes, no peak was observed at this retention time (3.8 min), and any peak related to lipids suggested an adequate separation of glutamine, which enabled its quantification of liposome formulations.

Amino acid analysis by HPLC presents limitations that are specifically related to sensitive and selective detection, in addition to a wide range of wavelengths varying from 205 to 230 nm (32). For this reason, studies related to the development of an adequate HPLC method, aimed to analyze glutamine in different systems, were widely found in the literature. Snowden and

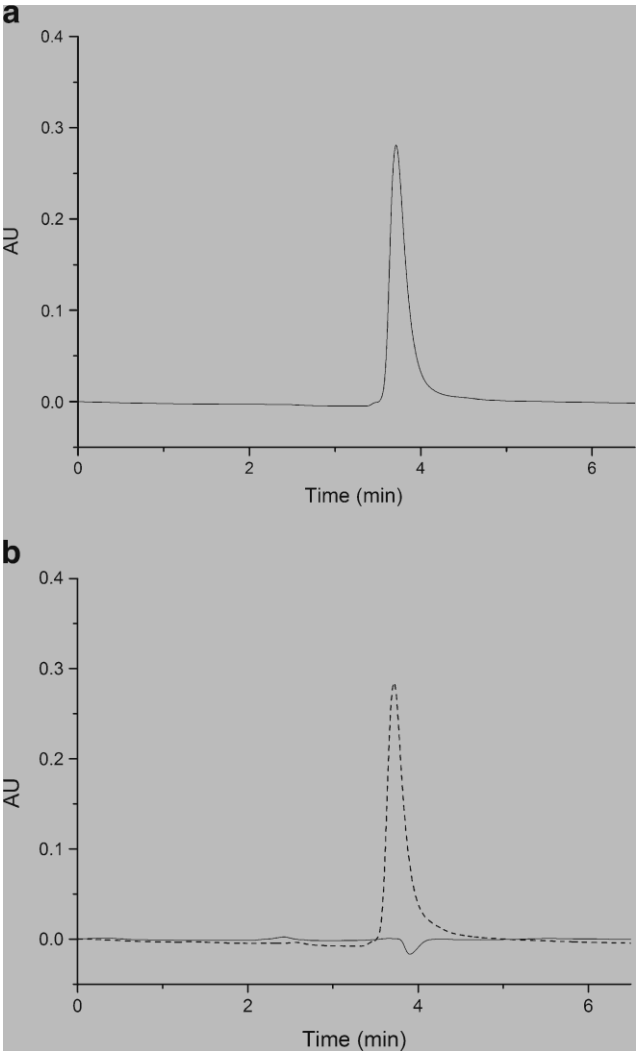


Fig. 2. Chromatographic detection of free and nanoencapsulated glutamine. Glutamine in a solvent mixture of H_2O:MeOH with a retention time of 3.8 min (a). Comparison between glutamine-loaded liposomes (broken line) and unloaded liposomes (solid line) (b)

co-workers (33) described a HPLC method using 214 nm as an ideal wavelength to quantify glutamine and N-acetylglutamine in an aqueous solution and liquid nutritional products. Another method was the one recently described by Chorilli et al. (34). They published a different method to analyze amino acids using ion exchange chromatography followed by post-column derivatization. Using this method, they were able to detect glutamine outside the usual wavelength, at 530 nm and at a retention time of 10 min. The extraction and quantification methods were developed, as previously described, once the methods described in the literature were not able to quantify glutamine in the liposomal form.

Thus, the extraction method was efficient and the HPLC developed method was used to determine the glutamine encapsulated into liposomes consisting of soya phosphatidylcholine, cholesterol, and stearylamine.

Neutrophil Viability Assay

Several studies have been performed to indicate the effectiveness of glutamine in increasing the immunity of rats immunosuppressed by intense and prolonged exercise. In studies developed by Lagranha et al. (26,35), they demonstrated that a single bout of exercise induced the apoptosis of rat neutrophils and oral glutamine supplementation (1 g/kg) prevented this effect, by promoting an increase in neutrophil phagocytosis and oxidative capacity from both exercised and rested rats.

Despite the efficacy related to neutrophil activation, glutamine at high concentrations can promote nephrotoxicity, particularly in diabetic patients (18,19). Thus, the use of glutamine encapsulated into nanostructured delivery systems, such as conventional liposomes, could decrease the dose as well as the toxicity, once conventional liposomes are able to target the encapsulated compound directly to neutrophils. This study describes for the first time the analysis of neutrophil viability in rats after the administration of glutamine-loaded conventional liposomes. Our results showed that all rat groups investigated presented a high percentage of intact plasma membrane as observed in Fig. 3, once the animals were considered healthy, which means they did not present a metabolic disorder, such as diabetes, and were not subjected to intense exercise or surgical procedures.

Regarding unloaded liposomes, a high rate of neutrophil viability (87±2.7%) was observed compared to the control group. Because liposomes are formed by phospholipid bilayers, it has been reported that these vesicles are able to mimic the shape and size of pathogenic microorganisms (36) and consequently promote an increase in the immune response of animals (37). Thus, unloaded liposomes may be recognized as a foreign body and stimulate the immune response, explaining the increased value of neutrophils in the treated animals.

Peritoneal administration of glutamine-loaded conventional liposomes (Gln-L) and unloaded liposomes presented a viability of 94±0.2 and 87±2.7%, respectively. Those data demonstrate that Gln-L promoted an increase in neutrophil viability of 21 and 8.2% compared to the control and unloaded-liposomes groups (Fig. 3).

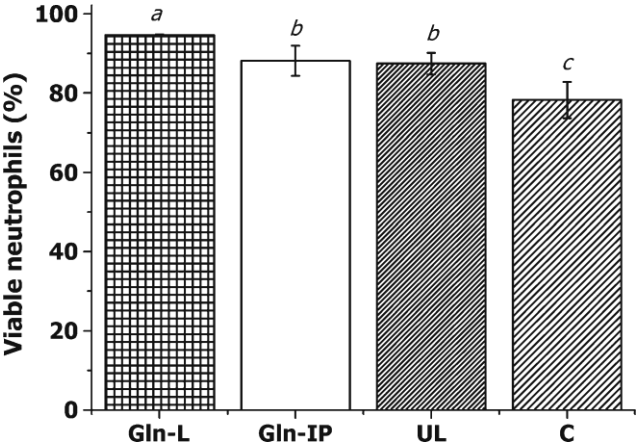


Fig. 3. Effect of glutamine on neutrophil membrane integrity. The percentage of viable neutrophils in response to different treatments via the intraperitoneal route. These values are presented as the mean ±SD of three experiments (n=3). Average data with different letters are significantly different using the Tukey test ($p<0.05$). Gln-L glutamine-loaded liposomes, Gln glutamine in solution, UL unloaded liposomes, C control group

Interestingly, when comparing the Gln-L with the Gln group, an increase in cell viability (7.3%) was observed, demonstrating a positive effect when glutamine was encapsulated into liposomes. This remarkable finding was related to nonviable neutrophils, once the Gln-L group presented the lowest percentage (5±0.5%), thereby confirming that this system did not cause cellular damage.

A comparison between free Gln administered using two different routes, oral and intraperitoneal, showed no statistical differences in the percentage of viable cells (87±6.4 and 88 ±3.8%, respectively) and nonviable cells (9±1.2 and 5±1.4%, respectively) (Fig. 4). This finding indicates that a reduced dosage of 17-fold via the intraperitoneal route achieved the same effect as a higher dosage via oral supplementation (10,14,35).

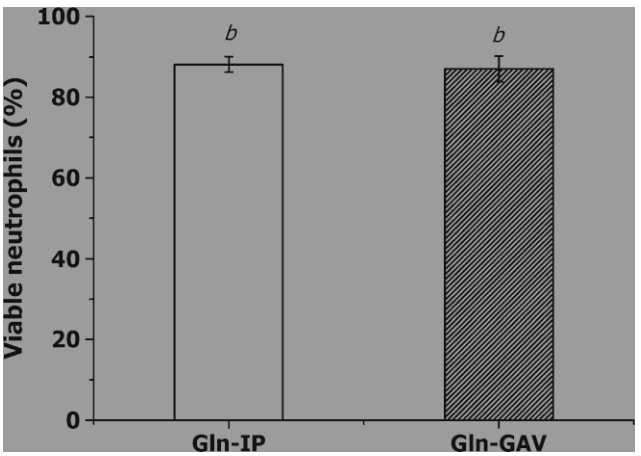


Fig. 4. Comparison between free glutamine in solution administered via the oral (Gln-GAV) and intraperitoneal (Gln-IP) routes. The values are presented as the mean±SD of three experiments (n=3). Average data with different letters are significantly different using the Tukey test ($p<0.05$)

CONCLUSIONS

Glutamine-loaded liposomes were obtained and presented desirable physicochemical characteristics, such as pH, mean size, polydispersity index, zeta potential, and drug encapsulation efficiency. The experimental factorial designs performed indicated the ideal concentration of the formulation constituents and ideal formulation.

This study also described for the first time a sufficient HPLC method for the quantification of glutamine encapsulated into liposomes. Glutamine-loaded liposomes administered via the i.p. route were able to increase neutrophil viability with very low nonviable cells in healthy animals. On the basis of these findings, this study encourages the use of formulations developed in further studies using immunosuppressed animals, which are aimed to increase immunological function.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the Brazilian National Council for Research (CNPq) for financial support (#484574/2011-6) and the Foundation for Science and Technology of Pernambuco (FACEPE). Thanks are also due to the Keizo Asami Immunopathology Laboratory (LIKA).

REFERENCES

1. Newsholme P, Lima MMR, Procopio J, Pithon-Curi TC, Doi SQ, Bazotte RB, et al. Glutamine and glutamate as vital metabolites. Braz J Med Biol Res. 2003;36:153–63.
2. Labow BI, Souba WW. Glutamine. World J Surg. 2000;24:1503–13. doi:10.1007/s002680010269.
3. Albino Junior W, Alberto C, Taliari K, Cancelliero KM. Suplementação com glutamina melhora as reservas de glicogênio de músculos de ratos tratados com dexametasona. Rev Bras Educ Fís Esp. 2004;18:283–91.
4. Cruzat VF, Petry ER, Tirapegui J. Glutamina : aspectos bioquímicos, metabólicos, moleculares e suplementação. Rev Bras Med Esporte. 2009;15:392–7.
5. Harris RC, Hoffman JR, Allsopp A, Routledge NBH. L-glutamine absorption is enhanced after ingestion of L-alanylglutamine compared with the free amino acid or wheat protein. Nutr Res. 2012;32:272–7. doi:10.1016/j.nutres.2012.02.003.
6. Gleeson M. Dosing and efficacy of glutamine supplementation in human exercise and sport training. J Nutr. 2008;138:2045S–9S.
7. Ardawi MSM, Newsholme EA. Glutamine metabolism in lymphocytes of the rat. Biochem J. 1983;212:835–42.
8. Curi TCP, Melo MP, Azevedo RB, Zorn TMT, Curi R. Glutamine utilization by rat neutrophils: presence of phosphate-dependent glutaminase . Am J Physiol Cell Physi ol. 1997;273:1124–9.
9. Pithon-Curi TC, Schumacher RI, Freitas JJS, Lagranha C, Newsholme P, Palanch AC, et al. Glutamine delays spontaneous apoptosis in neutrophils. Am J Physiol Cell Physiol. 2003;284:C1355–61. doi:10.1152/ajpcell.00224.2002.
10. Lagranha CJ, Senna SM, Lima TM, Silva EPP, Doi SQ, Curi R, et al. Beneficial effect of glutamine on exercise-induced apoptosis of rat neutrophils. Med Sci Sports Exerc. 2004;36:210–7. doi:10.1249/01.MSS.0000113490.98089.B1.
11. Curi R, Lagranha CJ, Doi SQ, Sellitti DF, Procopio J, Pithon-Curi TC, et al. Molecular mechanisms of glutamine action. J Cell Physiol. 2005;204:392–401. doi:10.1002/jcp.20339.
12. Lacey JM, Wilmore DW. Is glutamine a conditionally essential amino acid? Nutr Rev. 1990;48:297–309.
13. Furst P. New developments in glutamine delivery. J Nutr. 2001;131:2562–8.
14. Lagranha CJ, Levada-Pires AC, Sellitti DF, Procopio J, Curi R, Pithon-Curi TC. The effect of glutamine supplementation and physical exercise on neutrophil function. Amino Acids. 2008;34:337–46. doi:10.1007/s00726-007-0560-x.
15. Fan Y, Yu J, Kang W, Zhang Q. Effects of glutamine supplementation on patients undergoing abdominal surgery. Chin Med Sci J. 2009;24:55–9. doi:10.1016/S1001-9294(09)60060-2.
16. Wilmore DW. The effect of glutamine supplementation in patients following elective surgery and accidental injury. J Nutr. 2001;131:2543–9.
17. Fläring UB, Rooyackers OE, Wernerman J, Hammarqvist F. Glutamine attenuates post-traumatic glutathione depletion in human muscle. Clin Sci (Lond). 2003;104:275–82. doi:10.1042/CS20020198.
18. Alba-Loureiro TC, Ribeiro RF, Zorn TMT, Lagranha CJ. Effects of glutamine supplementation on kidney of diabetic rat. Amino Acids. 2010;38:1021–30. doi:10.1007/s00726-009-0310-3.
19. Galera SC, Fechine FV, Teixeira MJ, Coelho ZCB, Vasconcelos RC, Vasconcelos PRL. The safety of oral use of L-glutamine in middle-aged and elderly individuals. Nutrition. 2010;26:375–81. doi:10.1016/j.nut.2009.05.013.
20. D'Souza R, Powell-Tuck J. Glutamine supplements in the critically ill. J R Soc Med. 2004;97:425–7. doi:10.1258/jrsm.97.9.425.
21. O'Neil MJ. The Merck Index: an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals. 6th ed. New Jersey: Merck; 2006.
22. Brandl M, Gregoriadis G. Entrapment of haemoglobin into liposomes by the behaviour. Biochim Biophys Acta. 1994;1196:65–75.
23. Torchilin VP. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. Nat Rev Drug Discov. 2005;4:145–60. doi:10.1038/nrd1632.
24. Lira MCB, Ferraz MS, Silva DGVC, Cortes ME, Teixeira KI, Caetano NP, et al. Inclusion complex of usnic acid with β-cyclodextrin: characterization and nanoencapsulation into liposomes. J Incl Phenom Macrocycl Chem. 2009;64:215–24. doi:10.1007/s10847-009-9554-5.
25. Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. Can J Biochem Physiol. 1959;37:911–7.
26. Lagranha CJ, Alba-Loureiro TC, Martins EF, Pithon-Curi TC, Curi R. Neutrophil fatty acid composition: effect of a single session of exercise and glutamine supplementation. Amino Acids. 2008;35:243–5. doi:10.1007/s00726-007-0561-9.
27. Cadena PG, Pereira MA, Cordeiro RBS, Cavalcanti IMF, Barros Neto B, Pimentel MDCCB, et al. Nanoencapsulation of quercetin and resveratrol into elastic liposomes. Biochim Biophys Acta. 2013;1828:309–16. doi:10.1016/j.bbamem.2012.10.022.
28. Caddeo C, Teskac K, Sinico C, Kristl J. Effect of resveratrol incorporated in liposomes on proliferation and UV-B protection of cells. Int J Pharm . 2008 ; 363 : 183 – 91 . doi: 10. 1016 / j.ijpharm.2008.07.024.
29. Wieber A, Selzer T, Kreuter J. Physico-chemical characterisation of cationic DOTAP liposomes as drug delivery system for a hydrophilic decapeptide before and after freeze-drying. Eur J Pharm Biopharm. 2012;80:358–67. doi:10.1016/j.ejpb.2011.11.008.
30. Mendonça EAM, Lira MCB, Rabello MM, Cavalcanti IMF, Galdino SL, Pitta IR, et al. Enhanced antiproliferative activity of the new anticancer candidate LPSF/AC04 in cyclodextrin inclusion complexes encapsulated into liposomes. AAPS PharmSciTech. 2012;13:1355–66. doi:10.1208/s12249-012-9853-9.
31. Hamilton JG, Comai K. Separation of neutral lipids and free fatty acids by high-performance liquid chromatography using low wavelength ultraviolet detection. J Lipid Res. 1984;25:1142–8.
32. Koller M, Eckert H. Derivatization of peptides for their determination by chromatographic methods. Anal Chim Acta. 1997;352:31–59.
33. Snowden MK, Baxter JH, Bergana MM, Reyzer I, Pound V. Stability of n-acetylglutamine and glutamine in aqueous solution and in a liquid nutritional product by an improved HPLC method. J Food Sci. 2002;67:384–9.
34. Chorilli M, Salgado HRN, Santo FDS, Silva LM. Validation of a HPLC method for determination of glutamine in food additives using post-column derivatization. AJAC. 2012;3: 113–7. doi:10.4236/ajac.2012.32016.
35. Lagranha CJ, Lima TM, Senna SM, Doi SQ, Curi R, Pithon-Curi TC. The effect of glutamine supplementation on the function of

neutrophils from exercised rats. Cell Biochem Funct. 2005;23:101–7. doi:10.1002/cbf.1192.

36. Szebeni J, Muggia F, Gabizon A, Barenholz Y. Activation of complement by therapeutic liposomes and other lipid excipient-based therapeutic products: prediction and prevention. Adv Drug Deliv Rev. 2011;63:1020–30. doi:10.1016/j.addr.2011.06.017.
37. Newsholme P. Why is L-glutamine metabolism important to cells of the immune system in health, postinjury, surgery or infection? J Nutr. 2001;131:2515–22.