

**UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**DICKSON CORREA CARVALHO**

**O SISTEMA NOCICEPTINA/ORPHANINA FQ – RECEPTOR NOP**  
**COMO UM MEDIADOR DA PROGRESSÃO DE SEPSE**

**CRICIÚMA, AGOSTO DE 2008.**

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

C331s Carvalho, Dickson Correa.  
O sistema nociceptina/orphanina FQ - receptor NOP  
como um mediador da progressão de sepse / Dickson  
Correa Carvalho; orientador: Felipe Dal Pizzol. – Criciúma:  
Ed. do autor, 2008.  
42f. : il. ; 30 cm.  
  
Dissertação (Mestrado) - Universidade do Extremo Sul  
Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da  
Saúde, 2008.  
1. Sepse. 2. Infecção. 3. Neuropeptídeos. I. Título.

Bibliotecária: Flávia Caroline Cardoso – CRB 14/840  
Biblioteca Central Prof. Eurico Back – UNESC

**DICKSON CORREA CARVALHO**

**O SISTEMA NOCICEPTINA/ORPHANINA FQ – RECEPTOR NOP  
COMO UM MEDIADOR DA PROGRESSÃO DE SEPSE**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof.<sup>a</sup> Dr. Felipe Dal Pizzol

**CRICIÚMA, AGOSTO DE 2008.**



UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC  
Pró-Reitoria de Pós-Graduação, Pesquisa e Extensão  
Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde  
**Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado)**  
Recomendado pela CAPES – Homologado pelo CNE – Portaria Nº 1.919 de 03.06.2005


---

## PARECER


Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado de Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado) reuniram-se para realizar a argüição da Dissertação de Mestrado apresentado pelo candidato **DICKSON CORREA DE CARVALHO**, sob o título “Papel do receptor nonceptina/orfanina no desenvolvimento de sepse” para obtenção do grau de **MESTRE EM CIÊNCIAS DA SAÚDE** do Curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC.

Após haver analisado o referido trabalho e argüido ao candidato, os membros são de parecer pela “**APROVAÇÃO**” da Dissertação, com conceito A.

Criciúma, SC, 31 de julho de 2008.

  
**Prof. Dr. Emilio Luiz Streck**  
Membro Relator

  
**Prof. Dr. Rafael Roesler**  
Membro Externo

  
**Prof. Dra Cristiane Ritter**  
Membro Interno

  
**Prof. Dr. Felipe Dal Pizzol**  
Orientador

  
**Prof. Dr. João Luciano de Quevedo**  
Coordenador do PPGCS

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus, que sempre me ampara no caminho para alcançar minhas metas.

O meu orientador Felipe, que além de brilhante conduzir este trabalho, sempre esteve a disposição em todos os momentos. Obrigado!

A minha colega Fabricia, pelo grande empenho e dedicação, que com sua paciência e sabedoria me ajudou na elaboração do manuscrito.

A todos os alunos de iniciação científica, técnicos de laboratórios, professores do PPGCS que neste período de alguma forma contribuíram para o meu crescimento profissional e para conclusão deste trabalho.

Muito obrigado.

## RESUMO

A sepse é uma síndrome inflamatória sistêmica decorrente de uma infecção que pode causar sérios danos a todos os órgãos do paciente, podendo levá-lo à morte. Dados epidemiológicos norte americanos estimam que 750.000 pacientes sejam acometidos a cada ano por sepse. A taxa de mortalidade varia de 20 a 60%, dependendo da severidade, sendo semelhante ao Brasil. Assim a compreensão da doença e o desenvolvimento de terapias alternativas eficazes são de extrema importância. Recentemente tem sido descrito o papel de neuropeptídeos contra parâmetros relacionados à fisiopatologia da sepse. Nociceptina/orfanina FQ (N/OFQ) é um heptadecapeptídeo que liga seletivamente e ativa um receptor do tipo opióide acoplado a proteína G, chamado receptor do peptídeo N/OFQ (NOP). Estudos sugerem que o sistema N/OFQ-NOP possui um importante papel na modulação de funções imunes das células. Portanto, o objetivo do presente estudo foi investigar os efeitos de N/OFQ e UFP-101, um antagonista seletivo do receptor NOP, na resposta inflamatória em ratos sujeitos ao modelo de sepse por ligação e perfuração cecal. Ratos Wistar machos, pesando de 300-350g foram sujeitos à CLP e tratados com N/OFQ (0.01 mg/mg) ou UFP-101 (0.03 mg/kg) subcutaneamente imediatamente após a cirurgia. Doze horas após, o sangue foi coletado por punção cardíaca e lavado broncoalveolar e lavado peritoneal foram isolados. Em uma série separada do experimento, a mortalidade dos animais foi avaliada, monitorando os ratos por 10 dias. Nossos achados mostram que UFP-101 modificou parâmetros relacionados à resposta inflamatória sistêmica por prevenir efetivamente a migração de células, disseminação bacteriana, por modular a liberação de citocinas pró-inflamatórias (TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ), e reduzir a mortalidade animal em um modelo clinicamente relevante de sepse. Por contraste, N/OFQ não mostrou nenhum sinal de melhora comparado com o grupo controle. Dessa forma, os resultados sugerem que UFP-101, mas não N/OFQ, pode diminuir efetivamente o processo inflamatório, pontuando para uma relação funcional entre o sistema N/OFQ- receptor NOP e a resposta inflamatória testada em modelo de sepse por CLP e sugerem que antagonistas do receptor NOP são alvos para testes como novas drogas inovadoras no tratamento de doenças inflamatórias disseminadas.

**Palavras chaves:** Sepse; Migração neutrófilos; Receptor UFP-101; nociceptina/orfanina FQ.

## ABSTRACT

Sepsis is a systemic inflammatory syndrome secondary to an infectious process that can progress to multiple organ failure and death. Epidemiological studies estimate that 750,000 cases of severe sepsis occur per year in the United States with mortality rates ranging between 20 and 60%, and these rates reflect the Brazilian reality. Thus, a better understanding of sepsis and the development of new therapeutic approaches are extremely important. Recently, the role of neuropeptides against parameters related to the sepsis pathophysiology has been described in different researches. Nociceptin/orphanin FQ (N/OFQ) is a heptadecapeptide that selectively binds to and activates an opioid-like receptor G-protein-coupled, named as N/OFQ peptide receptor (NOP). Studies suggested that the N/OFQ-NOP receptor system plays an important role in modulating immune cell functions. Therefore, the aim of this present study was to investigate the effects of N/OFQ and UFP-101, a selective NOP receptor antagonist, in the inflammatory response in rats subjected to a model of sepsis by cecal ligation and puncture (CLP). Male Wistar rats, weighing 300–350 g, were subjected to CLP and treated with N/OFQ (0.01 mg/kg) or UFP-101 (0.03 mg/kg) subcutaneously immediately after surgery. Twelve hours after surgery, blood was collected by cardiac puncture and bronchoalveolar (BAL) and peritoneal lavage were performed. In a separate series of experiments, animal mortality was evaluated monitoring CLP rats for 10 days. Our findings showed that UFP-101 modified parameters related to the systemic inflammatory response by effectively preventing cell migration, bacterial dissemination, and by modulating the release of pro-inflammatory cytokines (TNF $\alpha$  and IL-1 $\beta$ ), and reducing animal mortality in a clinically relevant model of sepsis. By contrast, N/OFQ (0.01 mg/kg, sc) did not show any sign of improvement compared with the control group. Taken together, these findings suggest that UFP-101, but not N/OFQ, could effectively ameliorate the inflammatory process. Our findings point to a functional relationship between the N/OFQ-NOP receptor system and the inflammatory response assessed in the CLP model of sepsis and suggest that NOP receptor antagonists are worthy of testing as innovative drugs for the treatment of disseminated inflammatory diseases.

**Key-words:** Sepsis; Neutrophil migration; NOP receptor; UFP-101; Nociceptin/orphanin FQ.



## LISTA DE ABREVIATURAS

AMPc – monofosfato adenilcíclico

CLP – ligação cecal e perfuração

IL-1 – interleucina 1

IL-6 – interleucina 6

IL-12 – interleucina 12

IL-15 – interleucina 15

IL-18 – interleucina 18

LPB – proteína ligadora de lipopolissacarídeo

LPS – lipopolissacarídeo

NFκB – fator nuclear kappa B

NMDA – n-metil-d-aspartato

N/OFQ – nociceptina/orfanina FQ

MODS – disfunção múltipla de órgão e sistemas

SIRS – síndrome da resposta inflamatória sistêmica

TLR2 – receptor toll like 2

TLR4 – receptor toll like 4

TNFα – fator de necrose tumoral α

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	8
1.1 Sepsis – Conceitos Gerais .....	8
1.2 Sepsis – Fisiopatologia .....	11
1.3 Sepsis – Modelo Animal.....	12
1.4 O Sistema Nociceptina/orfanina FQ (N/OFQ)-Receptor NOP .....	13
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	15
2.1 Objetivo Geral .....	15
2.2 Objetivos Específicos .....	15
<b>3 ARTIGO CIENTÍFICO: The Nociceptin/Orphanin FQ-NOP Receptor Antagonist Effects on an Animal Model of Sepsis</b> .....	16
<b>4 DISCUSSÃO GERAL</b> .....	35
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	38

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Sepses – Conceitos Gerais

A incidência da sepsis tem aumentado desde os anos 30 (Parker et al., 1983; Martin et al., 2003) e todas as recentes evidências sugerem que este aumento persiste nos últimos anos. As razões para este fato são várias: aumento do uso de procedimentos invasivos, uso amplo de imunossuppressores e de agentes citotóxicos, maior sobrevivência de pacientes crônicos e maior número de infecções por organismos multirresistentes (Martin et al., 2003).

Até o início desta década, vários termos e definições imprecisas eram utilizados nos casos de sepsis, o que dificultava a identificação do quadro real e até dificultava a instauração precoce de terapia. Em 1992, realizou-se uma conferência de consenso para melhor definir os termos utilizados e relacioná-los com a fisiopatologia e a gravidade dos quadros inflamatórios secundários à infecção (tabela 1).

A resposta do hospedeiro é tão importante quanto o sítio de infecção e o agente causador da sepsis (Hotchkiss & Karl, 2003). O pulmão é o sítio de infecção mais freqüente, seguido por abdômen e trato urinário, mas em 20-30% dos pacientes o sítio primário não é determinado. Pacientes com infecções presumidas ou condições inflamatórias graves não causadas por infecção (ex. pancreatite), apresentam alterações bioquímicas, fisiológicas, taxas de disfunção orgânica e

mortalidade similares, o que vem suportar o argumento de que a resposta do hospedeiro é o maior determinante de sua evolução clínica.

**Tabela 1:** Definições de Sepse

Infecção	Fenômeno microbiológico caracterizado por uma resposta inflamatória sistêmica à presença de microrganismos ou a invasão de um tecido, normalmente estéril, por estes microrganismos.
Bacteremia	Presença de bactérias vivas no sangue
Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica (SIRS)	Resposta inflamatória sistêmica a uma variedade de agressões clínicas severas, que se manifesta por duas ou mais destas condições: <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Temperatura corporal &gt; 38°C ou &lt; 36°C;</li> <li>2. Freqüência cardíaca &gt; 90 batidas por minuto;</li> <li>3. Freqüência respiratória &gt; 20 inspirações por minuto ou PaCO<sub>2</sub> &lt; 32mmHg;</li> <li>4. Contagem de glóbulos brancos &gt;12000/cumm, &lt; 4000/cumm ou &gt;10% das formas imaturas</li> </ol>
Sepse	Síndrome da resposta inflamatória sistêmica associada à infecção.
Sepse Grave	Sepse associada à disfunção de órgãos, hipoperfusão ou hipotensão. Hipoperfusão e anormalidades de perfusão podem incluir, mas não estão limitadas a acidose láctica, oligúria ou alteração aguda do estado mental.
Choque Séptico	Sepse com hipotensão e anormalidades de perfusão, apesar de infusão adequada de fluído. As anormalidades incluem mas não estão limitadas a acidose láctica, oligúria ou alteração aguda do estado mental. Pacientes que recebem agentes vasopressores ou inotrópicos podem não ser hipotensivos no momento em que se medem essas anormalidades.
Hipotensão induzida por sepse	Pressão sistólica sangüínea < 90mmHg ou uma redução de > 40 mmHg da linha de base na ausência de outras causas para hipotensão.
Disfunção Múltipla de Órgãos e Sistemas (MODS)	Presença de alteração na função de órgãos em um paciente com enfermidade aguda de maneira tal, que a homeostase não possa ser mantida sem intervenção.

Fonte: CONSENSUS CONFERENCE COMMITTEE, (1992).

Apesar dos consideráveis avanços, a sepse continua sendo a principal causa de mortalidade em UTI (Barriere & Lowry, 1995). A sua incidência aumentou

de 82,7 casos por 100.000 habitantes em 1979 para 240,4 por 100.000 em 2000 (Martin et al., 2003). A mortalidade hospitalar varia de 28 a 60% de acordo com a gravidade - sepse, sepse grave ou choque séptico (Horyert et al., 1999; Angus et al., 2001; Alberti et al., 2002; Annane et al., 2004; Silva et al., 2004).

No Brasil, a incidência de sepse é de aproximadamente 200.000 casos por ano, com uma mortalidade entre 35 e 45% para sepse grave, e entre 52 e 65% para choque séptico (Silva et al., 2004; Sales et al., 2006). A ocorrência de falência orgânica segue um padrão comum: a disfunção pulmonar ocorre quase sempre e precocemente, persiste durante o choque, que também ocorre precocemente, e se resolve precocemente ou é fatal; sérias anormalidades da função hepática, coagulação e neurológicas tendem a ocorrer horas a dias depois do início da sepse e persistem por tempo indeterminado. O número de falências orgânicas, além da gravidade destas, afeta o prognóstico do paciente, pois cada órgão adicional em falência acrescenta 15-20% na taxa de mortalidade (American College of Chest Physicians, 1992). Portanto, o tratamento da falência orgânica é essencial, mas, por enquanto se baseia em medidas de suporte, como ventilação mecânica, reposição volêmica generosa, drogas vasopressoras, suporte nutricional, sedação, diálise entre outras.

Apesar da importância da sepse na mortalidade global em UTI, grande parte do tratamento empregado é meramente de suporte. Drogas antimicrobianas são necessárias, mas não suficientes para o tratamento da sepse, e paradoxalmente podem precipitar alterações sépticas pela liberação de produtos microbianos. Pacientes que não recebem prontamente antibioticoterapia apropriada têm uma mortalidade aumentada em 10-15 %. Um melhor entendimento da sua fisiopatologia através de trabalhos experimentais pode fornecer dados preliminares e novos

protocolos experimentais de tratamento, para serem posteriormente validados em ensaios clínicos e empregados na prática médica (Fink & Heard, 1990; Vicent et al., 2006; Rabuel & Mebazza, 2006).

## **1.2 Sepsis- Fisiopatologia**

Após interação da bactéria (ou outro microrganismo) com a célula do hospedeiro, inicia-se uma série de eventos com o objetivo de deter o processo infeccioso. Componentes da parede celular das bactérias, como por exemplo, lipopolissacarídeo (LPS), em bactérias gram negativas que interagem com a proteína ligadora do LPS (LPB) nas células do hospedeiro e o aderem ao CD14, uma proteína ancorada no lado de fora da membrana plasmática, a qual por estar no espaço extracelular, pode induzir ativação celular sem um co-receptor para traduzir o sinal através da membrana (Ulevitch & Tobias, 1999; Fink & Evans, 2002; Cohen, 2002; Bochud & Calandra, 2003).

Inúmeras investigações levaram a identificação do receptor toll like 4 (TLR4) como co-receptor para LPS. TLR4 são proteínas transmembrana possuindo componentes extracelulares e intracelulares (Bouchud & Calandra, 2003), apresentando um domínio intracelular homólogo com o receptor de interleucina 1 (IL-1) e interleucina 18 (IL-18). Proteínas adaptadoras facilitam a ligação com a quinase associada ao receptor da IL-1, o que induz o fator 6 associado ao receptor do fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), levando a translocação nuclear do fator nuclear kappa B (NF $\kappa$ B) e ultimamente a ativação de genes promotores de citocinas (Cohen, 2002; Bouchu, 2003). Embora este modelo seja baseado no LPS ativando

TLR4, um processo similar, mas não idêntico é envolvido na ativação do receptor toll like 2 (TLR2) por bactérias gram positivas.

Seguindo este processo de interação entre bactéria e células do hospedeiro há uma coordenada e sistêmica reação inflamatória. Os monócitos liberam muitos mediadores inflamatórios, especialmente IL-1, interleucina 6 (IL-6) e TNF $\alpha$ , mas, além disso, uma variedade de outras citocinas, incluindo interleucina 12 (IL-12), interleucina 15 (IL-15) e IL-18 (Cohen, 2002). Estes mediadores por sua vez, ativam um segundo nível de moléculas, incluindo outras citocinas, mediadores lipídicos, espécies reativas de oxigênio, assim como super-regulação de moléculas de adesão que promovem a migração de células inflamatórias (polimorfonucleares) para diversos tecidos (Reinscheid et al., 1995; Cohen, 2002). Todos estes mediadores podem induzir alterações profundas na fisiologia normal da vasculatura e órgãos-alvo. Apesar de alguns mediadores serem mais importantes que outros, provavelmente sua ação conjunta é responsável pela patogênese da sepse.

### **1.3 Sepse- Modelo Animal**

Estudos de sepse em humanos são difíceis devido à severidade da doença, a necessidade de intervenções terapêuticas imediatas e a heterogeneidade dos pacientes. Assim, modelos animais têm sido usados extensivamente para explorar a patogênese e gerar dados pré-clínicos de intervenções terapêuticas.

Para estas propostas, deve-se utilizar um modelo animal que reproduza a vasodilatação, hipotensão, aumento do débito cardíaco, resposta ao tratamento e mortalidade vistos em pacientes sépticos. Tem-se utilizado para isto modelo de

sepse abdominal, sepse cutânea, sepse induzida pela administração de LPS ou TNF $\alpha$ . Porém os modelos que induzem peritonite são mais amplamente usados. A peritonite pode ser induzida por inoculação direta de bactérias ou de conteúdo fecal na cavidade peritoneal. Entretanto, o modelo mais aceito na literatura e que parece simular mais adequadamente o quadro clínico de sepse, é o modelo de ligação e perfuração cecal (CLP). CLP se baseia na ligação do ceco logo abaixo da válvula ileo-cecal (mantendo desta maneira o trânsito intestinal), perfuração do ceco com tamanho padronizado e liberação de conteúdo fecal para a cavidade peritoneal, conforme classicamente descrito por Wichterman et al. (1980).

Desta maneira, além da peritonite induz-se isquemia mesentérica, simulando as grandes síndromes clínicas de sepse abdominal (p.ex. apendicite, isquemia mesentérica). Recentemente este modelo foi modificado para melhor simular as características clínicas dos pacientes com sepse abdominal, introduzindo desta maneira a ressuscitação volêmica e emprego de antibióticos de amplo espectro (Hollenberg et al., 2001).

#### **1.4 O Sistema Nociceptina/orfanina FQ (N/OFQ) – Receptor NOP**

A N/OFQ é um peptídeo composto por 17 aminoácidos e que difere dos outros agonistas dos receptores opióides por não possuir um resíduo de tirosina na porção N-terminal, que é requerido para a atividade agonista dos receptores  $\mu$ ,  $\delta$  e  $\kappa$ . (Reinscheid et al., 1996).



O receptor NOP foi descoberto em 1994 através de seqüências de oligonucleotídeos homólogos aos receptores opióides, com os quais tem 60 % de homologia. Isto pode explicar porque o receptor NOP ativa os mesmos mecanismos intracelulares de transdução de sinal dos receptores opióides (Calo et al., 2000). O receptor NOP é amplamente expresso no sistema nervoso central, entretanto tem sido descrito em outros tipos celulares, incluindo células do sistema imune (Halford et al., 1995) apresentando, portanto, funções fora do sistema nervoso central.

Dentre estas funções, para o estudo em questão chama atenção os efeitos da ativação do receptor NOP no sistema cardiovascular e imune. A injeção endovenosa de N/OFQ induz bradicardia e hipotensão (Champion et al., 1997). A administração intracerebroventricular de N/OFQ produz os mesmos efeitos cardiovasculares da injeção periférica (Kapusta et al., 1999).

A ativação do receptor NOP leva a vasodilatação da microcirculação através da liberação de histamina a partir de mastócitos (Brookes et al., 2007). Apesar disto não há descrição na literatura da participação do receptor NOP no desenvolvimento de sepse.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Determinar se o sistema N/OFQ-NOP tem papel no desenvolvimento de sepse em modelo animal de CLP.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- Determinar o efeito de agonista e antagonista do sistema N/OFQ-NOP na mortalidade em um modelo animal de sepse;

- Determinar o efeito de agonista e antagonista do sistema N/OFQ-NOP na migração de neutrófilos em um modelo animal de sepse;

-- Determinar o efeito de agonista e antagonista do sistema N/OFQ-NOP na disseminação de bactérias;

- Determinar o efeito de agonista e antagonista do sistema N/OFQ-NOP no perfil de citocinas em um modelo animal de sepse.

### **3 ARTIGO CIENTÍFICO**

## **THE NOCICEPTIN/ORPHANIN FQ-NOP RECEPTOR ANTAGONIST EFFECTS ON AN ANIMAL MODEL OF SEPSIS**

Dickson Carvalho, Fabricia Petronilho, Francieli Vuolo, Roberta Albino Machado,  
Larissa Constantino, Remo Guerrini, Girolamo Calo, Elaine Cristina Gavioli, Emílio  
Luiz Streck, Felipe Dal-Pizzol.

Publicado no Periódico Intensive Care Medicine

# The nociceptin/orphanin FQ – NOP receptor antagonist effects on an animal model of sepsis

Dickson Carvalho<sup>1</sup>, Fabricia Petronilho<sup>1</sup>; Francieli Guolo<sup>1</sup>; Roberta Albino Machado<sup>1</sup>; Larissa Constantino<sup>1</sup>; Remo Guerrini<sup>2</sup>; Girolamo Calo<sup>3</sup>; Elaine Cristina Gavioli<sup>4</sup>; Emílio Luiz Streck<sup>1</sup>; Felipe Dal-Pizzol<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Fisiopatologia Experimental, Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, SC, Brazil

<sup>2</sup> Department of Pharmaceutical Science and Biotechnology Center, University of Ferrara, Ferrara, Italy;

<sup>3</sup> Department of Experimental and Clinical Medicine, Section of Pharmacology and National Institute of Neuroscience, University of Ferrara, Ferrara, Italy

<sup>4</sup> Laboratório de Neurociências, Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, SC, Brazil

**Address for reprints:** Felipe Dal-Pizzol. Laboratório de Fisiopatologia Experimental, Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, SC, Brazil. Avenida Universitária, 1105, 88806-000. phone: 55 48 4312539, fax: 55 48 431 2750, e-mail:piz@unesc.net.

## **Abstract**

*Objective:* The aim of this study was investigate the effects of nociceptin/orphanin FQ (N/OFQ) and ([Nphe<sup>1</sup>,Arg<sup>14</sup>,Lys<sup>15</sup>]N/OFQ-NH<sub>2</sub>) (UFP-101), the endogenous N/OFQ peptide receptor (NOP) ligand and a selective NOP antagonist, respectively, in the inflammatory response after cecal ligation and puncture (CLP) model of sepsis in rats. *Design:* Prospective, controlled experiment. *Setting:* Animal basic science laboratory. *Subjects:* Male Wistar rats, weighing 300–350 g. *Interventions:* Rats subjected to CLP were treated with N/OFQ (0.001, 0.01 or 0.1 mg/kg) or UFP-101 (0.03, 0.03 or 0.3 mg/kg) subcutaneously administered immediately after surgery. *Measurements and Main Results:* Twelve hours after surgery, blood was collected by cardiac puncture and bronchoalveolar (BAL) and peritoneal lavage were performed. In a separate set of experiments mortality was evaluated monitoring CLP rats for 10 days. Our findings showed that UFP-101 (0.03 mg/kg, sc, but not 0.003 mg/kg) modified parameters related to the systemic inflammatory response by effectively preventing cells migration, bacterial dissemination, and by modulating the release of pro-inflammatory cytokines and chemokines, and reducing animal mortality in a clinically relevant model of sepsis. By contrast, N/OFQ (0.1 mg/kg, sc) increased mortality in the CLP model. *Conclusions:* Our findings point to a functional relationship between the N/OFQ-NOP receptor system and inflammatory response in the CLP model of sepsis and suggest that NOP receptor antagonists are worthy of testing as innovative drugs for the treatment of sepsis.

**Key-words:** Sepsis. Neutrophil migration. NOP receptor. UFP-101. Nociceptin/orphanin FQ

---

## Introduction

Sepsis describes a host inability to limit bacterial spread during an ongoing infection, consequently developing a systemic inflammatory response and in some cases, multiple organ failure. During the onset of infection, a complex cascade of events is initiated after the invasion of the host by pathogenic microorganisms [1]. In this context, the leukocytes display a crucial role in orchestrating the host defense. These cells, mainly polymorphonuclear leukocytes (neutrophils; PMNs), migrate to an infectious site and are able to kill microorganisms by releasing bactericidal agents like reactive oxygen and nitrogen species and cytokines [2,3].

Nociceptin/orphanin FQ (N/OFQ) is a heptadecapeptide that selectively binds to and activates an opioid-like receptor named as N/OFQ peptide receptor (NOP). NOP is a G-protein-coupled receptor, structurally and functionally related to the classical opioid receptors [4, 5]. The N/OFQ-NOP receptor system modulates a variety of biological functions such as hypotension, bradycardia [6], diuresis [7], inhibition of gastrointestinal [8] and airway [9] motility, and/or some reflexes such as coughing [10] and the micturition [11]. NOP receptors were identified in human monocytes and lymphocytes [12,13], mRNA encoding the N/OFQ precursor was identified in human lymphocytes [14] and peripheral blood neutrophils were able to release N/OFQ [15]. In addition, N/OFQ was reported to stimulate neutrophil and monocyte chemotaxis both *in vitro* and *in vivo* [16, 17], promote the release of lysozymes by neutrophils [17], and to modulate T cells activation [18]. Taken together, these reported data strongly suggest a functional relationship existing between the N/OFQ-NOP receptor system and the immune system.

Considering that impairment of immune defenses are observed in experimental models of sepsis and the N/OFQ-NOP receptor system seems to play an important role in the modulation of the immune system, the main aim of the present study was to investigate the effects N/OFQ and UFP-101 ([Nphe<sup>1</sup>,Arg<sup>14</sup>,Lys<sup>15</sup>]N/OFQ-NH<sub>2</sub>) in rats subjected to a model of sepsis. To this aim, sepsis was induced by cecal ligation and puncture (CLP). Immediately after this procedure rats were systemically treated with N/OFQ, the endogenous ligand of the NOP receptor, or UFP-101, a selective NOP receptor antagonist [19,20] and migration of inflammatory cells, bacterial dissemination in peritoneal

exudates and blood, and plasma levels of pro-inflammatory cytokines (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-10) and chemokine (MCP-1) as well as animal mortality were evaluated.

---

## Materials and methods

*Animals.* Male Wistar rats weighing 300–350 g obtained from Universidade do Extremo Sul Catarinense breeding colony were housed individually under standard conditions (12-h light/dark cycles with room temperature of 22–24°C). All studies were performed in accordance with National Institutes of Health guidelines and with the approval of the Ethics Committee from Universidade do Extremo Sul Catarinense.

*Drugs.* N/OFQ and UFP-101 were synthesized and purified at the University of Ferrara by the group of Dr. R. Guerrini as previously described [21]. Drugs were freshly solubilized in saline solution (NaCl 0.9 %) before each experiment.

*Surgery and drug treatments.* Rats were subjected to cecal ligation and puncture (CLP) as previously described [22]. Briefly, rats were anesthetized with ketamine (80 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg) intraperitoneally and the cecum was exposed, ligated and punctured once with a 14-gauge needle. Afterwards the cecum was repositioned in the abdomen and the peritoneal wall was closed. Sham-operated animals underwent identical laparotomy without cecal puncture or ligation. All animals received 10 ml of saline subcutaneously immediately after the surgery, and antibiotics as previously described [22]. To perform mortality analyses animals (n=15 per group) were divided into eight groups to perform mortality experiments: (1) sham operated; (2) CLP; (3) CLP + N/OFQ (0.001 mg/kg); (4) CLP + N/OFQ (0.01 mg/kg); (5) CLP + N/OFQ (0.1 mg/kg); (6) CLP + UFP-101 (0.003 mg/kg); (7) CLP + UFP-101 (0.03 mg/kg) and (8) CLP + UFP-101 (0.3 mg/kg), subcutaneously administered immediately after surgery. Mortality was evaluated monitoring CLP rats for 10 days. To perform biochemical analyses animals were divided into six groups (n=5 animals per group): (1) sham operated; (2) CLP; (3) CLP + N/OFQ (0.01 mg/kg); (4) CLP + N/OFQ (0.1 mg/kg); (5) CLP + UFP-

101 (0.003 mg/kg) and (6) CLP + UFP-101 (0.03 mg/kg), using, to each treatment, doses that presented or not a significant effect upon mortality. Twelve hours after surgery, all rats were anesthetized and killed by cardiac puncture. Blood was collected and bronchoalveolar (BAL) and peritoneal lavage were performed for posterior analyses.

The basis for the dose of N/OFQ was influenced by knowledge that systemic administration of N/OFQ (0.6, 3, 15 and 60 nmol/kg) caused hypotension, vasodilation, macromolecular leak and leukocyte adhesion, which contributes to pro-inflammatory effects [23]. The dose of UFP-101 employed in the present study was chosen take into account the  $pA_2$  of UFP-101 in monocytes [17] and also the ability of this compound in antagonizing the pro-inflammatory effects of N/OFQ in rats [23]

*Total cell count.* Cells in the BAL fluid (BALF) and peritoneal exudates were counted in a Neubauer chamber.

*Bacterial Counts in the Peritoneal Exudates and Blood.* Bacterial count was determined as previously described [24]. After peritoneal lavage with sterile PBS and blood collection, aliquots of serial dilutions of these samples were plated on Muller-Hinton agar dishes (Difco Laboratories) and incubated at 37°C; CFU were analyzed after 24 hrs. The results were expressed as CFU/ml.

*Cytokine and chemokine measurements.* The concentrations of tumor necrosis factor alpha (TNF $\alpha$ ), interleukin-1 $\beta$  (IL-1  $\beta$ ), IL-10 and MCP-1 in the blood were determined by a standard sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), employing commercial available kits (R&D Systems, Minneapolis, MN).

*Statistical Analysis.* Results are expressed as means  $\pm$  S.E.M and  $P < 0.05$  was considered significant. Differences between groups were determined by one-way analysis of variance followed by a Newman-Keuls test. The survival curves of the different treatment groups were compared by log-rank test. All statistical analyses were performed with SPSS 12.0 for Windows (SPSS, Chicago, IL).



---

## RESULTS

*Effects of N/OFQ and UFP-101 on surviving.* Figure 1A and B illustrates the survival curve of control and septic rats treated with N/OFQ and UFP-101 recorded over a 10-day period. Septic rats displayed a survival rate of around 30 % over a 10-days period of observation. The administration of UFP-101 (0.03 and 0.3 mg/kg, but not 0.003 mg/kg) significantly reduced mortality after the CLP procedure compared with CLP rats. In contrast, the higher N/OFQ dose (0.1mg/kg) increased mortality.

*Effects of N/OFQ and UFP-101 in total count cells in peritoneal exudates and BALF.* The effects of N/OFQ and UFP-101 on inflammatory cell recruitment into peritoneal cavity and on BALF were illustrated in Figure 2. Septic rats presented a significant increase in the number of cells in peritoneal and BALF exudates compared to sham. Both studied N/OFQ and UFP-101 doses prevented cells migration in peritoneal exudates compared with CLP and sham rats (Fig. 2A). In contrast, as showed in Figure 2B, only UFP-101 dose that improve mortality was able to prevent inflammatory infiltration in a site distant from the infectious focus as assessed in BALF inflammatory exudates. In contrast, the higher N/OFQ dose increases BALF inflammatory exudates.

*Effects of N/OFQ and UFP-101 in bacterial count in peritoneal fluid and blood.* Rats subjected to CLP procedure exhibited significant increase in the number of CFUs in peritoneal exudates (Figure 3A) and blood (Figure 3B), respectively, as compared to sham group. Treatment with UFP-101 (0.03 mg/kg), but not UFP-101 (0.003mg/kg) significantly prevented the increase of bacterial counts in peritoneal exudates and blood induced by the CLP procedure, while the systemic administration of N/OFQ (0.01 and 0.1mg/kg) did not modify CFUs assessed in peritoneal exudates and blood 12 h after CLP procedure.

*Effects of N/OFQ and UFP-101 on cytokine/chemokine response to sepsis.* The treatment with N/OFQ (0.01 and 0.1mg/kg) increased plasma concentrations of TNF $\alpha$  and IL-1 $\beta$ , but not IL-10, compared to septic rats. In contrast, the administration of UFP-101 (0.03mg/kg, but not 0.003mg/kg) reduced

plasma concentrations of TNF $\alpha$  and IL-1  $\beta$  compared to septic rats (Figure 4). N/OFQ at 0.1mg/kg increases plasma levels of MCP-1 in comparison to CLP animals (Figure 4), and the increase on MCP-1 levels secondary to sepsis was attenuated using UFP-101 (Figure 4).

---

## DISCUSSION

In this study we report on the effects of the selective NOP receptor antagonist, UFP-101, and the endogenous NOP receptor ligand N/OFQ in a well-established model for experimental sepsis. The acute treatment with UFP-101 modified parameters related to the systemic inflammatory response by effectively preventing cells migration to the peritoneal cavity and to a site distant from the infectious focus, and reducing the release of pro-inflammatory cytokines (TNF $\alpha$  and IL-1 $\beta$ ), thus improving rat mortality in a clinically relevant model of sepsis. By contrast, N/OFQ did not elicit any improvement compared to control group. In fact, N/OFQ increased mortality in septic rats, increased cells migration in the BALF, and pro-inflammatory cytokines and chemokines. Taken together, these findings suggest that the treatment with UFP-101, but not N/OFQ, could effectively interfere with the inflammatory process induced by CLP procedure.

During an infection, a complex cascade of events is initiated after the invasion of the host by pathogenic microorganisms [25]. In this context, leucocytes play a crucial role in host defense, migrating to the infectious site, and killing microorganisms. These cells release cytokines and chemokines, which enhance its recruitment and activation [2]. During the inflammatory response, leucocytes are recruited to the site of inflammation, and TNF $\alpha$  and IL-1 $\beta$  contribute to this process. Reported data have shown that N/OFQ promote inflammatory events by increasing TNF $\alpha$ . In fact, the systemic administration of N/OFQ enhanced TNF $\alpha$  transcripts in the spleen when injected prior to staphylococcal enterotoxin A challenge, while mice lacking the N/OFQ precursor gene showed diminished TNF $\alpha$  mRNA induction in the spleen following staphylococcal enterotoxin A stimulus [26]. Moreover, Waits and collaborators showed that TNF $\alpha$  secretion was increased in peripheral blood cells stimulated with N/OFQ [18]. Therefore, our findings are in agreement with reported data, which suggest that systemic treatment with N/OFQ increases plasma levels of TNF $\alpha$ . Furthermore, we demonstrated, for the first time, that NOP receptor antagonist prevented the increase in plasma

concentration of TNF $\alpha$  and IL-1 $\beta$  after sepsis induced by CLP. These effects of UFP-101 might be crucial to reducing inflammatory cells migration to the lung, thus directly contributing to prevent the development of the multiple organ dysfunction syndrome. Evidence suggests that inflammatory cells release chemotactic substances, such as interleukin 8 and MCP-1, which promote neutrophil migration to the tissue, activate neutrophils, and increase organ damage [27, 28, 29].

Considering that UFP-101 produced some anti-inflammatory effects in the CLP model and that these effects could be secondary to the inhibition of endogenous N/OFQ-NOP receptor signaling, we hypothesized that N/OFQ is been secreted peripherally under CLP experimental conditions. In this context, the mRNA encoding the N/OFQ precursor was identified in thymus, spleen and splenocytes, and also in human lymphocytes [14,30]. In addition, freshly isolated peripheral blood neutrophils were found to express and secrete N/OFQ following degranulation [15]. Recently an in vitro study in splenocytes had shown that a variety of stimuli relevant to inflammation, such as mitogens, pro-inflammatory cytokines (IL-1 $\beta$  and TNF $\alpha$ ), cyclic AMP analogues, glucocorticoids, can regulate endogenous N/OFQ secretion [31]. Taken together, these findings suggest that inflammatory cells can be the source of N/OFQ in the periphery. Supporting this view, a pilot study had shown that patients who died of sepsis displayed increased plasma concentration levels of N/OFQ compared to survivors [32].

It should be mentioned that the beneficial effects of UFP-101 are evident after a single drug injection administered immediately after the CLP surgery. UFP-101 is a peptide molecule that is rapidly degraded in the blood. Thus, it is proposed that the effects of UFP-101 on sepsis response are occurring in the first hours after surgery. The evidence coming from biochemical assays which were assessed 12 h after injection, and the fact that the reduction of mortality mainly occurred in the first and second day, corroborate this proposal. Therefore, these findings strongly suggest that the N/OFQ-NOP receptor system plays an important role in modulating the early phases of the septic process. During the onset of sepsis, a massive systemic inflammatory reaction takes place besides the decrease in the peripheral vasomotor tone, which leads to cardiovascular complications [33]. Besides the effects of N/OFQ-NOP receptor system on inflammation Giuliani and cols. demonstrated that the intravenous injection of N/OFQ elicits bradycardia and hypotension [6]. By contrast, the systemic injection of

UFP-101 did not modify blood pressure and heart rate but antagonized the effects of exogenous N/OFQ [23,35]. Thus, these findings suggest that N/OFQ (either given exogenously or endogenously released) could impair cardiovascular performance of septic rats, while UFP-101 could prevent the cardiovascular effects of endogenous N/OFQ possibly released during sepsis.

One limitation of our study is the lack of female animals in the studied groups. Gender differences have been reported after trauma and sepsis, with female patients have a significantly better prognosis, perhaps related to increased levels of anti-inflammatory mediators [35,36,37]. Experimental studies have demonstrated an improved cell-mediated immune response in females compared with males [38]. In female mice, after cecal ligation and puncture (CLP), an improved cell-mediated immune response resulted in a significantly improved ability to tolerate sepsis compared with males [39]. Thus, besides its importance, adding females in experimental groups we are generating a possible bias in the interpretation of our results and to avoid this we prefer, at this moment, study only male animals.

In summary, the main findings of the present work are the demonstration of a functional relationship existing between the N/OFQ-NOP receptor system and response induced by CLP. Our results suggest that UFP-101 could improve the septic response in rats subjected to the CLP model, since the acute administration of UFP-101 caused reduction of inflammatory cells in distant places of the infectious focus, and attenuated bacterial dissemination on peritoneal exudates and blood of septic rats. In contrast, N/OFQ did not modify these parameters. Further studies employing different NOP receptor antagonists and eventually comparing the phenotype of NOP receptor knockout mice in sepsis models are mandatory for firmly define the therapeutic potential of NOP receptor antagonists as innovative drugs for the treatment of disseminated inflammatory diseases, such as sepsis.

**Acknowledgement** Universidade do Extremo Sul Catarinense and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

---

## References

1. Alves-Filho JC, Benjamim C, Tavares-Murta BM, Cunha FQ (2005) Failure of neutrophil migration toward infectious focus in severe sepsis: a critical event for the outcome of this syndrome. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 100:223-226.
2. Alves-Filho JC, Freitas A, Russo M, Cunha FQ (2006) Toll-like receptor 4 signaling leads to neutrophil migration impairment in polymicrobial sepsis. *Crit Care Med* 34:461-470.
3. Wagner J., Roth RA (1999) Neutrophil migration during endotoxemia. *J of Leukoc Biol* 66: 10-24.
4. Meunier J, Mollereau C, Toll L, Suaudeau C, Moisand C, Alvinerie P, Butour J, Guillemot J, Ferrara P, Monsarrat B, Mazarguil H, Vassart G, Parmentier M and Costentin J (1995) Isolation and structure of the endogenous agonist of opioid receptor-like ORL1 receptor. *Nature* 377: 532-535.
5. Reinscheid RK, Nothacker HP, Bourson A, Ardati A, Henningsen RA, Bunzow JR, Grandy DK, Langen H, Monsma FJ, Civelli O (1995) Orphanin FQ: a neuropeptide that activates an opioidlike G protein-coupled receptor. *Science* 270: 792-794.
6. Giuliani S, Tramontana M, Lecci A, Maggi CA (1997) Effect of nociceptin on heart rate and blood pressure in anaesthetized rats. *Eur J Pharmacol* 27: 177-179.
7. Kapusta DR, Sezen SF, Chang JK, Lipton H, Kenigs VA (1997) Diuretic and antinatriuretic responses produced by the endogenous opioid-like peptide, nociceptin (orphanin FQ). *Life Sci* 60: 15-21.
8. Osinski MA, Bass P, Gaumnitz EA (1999) Peripheral and central actions of orphanin FQ (nociceptin) on murine colon. *Am J Physiol* 276:125-131.
9. Fischer A, Forssmann WG, Udem BJ (1998) Nociceptin-induced inhibition of tachykinergic neurotransmission in guinea pig bronchus. *J Pharmacol Exp Ther* 285:902-907.
10. McLeod RL, Parra LE, Mutter JC, Erickson CH, Carey GJ, Tulshian DB, Fawzi AB, Smith-Torhan A, Egan RW, Cuss FM, Hey JA (2001) Nociceptin inhibits cough in the guinea-pig by activation of ORL(1) receptors. *Br J Pharmacol* 132:1175-1178.
11. Giuliani S, Lecci A, Tramontana M, Maggi CA (1998) The inhibitory effect of nociceptin on the micturition reflex in anaesthetized rats. *Br J Pharmacol* 124:1566-1572.

12. Peluso J, Gaveriaux-Ruff C, Matthes HW, Filliol D, Kieffer BL (2001) Orphanin FQ/nociceptin binds to functionally coupled ORL1 receptors on human immune cell lines and alters peripheral blood mononuclear cell proliferation. *Brain Res Bull* 54: 655-660.
13. Peluso J, LaForge KS, Matthes HW, Kreek MJ, Kieffer BL, Gaveriaux-Ruff C (1998) Distribution of nociceptin/orphanin FQ receptor transcript in human central nervous system and immune cells. *J Neuroimmunol* 81: 184-192.
14. Arjomand J, Cole S, Evans CJ (2002) Novel orphanin FQ/nociceptin transcripts are expressed in human immune cells. *J Neuroimmunol* 130:100-108.
15. Fiset M, Gilbert C, Poubelle PE, Pouliot M (2003) Human neutrophils as a source of nociceptin: a novel link between pain and inflammation. *Biochem* 42:10498-10505.
16. Serhan CN, Fierro IM, Chiang N, Pouliot M (2001) Nociceptin stimulates neutrophil chemotaxis and recruitment: inhibition by aspirin-triggered-15-epi-lipoxin A<sub>4</sub><sup>1</sup>. *J Immunol* 166: 3650-3654.
17. Trombella S, Vergura R, Falzarano S, Gerrini R, Calo G, Spisani S (2005) Nociceptin/orphanin FQ stimulates human monocyte chemotaxis via NOP receptor activation. *Peptides* 26:1497-1502.
18. Waits PS, Purcell WM, Fulford AJ, McLeod JD (2004) Nociceptin/orphanin FQ modulates human T cell function in vitro. *J Neuroimmunol* 149:110-120.
19. Calo G, Rizzi A, Rizzi D, Bigoni R, Guerrini R, Marzola G, Marti M, McDonald J, Morari M, Lambert DG, Salvadori S, Regoli D (2002) [Nphe<sup>1</sup>,Arg<sup>14</sup>,Lys<sup>15</sup>]nociceptin-NH<sub>2</sub>, a novel potent and selective antagonist of the nociceptin/orphanin FQ receptor. *Br J Pharmacol* 136:303-11.
20. Calo G, Gerrini R, Rizzi A, Salvadori S, Burmeister M, Kapusta DR, Lambert DG, Regoli D (2005) UFP-101, a peptide antagonist selective for the nociceptin/orphanin FQ receptor. *CNS Drug Rev* 11: 97-112.
21. Guerrini R, Calo G, Rizzi A, Bianchi C, Lazarus LH, Salvadori S, Temussi PA, Regoli D (1997) Address and message sequences for the nociceptin receptor: a structure-activity study of nociceptin-(1-13)-peptide amide. *J Med Chem* 40 :1789-1793.
22. Ritter C, Andrades ME, Reinke A, Menna-Barreto S, Moreira JC, Dal-Pizzol F (2004) Treatment with N-acetylcysteine plus deferoxamine protects rats against oxidative stress and improves survival in sepsis. *Crit Care Med* 32:342–349.

23. Brookes ZL, Stedman EN, Guerrini RG, Lawton BK, Calo G, Lambert DG (2007) Proinflammatory and vasodilator effects of nociceptin/orphanin FQ in the rat mesenteric microcirculation are mediated by histamine. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 293:2977-2985.
24. Godshall CJ, Scott MJ, Peyton JC, Gardner SA, Cheadle WG (2002) Genetic background determines susceptibility during murine septic peritonitis. *J Surg Res* 102:45–49.
25. Medzhitov R, Janeway C Jr (2000) Innate immune recognition: mechanisms and pathways. *Immunol Rev* 173:89–97.
26. Goldfarb Y, Reinscheid RK, Kusnecov AW (2006) Orphanin FQ:nociceptin interactions with the immune system in vivo: Gene expression changes in lymphoid organs and regulation of the cytokine response to staphylococcal enterotoxin A. *J Neuroimmunol* 176:76-85.
27. Iseri SO, Sener G, Saglam B, Gedik N, Ercan F, Yegjen BC (2005) Oxytocin protects against sepsis-induced multiple organ damage: role of neutrophils. *J Surg Res* 126: 73–81.
28. Aldridge AJ (2002) Role of the neutrophil in septic shock and the adult respiratory distress syndrome. *Eur J Surg Res* 168:204–214
29. Abraham E (2003) Neutrophils and acute lung injury. *Crit Care Med* 31:195–199
30. Pampusch MS, Serie JR, Osinski MA, Seybold VS, Murtaugh MP, Brown DR (2000) Expression of nociceptin/OFQ receptor and prepro-nociceptin/OFQ in lymphoid tissues. *Peptides* 21: 1865-70.
31. Miller TR, Fulford AJ (2007) Regulation of nociceptin/orphaninFQ secretion by immune cells and functional modulation of interleukin-2. *Peptides* 28: 2243-2252.
32. Williams JP, Gold SJ, Young SP, Thompson JP, Lambert DG (2007) Plasma nociceptin concentration in SIRS. *Br J Anaest* 98: 290.
33. Vicent JL (1998) Cardiovascular alterations in septic shock. *J Antimicrob Chemother* 41 Suppl A: 9-15.
34. Hashiba E, Hirota K, Kudo T, Calo' G, Guerrini R, Matsuki A (2003) Effects of nociceptin/orphanin FQ receptor ligands on blood pressure, heart rate, and plasma catecholamine concentrations in guinea pigs. *Naunyn-Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 367:342-7.
35. Guillou PJ (1993) Biological variation in the development of sepsis after surgery or trauma. *Lancet* 342: 217–220.

36. Schorder J, Kahlke V, Staubach KH, Zabel P, Stuber F (1998) Gender differences in human sepsis. Arch Surg 133: 1200–1205.
37. Oberholzer A, Keel M, Zellweher R, Steckholzer U, Trentz O, Ertel W (2000) Incidence of septic complications and multiple organ failure in severely injured patients is sex specific. J Trauma 48: 932–937.
38. Wichmann MW, Zeilweger R, De Maso CM, Ayala A, Chaudry IH (1996) Enhanced immune responses in females, as opposed to decreased responses in males following hemorrhagic shock and resuscitation. Cytokine 8: 853–863.
- 39 – Wichmann MW, Zellweger R, De Maso CM, Chaudry IH (1997), Females in prooestrous state maintain splenic immune functions and tolerate sepsis better than males. Crit Care Med 25: 106–110.



## Figure Legends

**Figure 1. UFP-101 improves survival in “established” sepsis.** Survival was analyzed in Wistar rats subjected to CLP. N/OFQ (Figure 1A) or UFP-101 (Figure 1B) were administered immediately after sepsis induction (n=15 per group). The survival rates were determined daily up to 10 days after sepsis induction and treatment. Data are shown as the percentage of animals surviving.

**Figure 2. N/OFQ and UFP-101 induce cells failure migration to peritoneal cavity and BALF in septic rat induced by CLP.** Cells migration into the peritoneal cavity of sham, CLP and CLP + N/OFQ (0.01 and 0.1 mg/kg) and CLP + UFP-101 (0.003 and 0.03 mg/kg) group of rats (**A**), and in BALF (**B**). Assessment of cell migration into the peritoneal cavity and BALF was performed 12 hours after sepsis induction and treatments. Results are expressed as means  $\pm$  SD, n = 5 per group; (F = 230.5 to cells in the peritoneal cavity and F=216.3 to cells in the BALF) \*  $p < 0.05$  compared with sham group and \*\*  $p < 0.05$  compared with CLP group.

**Figure 3. The increase of bacterial count in peritoneal exudates (A) and blood (B) induced by CLP procedure was prevented by the treatment with UFP-101, but not N/OFQ.** Rats were subjected to sepsis by CLP and evaluated bacterial counts in peritoneal exudates and blood, which was evaluated 12 h after CLP surgery and treatments. Results are expressed as mean  $\pm$  SD; n=5 per group (F = 84.1 to bacterial count in peritoneal exudates and F=101.1 to cells in the BALF) \*  $p < 0.05$  compared with sham group and \*\*  $p < 0.05$  compared with CLP group.

**Figure 4. The effects of N/OFQ and UFP-101 treatment on plasma cytokines concentrations.** Rats were subjected to cecal ligation and puncture (CLP), and treated with N/OFQ and UFP-101. After 12 h plasma was recovered in order to determine tumor necrosis factor TNF $\alpha$ , interleukin IL-1 $\beta$ , IL-10 and MCP-1. Results are expressed as means  $\pm$  SD, n = 5 per group, (F = 33.9 to TNF $\alpha$ , F=86.1 to IL-1 $\beta$ , F=6.1 to IL-10 and F=54.4) \*  $P < 0.05$  compared with CLP group and \*\*  $P < 0.05$  compared with CLP + N/OFQ group.

Figure 1A

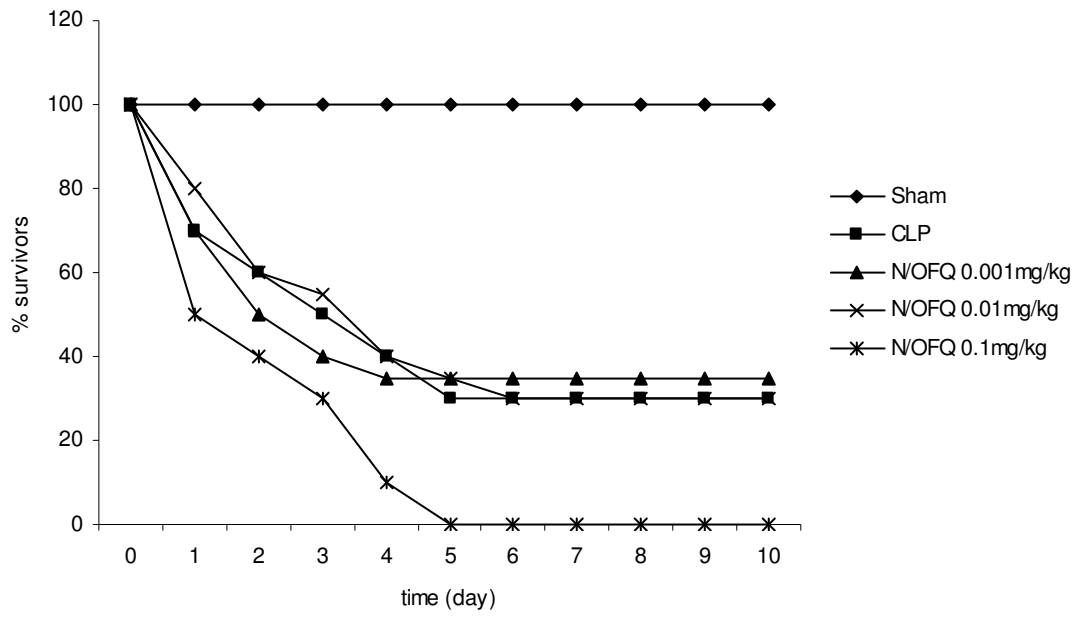


Figure 1B

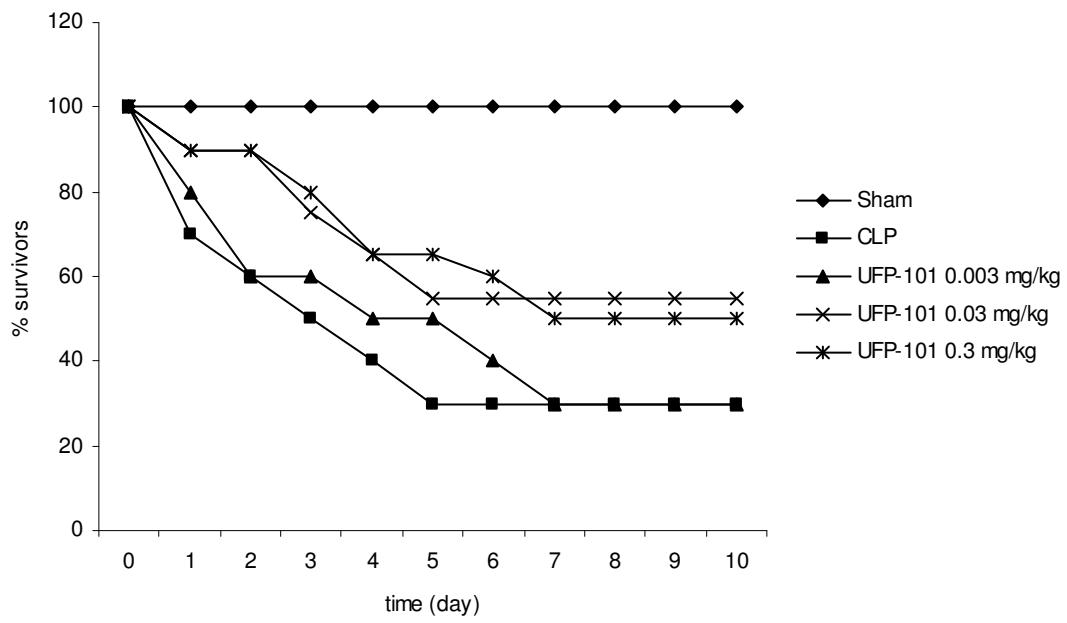


Figure 2A

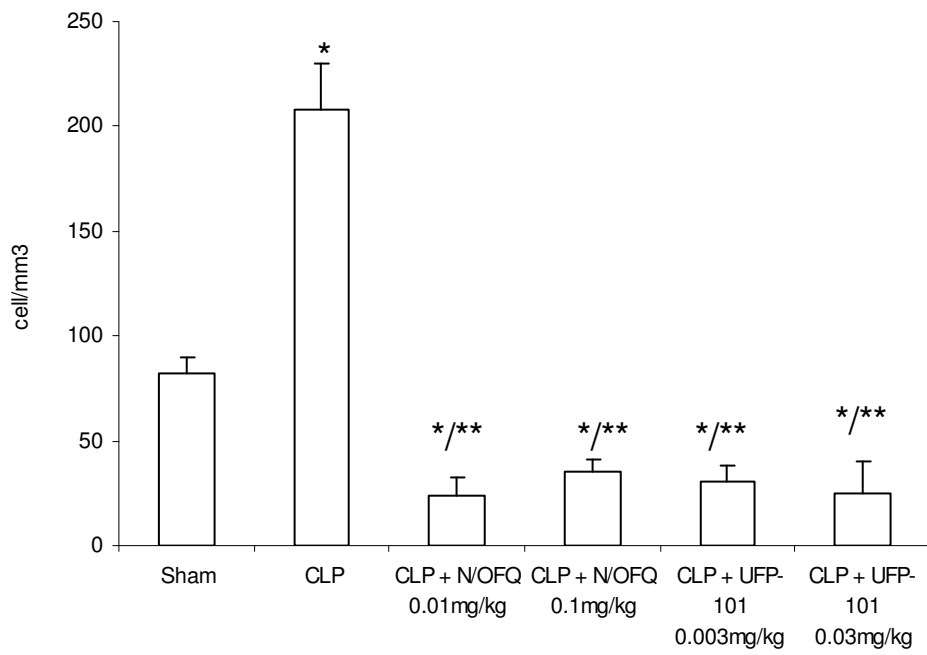


Figure 2B

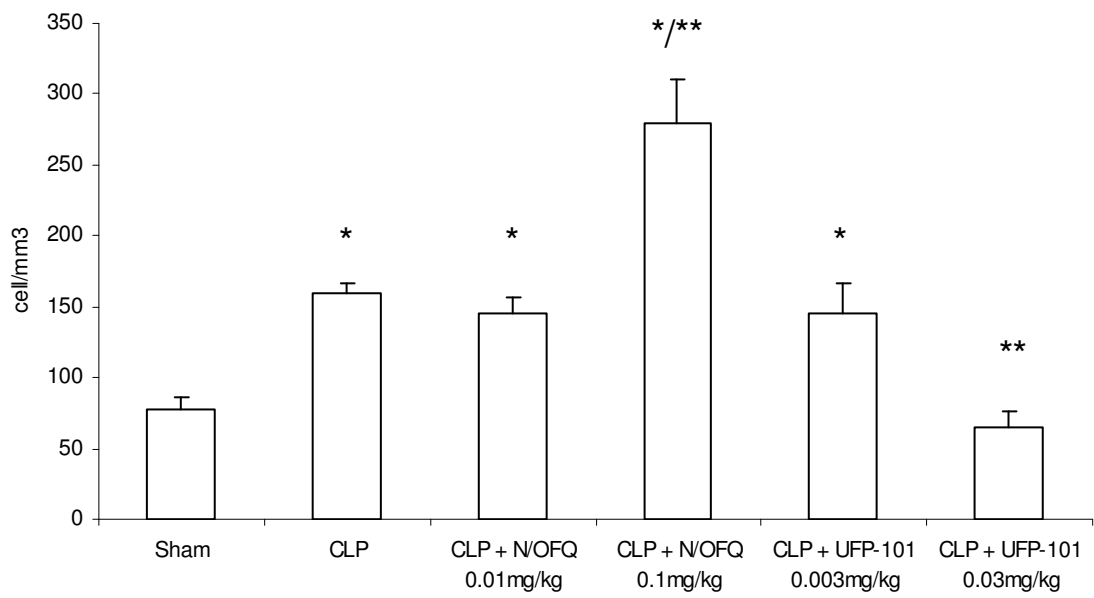


Figure 3A

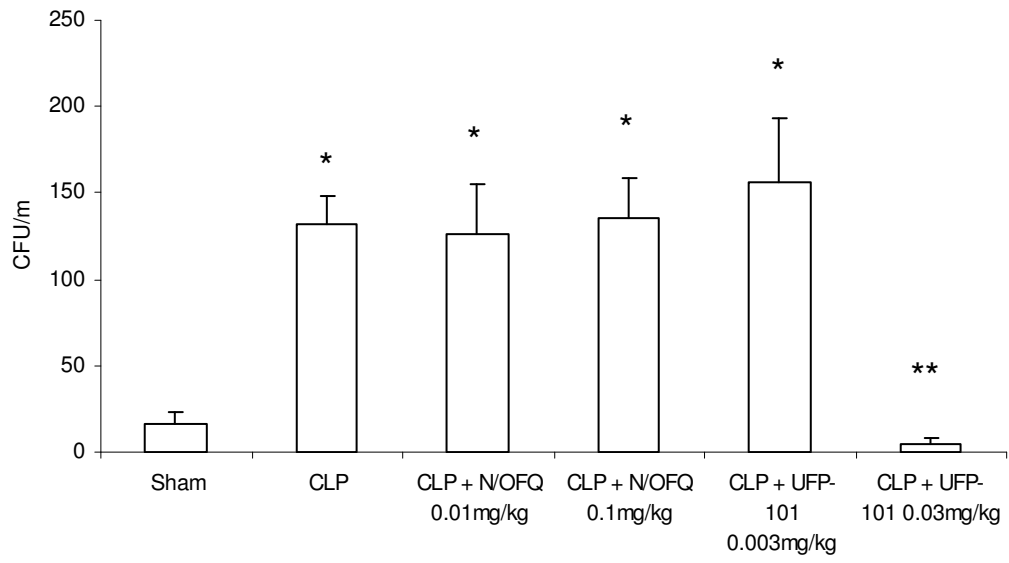


Figure 3B

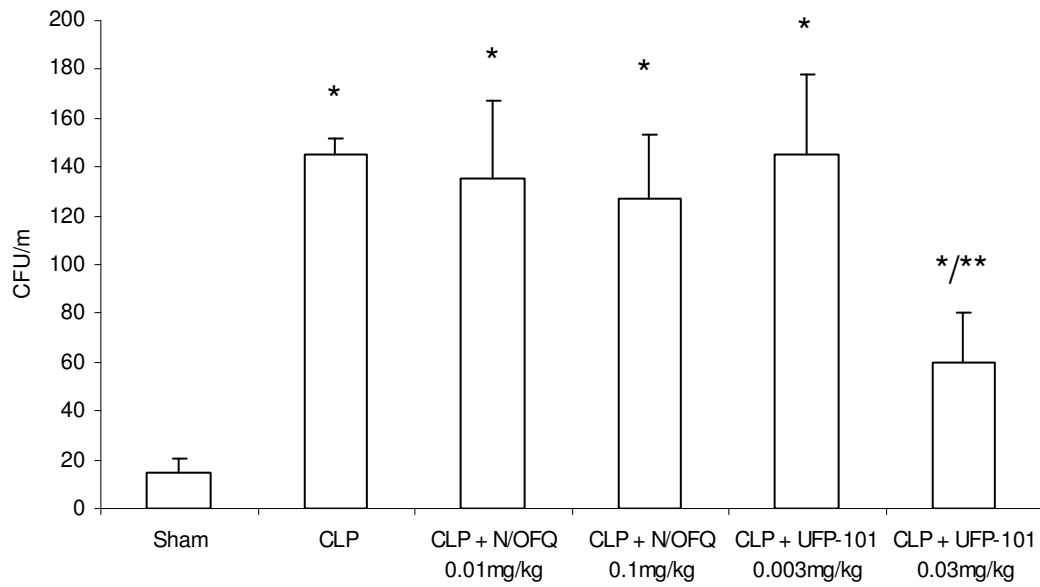
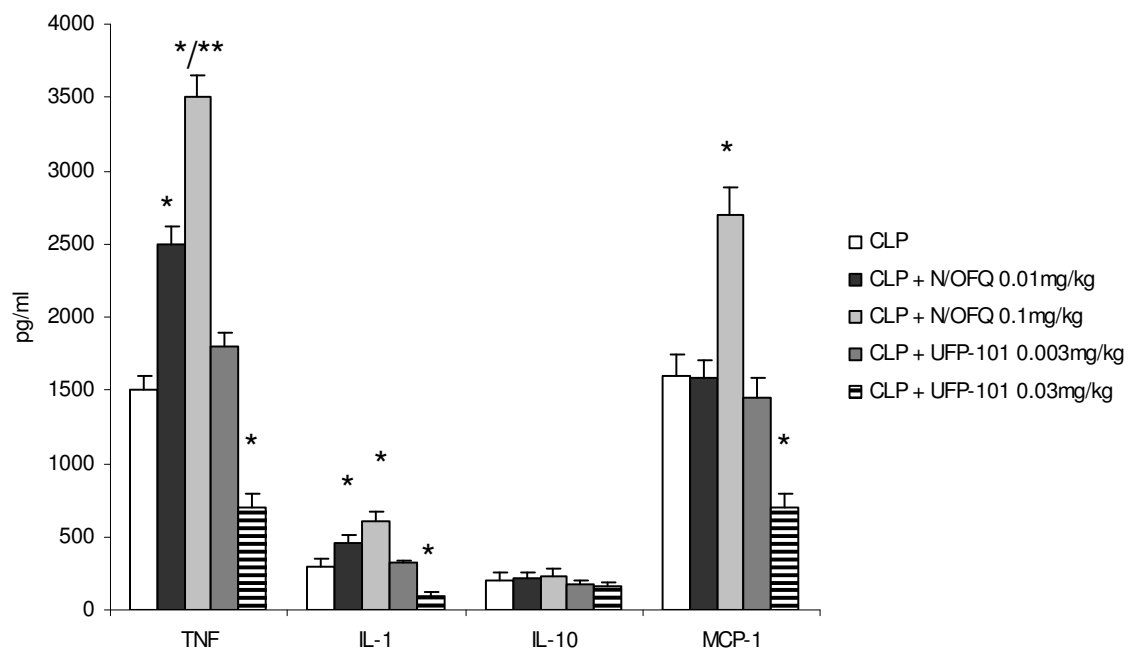


Figure 4



## 4 DISCUSSÃO GERAL

Neste trabalho determinamos que o antagonista do receptor NOP reduz mortalidade em modelo animal de sepse. Este efeito se deve, provavelmente, em parte a redução da migração de neutrófilos em sítios distantes da infecção, sem comprometer o adequado controle do foco infeccioso. Além disto, parece inibir a produção de citocinas pró-inflamatórias, sem interferir em citocinas anti-inflamatórias.

Classicamente a interação entre sistema nervoso e o sistema imune era vista restrita às alterações relacionadas ao eixo hipotálamo-hipófise-supra-renal mediadas pelas funções imunomoduladoras do cortisol. Esta noção vem se modificando nas últimas décadas, onde cada vez mais tem se entendido as complexas interações entre neurotransmissores, neuromoduladores e neuropeptídeos com o sistema imune. Por exemplo, uma recente via anti-inflamatória mediada pelo vago pela liberação de acetilcolina modula periféricamente a função de macrófagos apresentando um papel central no desenvolvimento de sepse em modelo animal (Wang et al., 2003).

Neste mesmo sentido, diferentes neuropeptídeos estão relacionados com a modulação do sistema imune na sepse. O peptídeo vasoativo intestinal e o polipeptídeo pituitário ativador de adenilato ciclase apresentam função anti-inflamatória, melhorando a sobrevivência em modelo animal de sepse (Gomariz et al., 2000; Martinez et al., 2002).

Por outro lado alguns neurotransmissores/neuropeptídeos podem apresentar função pro-inflamatória. Resultados não publicados de nosso grupo demonstram que a ativação do receptor de glutamato N-Metil-D-Aspartato (NMDA) exacerbam a inflamação pulmonar associada à sepse e o bloqueio deste receptor melhora sobrevida em modelo animal.

Demonstramos ainda, que o peptídeo liberador de gastrina também possui efeitos pro - inflamatórios, sendo que seu bloqueio reduz níveis de citocinas inflamatórias, óxido nítrico, melhorando a sobrevida em animais em modelo de sepse (Dal-Pizzol et al., 2006). Neste contexto, a ativação de receptores NOP parece exercer papel pro-inflamatório em nosso modelo, sendo que seu bloqueio é benéfico conforme os resultados apresentados nesta dissertação. Estes resultados em conjunto, podem sugerir que existam vias intracelulares comuns a estes neuropeptídeos, que quando moduladas interferem na resposta imune.

Um possível alvo relacionado a estes efeitos é o monofosfato adenilcíclico (AMPc), uma vez que a grande maioria dos receptores destes neuropeptídeos são acoplados a proteína G excitatória ou inibitória, e há relação importante entre AMPc e inflamação (Carlos et al., 2008). Além disto, parece importante o efeito destes neuropeptídeos em modular mediadores inflamatórios tardios da sepse (Chorny et al., 2008).

Algumas limitações do estudo devem ser observadas. Primeiro, os resultados são apresentados em um modelo animal de inflamação/sepse, não sendo confirmados em outras espécies de mamíferos ou outros modelos de inflamação/sepse. Segundo, não avaliamos curva dose-resposta de agonista ou antagonista do receptor NOP. Este tipo de avaliação poderia auxiliar em um melhor

entendimento da relação entre estes peptídeos e a resposta inflamatória da sepse. Terceiro, apesar de o antagonismo do receptor NOP melhorar a sobrevida, seu agonista não piora a mortalidade, isto pode parecer contraditório, mas talvez seja apenas reflexo da falta de curva dose-resposta em nosso estudo. Por último, os mecanismos associados aos efeitos da ativação do receptor NOP não foram explorados.

Em conclusão, os principais achados de nosso estudo demonstram que existe participação do receptor NOP na resposta inflamatória da sepse, predominantemente em sua fase pró-inflamatória, modulando a migração de células em sítios distantes do foco infeccioso, tendo relação com mortalidade nesta doença.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTI C; BRUN-BUISSON C; BURCHARDI H; MARTIN C; GOODMAN S; ARTIGAS A; SICIGNANO A; PALAZZO M; MORENO R; BOULMÉ R; LEPAGE E; LE GALL J. Epidemiology of sepsis and infection in ICU patients from an international multicentre cohort study. **International Care Medicine** 28: 108-121. 2002.

AMERICAN COLLEGE OF CHEST PHYSICIANS / SOCIETY OF CRITICAL CARE MEDICINE CONSENSUS CONFERENCE COMMITTEE. Definitions of sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. **Chest** 101: 1644-1655. 1992.

ANGUS DC; LINDE-ZWIRBLE WT; LIDICKER J; CLERMONT G; CARCILLO J; PINSKY MR. Epidemiology of severe sepsis in the United States: Analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. **Critical Care Medicine**, 29:1303–1310. 2001.

ANNANE D; AEGERTER P; JARS-GUINCESTRE MC; GUIDET B. Current epidemiology of septic shock the CUB-Reía Network. **American Journal of Respiratory And Critical Care Medicine** 168: 165–172. 2002.

BARRIERE SL; LOWRY SF. An overview of mortality risk prediction in sepsis. **Critical Care Medicine** 23: 376- 393. 1995.

BOCHUD PY; CALANDRA T. Science, medicine, and the future: Pathogenesis of sepsis: new concepts and implications for future treatment **Clinical Research** 326: 262-266. 2003.

BROOKES ZL; STEDMAN EN; GUERRINI R; LAWTON BK; CALO G; LAMBERT DG. Proinflammatory and vasodilator effects of nociceptin/orphanin FQ in the rat mesenteric microcirculation are mediated by histamine. **American Journal of Physiology: Heart and Circulatory Physiology** 293:2977-2985. 2007.

CALO G; GUERRINI R; RIZZI A; SALVADORI S; REGOLI D. Pharmacology of nociceptin and its receptor: a novel therapeutic target. **British Journal of Pharmacology**. 129:1261-1283. 2000.

CARLOS H; SEREZANI; MEGAN N; BALLINGER; DAVID M; ARONOFF; MARC PG. Cyclic AMP Master Regulator of Innate Immune. **American Journal Respiratory Cell Molecular Biology** 39: 127–132. 2008.

CHAMPION HC; KADOWITZ PJ. Tyr1-nociceptin, a novel nociceptin analog, decreases systemic arterial pressure by a naloxone-insensitive mechanism in the rat. **Biochemical and Biophysical Research Communications** 19: 309-312. 1997.

CHORNY A; DELGADO M. Neuropeptides rescue mice from lethal sepsis by down-regulating secretion of the late-acting inflammatory mediator high mobility group box 1. **American Journal of Pathology** 172: 1297-1307. 2008.

COHEN J. The immunopathogenesis of sepsis. **Nature** 420: 885-891. 2002.

DAL-PIZZOL F; DI LEONE LP; RITTER C; MARTINS MR; REINKE A; PENS  
GELAIN D; ZANOTTO-FILHO A; DE SOUZA LF; ANDRADES M; BARBEIRO DF;  
BERNARD EA; CAMMAROTA M; BEVILAQUA LR; SORIANO FG; CLÁUDIO J;  
MOREIRA F; ROESLER R; SCHWARTSMANN G. Gastrin-releasing peptide  
receptor antagonist effects on an animal model of sepsis. **American Journal of  
Respiratory and Critical Care Medicine**. 173:84-90. 2006.

FINK MP; EVANS TW. Mechanisms of organ dysfunction in critical illness: report  
from a Round Table Conference held in Brussels. **Intensive Care Medicine**  
28:369-375. 2002.

FINK MP; HEARD SO. Laboratory models of sepsis and septic shock. **The Journal  
of Surgical Research** 49: 186-196. 1990.

HOLLENBERG SM; DUMASIU A; EASINGTON C; COLILLA SA; NEUMANN A;  
PARRILLO JE; Characterization of a hyperdynamic murine model of resuscitated  
sepsis using echocardiography. **American Journal of and Respiratory And  
Critical Care Medicine** 164:891-895. 2001.

HOTCHKISS RS; KARL IE. The pathophysiology and treatment of sepsis. **New  
England Journal of Medicine** 348:138-150. 2003.

HOYERT DL; ARIAS E; SMITH BL; MURPHY SL; KOCHANNEK KD. Deaths final data from 1999. **National Vital Statistics Report CDC** 49: 8. 1999.

GOMARIZ R; LECETA J; MARTINEZ C; ABAD C; GANEA D; DELGADO M. Anti-inflammatory actions of VIP/PACAP. Role in endotoxemia. **Annals of the New York Academy of Sciences** 921:284-288. 2000.

KAPUSTA DR; KENIGS VA. Cardiovascular and renal responses produced by central orphanin FQ/nociceptin occur independent of renal nerves. **The American Journal of Physiology** 277: 987-995. 1999.

MARTINEZ C; ABAD C; DELGADO M; ARRANZ A; JUARRANZ MG; RODRIGUEZ-HENCHE N; BRABET P; LECETA J; GOMARIZ RP. Anti-inflammatory role in septic shock of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptor. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 22: 1053-1058. 2002.

MARTIN GS; MANINO DM; EATHON S; MOSS M. The Epidemiology of Sepsis in the United States from 1979 through 2000. **New England Journal of Medicine** 348:1546-1554. 2003.

PARKER MM; PARRILO LE. Septic shock: hemodynamics and pathogenesis. **Journal of the American Medical Association** 250: 3324-3332. 1983.

RABUEL C; MEBAZZA A. Septic shock: a heart story since the 1960's. **Intensive Care Medicine** 32: 799-807. 2006.

REINSCHEID RK; ARDATI A; MONSMA FJ JR; CIVELLI O. Structure-activity relationship studies on the novel neuropeptide orphanin FQ. **The Journal of Biological Chemistry** 271:14163-14168. 1996.

REINSCHEID RK; NOTHACKER HP; BOURSON A; ARDATI A; HENNINGSEN RA; BUNZOW JR; GRANDY DK; LANGEN H; MONSMA FJ; CIVELLI O. Orphanin FQ: a neuropeptide that activates an opioidlike G protein-coupled receptor. **Science** 270: 792-794. 1995.

SALES JR; DAVID CM; HATUM R; SOUZA PCSP; JAPIASSU A; PINHEIRO CTS; FRIEDMAN G; SILVA OB; DIAS MD; KOTERBA E; DIAS FS; PIRAS C. Sepsis Brasil: Estudo epidemiológico da sepse em unidade de Terapia Intensiva Brasileiras. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva** 18: 9 – 17. 2006.

SILVA E; PEDRO MDE A; SOGAYAR AC; MOHOVIC T; SILVA CL; JANISZEWSKI M; CAL RG; DE SOUSA EF; ABE TP; DE ANDRADE J; DE MATOS JD; REZENDE E; ASSUNÇÃO M; AVEZUM A; ROCHA PC; DE MATOS GF; BENTO AM; CORRÊA AD; VIEIRA PC; KNOBEL E. Brazilian Sepsis Epidemiological Study (BASES study). **Critical Care Medicine** 8: 251-260. 2004.

ULEVITCH RJ; TOBIAS PS. Recognition of gram-negative bacteria and endo-toxin by the innate immune system. **Current Opinion in Immunology** 11: 19-22. 1999.

VINCENT JL; ABRAHAN E. The Last 100 years of sepsis. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine** 173: 256–263. 2006.

WANG H; YU M; OCHANI M; AMELLA CA; TANOVIC M; SUSARLA S; LI JH; WANG H; YANG H; ULLOA L; AL-ABED Y; CZURA CJ; TRACEY KJ. Nicotinic acetylcholine receptor alpha7 subunit is an essential regulator of inflammation. **Nature** 23: 384-388. 2003.

WICHTERMAN KA, BAUE AE, CHAUDRY IH. Sepsis and septic shock--a review of laboratory models and a proposal. **The Journal of Surgical Research** 29:189-201. 1980.

# Livros Grátis

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

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)