

FERNANDO SPILLER

**Papel da hemopexina na patogênese da sepse e da alfa-1 glicoproteína
ácida na susceptibilidade de camundongos diabéticos a sepse**

Ribeirão Preto

2009

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

FERNANDO SPILLER

**Papel da hemopexina na patogênese da sepse e da alfa-1 glicoproteína ácida na
susceptibilidade de camundongos diabéticos a sepse**

Tese apresentada ao Departamento de Farmacologia da
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São
Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas

Área de Concentração: Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. Fernando de Queiroz Cunha

Ribeirão Preto

2009

FOLHA DE APROVAÇÃO

Fernando Spiller

Papel da hemopexina na patogênese da sepse e da alfa-1 glicoproteína ácida na susceptibilidade de camundongos diabéticos a sepse

Tese apresentada ao Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor. Área de concentração: Farmacologia.

Aprovado em:

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Fernando de Queiróz Cunha
FMRP- USP

Prof. Dr. Marcos Rossi
FMRP-USP

Profa. Dra. Ana Paula de Carvalho Panzeri Carlotti
UFMG

Prof. Dr. Felipe Dal Pizzol
FM-UNESC

Prof. Dr. Licio Augusto Velloso
FCM - UNICAMP

Trabalho realizado no Laboratório de Inflamação e Dor do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brasil e no Departamento de Biotecnologia Molecular da Universidade de Turin, Turin, Itália com auxílio financeiro da Fundação de Amparo à pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

DEDICATÓRIA

A minha Família que sempre me apoiou e incentivou nos momentos mais difíceis durante estes anos de minha ausência.

A todos que fazem ciência com um objetivo maior que não o próprio benefício.

AGRADECIMENTOS

A todos que contribuíram para execução deste trabalho e para o meu crescimento científico, intelectual e humano durante este período.

A Deus pela oportunidade de evoluir a cada dia e por ter me dado forças de chegar ao final de mais esta etapa.

A minha Família pelo apoio e compreensão durante este longo período de ausências e saudades.

A FAPESP pelo apoio financeiro.

Ao Prof. Dr. Fernando de Queiroz Cunha pela oportunidade de trabalhar em seu laboratório, pelos ensinamentos, cobranças e pela sua dedicação e comprometimento com os trabalhos que realizamos durante este período. Tenho certeza que o meu crescimento científico e intelectual durante esses anos deve-se principalmente aos seus ensinamentos.

Ao Prof. Dr. Lewis J. Greene pela sua dedicação, incentivo e participação direta para a execução deste trabalho e também pela sua contribuição para o meu crescimento acadêmico e científico.

Ao Prof. Dr. José César Rosa pelo apoio, idéias, participação e incentivo para execução deste trabalho.

A Prof. Dra. Emanuela Tolosano pela oportunidade de realizar um estágio em seu laboratório na cidade de Turin, Itália e pela sua fundamental contribuição para realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Emilio Hirsch pela oportunidade de trabalhar em seu laboratório (Turin, Itália), pelas idéias e revisões críticas deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Sergio Henrique Ferreira pelos ensinamentos e oportunidade de convivência com um dos cientistas mais renomados do Brasil e do mundo.

Ao meu amigo Fabrício pela sua contribuição imprescindível neste trabalho e amizade durante esses anos.

A Dani Carlos pela sua ajuda imprescindível nos experimentos com o modelo de Diabetes.

Ao meu amigo Silvio pela ajuda nos experimentos de PCR e confecção das figuras de fluorescência, amizade e companheirismo durante esses anos.

Ao meu amigo Zeca pela ajuda no desenho experimental, críticas e discussões científicas muito proveitosas durante este trabalho.

A minha amiga Fabíola pela ajuda nos experimentos e amizade durante esse período.

A Helen Julie pela ajuda e disponibilidade incondicional em tudo que precisei para a realização deste trabalho.

A minha amiga Giu pelas dosagens de citocinas por ELISA companheirismo e amizade nesses anos.

Ao Valter pela ajuda com as leituras no citómetro de fluxo e convivência durante este período.

Ao meu amigo Romualdo pela amizade e pelas discussões científicas e filosóficas a respeito do trabalho.

Ao meu amigo Marcelo Montenegro pelas discussões científicas, amizade, sinceridade e companheirismo durante esses anos.

A minha amiga Andressa pela amizade, convivência e ajuda nos experimentos.

A minha amiga Paula pela ajuda nos experimentos e amizade sincera.

Ao meu amigo Thiago Cunha pelas críticas, sugestões e discussões científicas e filosóficas durante esses anos.

Ao meu amigo Toni pelo apoio, amizade e companheirismo.

Ao meu amigo Guilherme pela convivência, apoio e amizade neste período.

A Elisa pelo seu apoio por um grande período desse trabalho, sem o seu incentivo com certeza não teria iniciado mais esta etapa em minha vida.

Ao apoio técnico do Laboratório de Inflamação e Dor e também do Departamento de Farmacologia, sem o trabalho de vocês com certeza o nosso trabalho não seria possível. Kátia, Diva, Giuliana, Serginho, Ieda e Fabíola.

Aos funcionários da secretaria do Departamento de Farmacologia da FMRP-USP: Sônia Maria Stefanelli, Fátima Helena Petean e José Valdik Ramin pela dedicação, amizade e competência nas resoluções administrativas.

A Dra. Eleni Tamburus e Tadeu Vieira pelo apoio e ajuda em tudo que precisei neste período.

Aos bioteristas, Julio Siqueira, Maria Inês C. Nemoto e Eliana B. C. de Barros pelo zeloso cuidado com os animais e carrinho durante este período.

A todos os docentes do Departamento de Farmacologia da FMRP-USP pelos ensinamentos e ajuda na minha formação científica durante esses anos. É um privilégio poder ter convivido e aprendido muitas coisas com vocês.

Aos amigos do Departamento de Farmacologia da FMRP-USP pelo convívio, amizade e discussões filosóficas.

A todos os funcionários do Departamento de Farmacologia da FMRP-USP.

Aos colegas do Laboratório da Prof. Emanuela e do Prof. Emilio do Departamento de Biotecnologia Molecular, Universidade de Turin, Turin, Itália.

Aos colegas do Laboratório de Inflamação e Dor pela ajuda com os experimentos, idéias e críticas revisões deste trabalho. Também pela amizade, paciência e convivência durante este período. Larissa, Jhimmy, Renata, Luiz Fernando, Mani, Jozi, Dani Nascimento, Fabiane, Nana, Maria, Mari, Thiago Garlet, Francine, Silvia, Adriana, Paulo, Fernanda, Livia, Maria do Carmo, Vanessa, Sabrina, Camila, Rafael, Felipe, Ana Tereza, Dani Secco e outros que devo ter esquecido (sorry).

Finalmente, a minha namorada Livia pelo seu apoio, incentivo e principalmente paciência e compreensão nesta parte final do trabalho. Te amo muito linda e espero que possamos estar sempre juntos.

LISTA DE ABREVIATURAS

AGP - alfa-1-glicoproteína ácida
APPs – proteínas de fase aguda
ATCC - *American Type Culture Collection*,
BASES - *Brazilian Sepsis Epidemiological Study*
BSA – albumina bovina sérica
C5a - quinto fragmento do complemento ativado
UFC - unidades formadoras de colônia
CLP – ligação e perfuração do ceco
CO - monóxido de carbono
CRP - *C-reactive protein*
CXCR – *CXC chemokine Receptor*
DEPC - Dietil-pirocarbonato
DMSO - dimetil sulfóxido
EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético
EPM - erro padrão médio
ESAM - *endothelial cell-selective adhesion molecule*
ESL-1 - *E-selectin ligand-1*
FITC - fluoresceína
fMLP - *N-formyl-L-methionyl-L-leucyl-pnenylalanine*
FO - falso-operados
GCs - guanilato ciclase solúvel
GMPc - 3'5' guanosina monofosfato cíclica
GPCR - receptores acoplados à proteína G
GRK - quinase de receptor acoplado à proteína G
H₂O₂ - peróxido de hidrogênio
He - hemin
HO - heme oxigenase
H-TAB - brometo de amônio hexadeciltrimetil
Hx - hemopexina
i.p. - intraperitoneal

i.v. - intravenosa
ICAM - *intercellular adhesion molecule*
IL - interleucina
iNOS - óxido nítrico sintase induzida
JAM - *junctional adhesion molecule*
KC - *keratinocyte-derived chemokine*
LDH - desidrogenase láctica
LFA1 - *lymphocyte function-associated antigen*
LPS - lipopolissacarídeo
LRP - *lipoprotein receptor-related protein*
LTA - ácido lipoteicóico
LTB4 - leucotrieno B4
MIP-2 - *macrophage-inflammatory protein-2*
MPO - mieloperoxidase
MyD88 - myeloid differentiation factor 88
NETs - *neutrophil extracellular traps*
NFκB - fator de transcrição kappa B
NO - óxido nítrico
NOD - *nucleotide-binding and oligomerization domain*
OPD - o-fenilenediaminadihidrocloroto
PAF - fator ativador de plaquetas
PAMPs - padrões moleculares associados a patógenos
PBS - tampão fosfato salina
PE - ficoeritrina
PECAM - *platelet endothelial cell adhesion molecule*
PercP - proteína clorofil de peridina
PI3K - *phosphoinositide-3 kinase*
PIP3 - *phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate*
PRRs - receptores de reconhecimento padrão
PSGL-1 - *P-selectin glycoprotein ligand-1*
s.c. - subcutâneo

SAA - *serum amyloid A*

SG - sepsis grave

Siglecs - *sialic acid binding Ig-like lectins*

SIRS - síndrome da resposta inflamatória sistêmica

SNG - sepsis não grave

TLR – *toll-like receptor*

TMB - tetrametilbenzidina

TNF - fator de necrose tumoral

UTI - unidades de terapia intensiva

VCAM - *vascular cell adhesion molecules*

Wt - *wild-type*

RESUMO

Spiller, F. **Papel da hemopexina na patogênese da sepse e da alfa-1 glicoproteína ácida na susceptibilidade de camundongos diabéticos a sepse.** 2009. Tese (Doutorado em Farmacologia) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

A falência da migração de neutrófilos para o foco infeccioso está associada com um mau prognóstico na sepse. De maneira similar, defeitos nas interações entre neutrófilos e células endoteliais contribuem para o aumento da susceptibilidade a infecções em outras doenças como a diabetes mellitus. As proteínas de fase aguda alfa-1-glicoproteína ácida (AGP) e hemopexina (Hx) podem mediar esses processos. O objetivo deste estudo foi determinar o papel da Hx na patogênese da sepse. Além disso, investigar o envolvimento da AGP na susceptibilidade de camundongos diabéticos a infecção polimicrobiana. Nossos resultados mostraram que Hx inibiu a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal e aumentou a taxa de mortalidade nos camundongos submetidos à sepse não grave por ligação e perfuração do ceco (CLP). Em contraste aos camundongos selvagens, camundongos deficientes para Hx submetidos à sepse grave tiveram uma eficiente migração de neutrófilos para o foco infeccioso. Como consequência, esses animais tiveram baixos níveis de bacteremia e alta taxa de sobrevivência. *In vitro*, Hx incubada com neutrófilos inibiu a resposta quimiotática induzida por C5a ou MIP-2 e induziu uma redução na expressão de CXCR2 e CD62L assim como aumento na expressão de CD11b. Em outra etapa deste trabalho, nós mostramos que camundongos diabéticos foram altamente susceptíveis a sepse devido à redução da migração de neutrófilos para o foco infeccioso, o que resultou em inibição da depuração bacteriana no local da infecção, bacteremia e elevada resposta inflamatória sistêmica. Ademais, em contraste aos camundongos não diabéticos, animais diabéticos submetidos à sepse não grave tiveram redução do rolamento, adesão e quimiotaxia dos neutrófilos, a qual foi acompanhada de redução na expressão de CD62L e CXCR2, e aumento na expressão de CD11b e GRK2. Camundongos diabéticos submetidos à sepse não grave também tiveram aumento nos níveis hepáticos do RNAm para AGP assim como aumento nos níveis séricos dessa proteína. O tratamento com insulina nos camundongos diabéticos diminuiu a taxa de mortalidade por prevenir a falência da migração de neutrófilos. Além disso, esse tratamento preveniu a diminuição da expressão do CXCR2 mediada pela GRK2 bem como inibiu a geração da AGP. Por fim, a administração de AGP aboliu os efeitos da insulina nos animais diabéticos. Os resultados apresentados demonstram um papel crucial da Hx na progressão da sepse experimental e sugere que a inibição terapêutica da Hx nas primeiras horas da sepse pode aumentar a migração de neutrófilos para o foco infeccioso, e como consequência, aumentar a taxa de sobrevivência. Na segunda parte do trabalho, nossos resultados sugerem que a AGP pode ser um fator chave na falência da migração de neutrófilos em camundongos diabéticos, fenômeno estreitamente relacionado à susceptibilidade dos camundongos à infecções.

Palavras-Chave: sepse; hemopexina; falência da migração de neutrófilos; ligação e perfuração do ceco (CLP); proteína de fase aguda; diabetes; insulina; alfa-1-glicoproteína ácida.

ABSTRACT

Spiller, F. **Role of hemopexin in the pathogenesis of sepsis and role of alpha-1-acid glycoprotein in the susceptibility of diabetic mice for sepsis.** 2009. Tese (Doutorado em Farmacologia) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

The failure of neutrophil migration to the infection sites is associated with poor outcome in sepsis. Moreover, defects in neutrophil-endothelium interplay contribute to the increased susceptibility to infections in other diseases such as diabetes mellitus. The acute phase proteins alpha-1-acid glycoprotein (AGP) and hemopexin (Hx) can mediate these processes. The objective of this study was to determine the role of Hx on the pathogenesis of sepsis and also to investigate the involvement of AGP in the susceptibility of diabetic mice to polymicrobial infection. Our results showed that Hx inhibited the cecal ligation and puncture (CLP)-induced neutrophil migration to peritoneal cavity and increased the mortality rate of mice submitted to non-severe sepsis. In contrast to Wild-type mice, Hx-null mice submitted to severe sepsis, presented normal neutrophil migration to infectious focus. As a consequence, these animals presented low bacteremia and high survival rate. Hx incubated with neutrophils *in vitro* inhibited the chemotaxis response evoked by C5a or MIP-2 and induced a reduction of CXCR2 and CD62L, and increased CD11b expression. In the other part of this work, we found that diabetic mice were highly susceptible to sepsis due to the reduction of neutrophil migration to infectious focus, thus resulting in the impairment of bacterial clearance in peritoneal cavity, bacteremia and elevated systemic inflammatory response. Moreover, in contrast to non-diabetic mice, diabetic mice subjected to mild sepsis presented reduction on rolling, adhesion and chemotaxis of neutrophils, which was accompanied by reduction of CD62L and CXCR2, and increases of CD11b and GRK2 expression on neutrophils. Unlike non-diabetic mice, diabetic mice submitted to mild sepsis displayed rise of AGP hepatic mRNA expression and serum protein levels. Insulin treatment of diabetic mice decreased the mortality rate by preventing the failure of neutrophil migration. Moreover, this treatment prevented the GRK2-mediated CXCR2 downregulation as well as decreased the generation of AGP. Finally, administration of AGP nullified the effect of insulin treatment in diabetic mice. The presented data demonstrates a critical role of Hx to experimental sepsis outcome and suggests that therapeutic inhibition of Hx in the early phase of sepsis could improve the neutrophil migration to infectious focus and, as a consequence, improve the survival rate. In the second step of this work, our data suggests that AGP might perform a key role on failure of neutrophil migration in diabetic mice, which has a strict correlation to susceptibility of these mice to infections.

Key words: sepsis; hemopexin; failure of neutrophil migration; cecal ligation and puncture (CLP); acute phase protein; diabetes; insulin; alpha-1-acid glycoprotein.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	21
1.1. SEPSE	21
1.1.1. Aspectos Gerais da Sepse e Definições	21
1.1.2. Epidemiologia da sepse	23
1.1.3. Modelos experimentais de sepse	24
1.2. MIGRAÇÃO DE NEUTRÓFILOS	25
1.2.1. Aspectos gerais para ativação da migração de neutrófilos	25
1.2.2. Mecanismos envolvidos no recrutamento de neutrófilos	28
1.2.3. Importância do recrutamento de neutrófilos no processo infeccioso	33
1.3. FALÊNCIA DA MIGRAÇÃO DE NEUTRÓFILOS NA SEPSE	34
1.3.1. Falência da Migração de Neutrófilos para o Foco Infeccioso na Sepse Grave	34
1.3.2. Mecanismos envolvidos na falência da migração dos neutrófilos	35
1.3.3. Proteínas de fase aguda e falência da migração de neutrófilos durante a sepse	37
1.4. DIABETES MELLITUS.....	39
1.4.1. Considerações Gerais da Diabetes Mellitus.....	39
1.4.2. Diabetes mellitus e infecções	40
2. HIPÓTESE	43
3. OBJETIVOS	45
4. MATERIAIS E MÉTODOS	47
4.1. Animais.....	47
4.2. Modelos de Sepse	47
4.3. Cultivo das Bactérias	48
4.4. Quantificação da AGP sérica	49
4.5. Quantificação da Hx Sérica	49
4.6. Migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal	49
4.7. Rolamento e adesão de leucócitos na microcirculação mesenterica.....	50
4.8. Isolamento dos neutrófilos	51
4.9. Ensaio de quimiotaxia	52
4.10. Formação do complexo Hx-heme e BSA-heme	52
4.11. Determinação dos níveis de desidrogenase láctica (LDH) no sobrenadante de neutrófilos	52

4.12. Avaliação do número de bactérias no lavado peritoneal e no sangue.....	53
4.13. Atividade de mieloperoxidase (MPO).....	53
4.14. Quantificação de citocinas e quimiocinas.....	54
4.15. <i>Western blot</i>	55
4.16. <i>PCR Real Time</i> para Hx.....	55
4.17. <i>PCR Real Time</i> para AGP.....	56
4.18. Citometria de fluxo para análise da expressão de CXCR2, CD62L e CD11b.....	57
4.19. Imunofluorescência para GRK-2.....	58
4.20. Modelo de Diabetes.....	59
4.21. Análise dos resultados.....	59
5. REAGENTES E SOLUÇÕES.....	61
5.1. Tampão fosfato em salina (PBS) 10 X.....	61
5.2. Tampão fosfato em salina (PBS) 1 X.....	61
5.3. PBS – EDTA.....	61
5.4. Solução de tribromoetanol 2,5%.....	61
5.5. Meio ágar Mueller-Hinton.....	62
5.6. Solução de Triton X-100 0,2%.....	62
5.7. Tampão de lise.....	62
5.8. Meio RPMI.....	62
5.9. Meio RPMI + 0,1% de BSA.....	63
5.10. Corante Panótico Rápido (LaborClin).....	63
5.11. Tampões utilizados para o ensaio de ELISA.....	63
5.11.1. Solução de ligação (binding buffer) pH 9.0.....	63
5.11.2. Tampão substrato pH 5.0.....	63
5.11.3. Substrato.....	63
5.12. Soluções utilizadas para o ensaio de MPO.....	64
5.12.1. Tampão NaPO ₄ 0,08M.....	64
5.12.2. Tampão NaPO ₄ 0,05M.....	64
5.12.3. Solução de H-TAB 0,5 %.....	64
5.12.4. Solução de TMB (3,3',3,3' - tetrametil-benzidina).....	64
5.12.5. Solução de peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂).....	64

5.13 Hanks 10x.....	65
5.14. Hanks 1x.....	65
6. RESULTADOS.....	67
6.1. Caracterização do modelo de sepse por CLP	67
6.1.1. Camundongos submetidos à sepse grave tiveram falência da migração de neutrófilos para o foco infeccioso e infiltrado de neutrófilos em tecidos secundários ao foco infeccioso	67
6.1.2. Nas primeiras horas após a sepse grave ocorreu diminuição do rolamento e adesão dos leucócitos ao endotélio da microcirculação mesentérica.....	69
6.1.3. Camundongos com sepse grave tiveram redução da expressão do receptor CXCR2 nos neutrófilos.....	71
6.1.4. Níveis séricos de AGP aumentaram significativamente somente seis horas após a indução de sepse grave em camundongos	73
6.2. Caracterização das proteínas com atividade inibitória sobre a migração dos neutrófilos expressas nas primeiras horas após a sepse grave em camundongos	74
6.3. Papel da proteína de fase aguda Hx na falência da migração de neutrófilos durante a sepse	75
6.3.1. Hemopexina inibiu a migração de neutrófilos para o foco infeccioso e diminuiu a sobrevivência de camundongos com sepse.....	75
6.3.2. Soro coletado de camundongos selvagens com sepse grave inibiu a migração de neutrófilos para o foco inflamatório enquanto soro de camundongos deficientes para hemopexina com sepse grave não possuiu esse efeito.....	77
6.3.3. Camundongos Hx-/- não apresentaram falência da migração de neutrófilos para o foco infeccioso durante a sepse grave	79
6.3.4. Camundongos Hx-/- demonstraram melhor controle do foco infeccioso após a indução de sepse polimicrobiana	81
6.3.5. Camundongos Hx-/- tiveram menor sequestro de leucócitos no pulmão e menores níveis séricos de TNF- α que animais Wt após a indução de sepse grave.....	82
6.3.6. Camundongos Hx-/- foram mais resistentes a sepse grave que camundongos Wt.....	85
6.3.7. Os níveis séricos de hemopexina estavam diminuídos após a sepse	87
6.3.8. A concentração de hemopexina não diminuiu após a incubação com sangue total ou soro de animais com sepse	89
6.3.9. <i>In vitro</i> , a resposta quimiotática ao C5a de neutrófilos Hx-/- foi similar a resposta quimiotática de neutrófilos Wt	92
6.3.10. Hx inibiu a resposta quimiotática de neutrófilos <i>in vitro</i>	94
6.3.11. Hemopexina diminuiu a expressão do CXCR2 e CD62L e aumentou a expressão do CD11b na membrana dos neutrófilos	96
6.4. Papel da proteína de fase aguda AGP na falência da migração de neutrófilos na diabetes experimental	99
6.4.1. Padronização do modelo de diabetes em camundongos	99
6.4.2. Camundongos diabéticos são mais susceptíveis à sepse polimicrobiana não grave	101
6.4.3. O tratamento com insulina dos animais diabéticos preveniu a exacerbada inflamação sistêmica após a indução de sepse não grave	104
6.4.4. Durante a sepse, camundongos diabéticos tiveram diminuição do rolamento e adesão dos leucócitos na microcirculação mesentérica pela modulação das moléculas de adesão	106
6.4.5. Neutrófilos de camundongos diabéticos com sepse não grave tiveram redução na quimiotaxia, diminuição da expressão do CXCR2 e aumento da expressão de GRK2	110
6.4.6. Altas concentrações séricas de AGP correlacionam-se com a inibição da migração de neutrófilos em camundongos diabéticos com SNG	112
6.4.7. <i>In vitro</i> , AGP inibiu a quimiotaxia e diminuiu a expressão do CXCR2 nos neutrófilos.....	117
7. DISCUSSÃO	120

7.1. Seps e Hemopexina	120
7.2. Diabetes e AGP	127
9. CONCLUSÃO	135
10. REFERÊNCIAS	137

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. SEPSE

1.1.1. Aspectos Gerais da Seps e Definições

As manifestações clínicas da seps são conhecidas desde a época de Hipócrates (460–377 a.C.), o qual introduziu o termo “feridas em putrefação”. O Persiano Ibn Sina (980-1037) reconhecido como o “pai da medicina moderna” observou que geralmente a septicemia era acompanhada de febre. Entretanto, foi somente no século XVIII que Louis Paster ligou o consumo de substâncias orgânicas à presença e crescimento de bactérias e microorganismos. Ainda no século XVIII, Ignaz Semmelweis observou uma significativa redução na mortalidade de mulheres após o parto pela simples ação de higienizar as mãos dos médicos. Em 1914, Hugo Schottmuller foi o primeiro a descrever a presença de bactérias como um componente fundamental para seps. Décadas depois, as idéias de Lewis Thomas levaram a uma mudança de direção no entendimento da seps por popularizar a teoria de que “é a resposta do hospedeiro que leva a doença”. Esta teoria resultou em um grande número de estudos experimentais e clínicos, os quais mudaram o foco das pesquisas em seps do agente infeccioso para a resposta do hospedeiro (Rittirsch *et al.*, 2008). Atualmente, o conceito de seps foi definido por Roger Bone e Colaboradores em 1991 como a síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS) durante uma infecção (Bone *et al.*, 1992). A seps pode evoluir para formas mais graves como a seps grave e o choque séptico (para definições ver Tabela 1).

O desenvolvimento de SIRS na seps leva a uma complexa rede de alterações fisiopatológicas que atingem praticamente todos os tecidos do hospedeiro como, por exemplo, ativação inadequada dos leucócitos, ativação da cascata de coagulação e inibição da fibrinólise. Essas alterações contribuem significativamente para a disfunção de múltiplos órgãos e, conseqüentemente, para as altas taxas de mortalidade na seps.

Tabela 1. Definições de sepse e outros conceitos importantes.

Termo	Definições
Infecção	Fenômeno microbiano caracterizado por uma resposta inflamatória reacional à presença de microorganismos ou à invasão de tecido normalmente estéril.
Bacteremia	Presença de bactéria viável no sangue.
Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica (SIRS)	Resposta inflamatória sistêmica a uma variedade de lesões clínicas graves. A resposta é manifestada por duas ou mais das seguintes condições: <ul style="list-style-type: none">• Temperatura > 38°C ou < 36°C• Frequência cardíaca > 90 batimentos/min• Frequência respiratória > 20 movimentos/min ou PaCO₂ < 32 torr (<4,3 kPa)• Leucócitos > 12.000 células/mm³, ou > 10% de formas imaturas (bastões).
Sepse	SIRS decorrente de uma infecção.
Sepse Grave	Sepse associada à disfunção orgânica, hipoperfusão ou hipotensão.
Choque Séptico	Sepse com hipotensão, apesar de adequada ressuscitação hídrica, associada à presença de anormalidades da perfusão que podem incluir acidose láctica, oligúria ou alteração aguda do estado mental.
Síndrome da Disfunção de Múltiplos Órgãos	Presença de função orgânica alterada em pacientes agudamente enfermos, nos quais a homeostase não pode ser mantida sem intervenção.

1.1.2. Epidemiologia da sepse

Apesar dos grandes avanços na compreensão da fisiopatologia e do surgimento de novas intervenções terapêuticas, a incidência da sepse vem crescendo cada vez mais. Nos Estados Unidos, sepse é a segunda principal causa de morte entre pacientes em Unidades de Terapia Intensiva (UTI) e a décima causa geral de morte (Angus *et al.*, 2001).

Em 1924 Felty e Keefer, publicaram um dos primeiros estudos epidemiológicos sobre sepse, no qual relataram que havia menos de 100 casos anuais nos Estados Unidos (Felty e Keefer, 1924). No início da década de 90, foi descrito que a incidência de sepse vinha aumentando. Um estudo conduzido pelo Centro de Controle de Doenças dos Estados Unidos mostrou que a incidência de sepse aumentou de 73,6 para 175,9 casos por 100.000 habitantes entre o período de 1979 a 1989 (Angus e Wax, 2001). Em 2001, foi publicado um dos mais abrangentes estudos epidemiológicos de sepse nos Estados Unidos. De acordo com este estudo, entre o período de 1979 e 2001 ocorreram 10.319.418 casos de sepse, sendo mais comum entre homens do que em mulheres. A incidência durante o período aumentou de 82,7 para 240,4 casos para cada 100.000 habitantes, bem como as mortes relacionadas à sepse (Martin *et al.*, 2003). No Brasil, um estudo epidemiológico multicêntrico denominado BASES (*Brazilian Sepsis Epidemiological Study*) revelou que a incidência de sepse é de 57 para cada 1000 pacientes-dia admitidos nas UTIs. Além disso, o índice de mortalidade é de cerca de 34,7%, podendo chegar a 52,2% no caso de pacientes que evoluem para choque séptico, uma das principais complicações observadas nessa patologia (Silva *et al.*, 2004). Os custos diretos com o tratamento da sepse são elevados; no Brasil o custo médio de cada paciente internado em uma UTI por dia é de aproximadamente U\$ 1.094,00 e U\$ 826,00 para os não sobreviventes e sobreviventes, respectivamente, sendo o período médio de internação em torno de 9-10 dias (Sogayar *et al.*, 2008). Nos Estados Unidos os custos para o tratamento foram calculados em torno de 17 bilhões de dólares para os mais de 750.000 pacientes que desenvolvem sepse anualmente (Angus *et al.*, 2001).

1.1.3. Modelos experimentais de sepse

Em contraste à estudos pré-clínicos, os estudos clínicos com estratégias promissoras para o tratamento da sepse até hoje não demonstraram a eficácia esperada no aumento da taxa de sobrevivência dessa patologia (Poli-De-Figueiredo *et al.*, 2008). Muitos fatores contribuem para essas discrepâncias, entretanto a interpretação errônea dos dados pré-clínicos e principalmente o uso de modelos experimentais que não mimetizam a sepse em humanos são fatores cruciais para os diferentes resultados entre os estudos com animais e humanos. Embora os modelos animais possuam muitas limitações, eles são fundamentais para o desenvolvimento das novas terapias para o tratamento da sepse e do choque séptico, pois fornecem algumas informações fundamentais que não podem ser obtidas por outros métodos como a farmacocinética, toxicidade e mecanismos de ação de drogas. Dessa forma, através dos modelos de infecção, novos agentes terapêuticos podem ser estudados para o tratamento da sepse. Além disso, a indução de condição patológica é importante, uma vez que tanto a farmacocinética como a farmacodinâmica das drogas difere em um animal saudável e em um animal debilitado, como ocorre nos casos de sepse. A proposta do uso de um modelo de sepse animal é ter um cenário controlado para diminuir ao máximo o número de variáveis, permitindo assim, estudar em detalhes as alterações imunológicas, cardiovasculares e metabólicas que ocorrem nessas condições. Somente através da compreensão dos mecanismos fisiopatológicos da sepse e do choque séptico é que novas terapêuticas poderão ser desenvolvidas.

Geralmente, os estudos pré-clínicos são iniciados com roedores (Piper *et al.*, 1996). Endotoxemia e bacteremia são dois modelos sem um foco infeccioso e muitas vezes utilizados como modelos de sepse. Entretanto, esses modelos reproduzem apenas as características sistêmicas observadas no início da sepse e não reproduzem as alterações imunológicas induzidas pela presença de um foco infeccioso, o que caracteriza a sepse em humanos. Dessa forma, modelos experimentais com um foco infeccioso são clinicamente mais relevantes (Freise *et al.*, 2001). Entre esses modelos

estão os de inoculação bacteriana que podem induzir uma peritonite, pneumonia ou uma meningite. Outro modelo amplamente utilizado nas pesquisas em sepse é o modelo de perfuração e ligação do ceco (CLP). Neste modelo o ceco é obstruído logo abaixo da válvula íleo-cecal e perfurado por uma agulha. O tamanho da agulha e/ou o número de furos pode variar para reproduzir uma sepse letal ou não-letal (Parker e Watkins, 2001).

O modelo de CLP satisfaz muitos dos critérios exigidos para um modelo ideal de sepse. Esse modelo é polimicrobiano, a sepse é iniciada por um foco infeccioso e ocorre liberação contínua de bactérias e seus produtos para a circulação e outros tecidos. Outra vantagem é que a CLP permite variações quanto ao grau de severidade, variando de uma simples infecção até uma sepse letal ou crônica. A cirurgia é simples e de baixo custo permitindo a reprodutibilidade por uma grande variedade de laboratórios. Além disso, esse modelo reproduz as alterações clínicas encontradas na apendicite ou na diverticulite acompanhadas de perfuração intestinal.

1.2. MIGRAÇÃO DE NEUTRÓFILOS

1.2.1. Aspectos gerais para ativação da migração de neutrófilos

Nosso organismo está constantemente exposto a milhões de microorganismos denominados *microorganismos patogênicos* ou *patógenos*, que podem ocasionar pequenos danos teciduais ou mesmo doenças. No entanto, nos organismos hígidos as doenças infecciosas raramente ocorrem. Isso se deve ao fato de que, após a infecção, os patógenos são rapidamente contidos pelos mecanismos de defesa inatos do indivíduo (Janeway, 2001).

O primeiro passo de uma infecção é a colonização do hospedeiro pelo patógeno. A superfície da pele e das mucosas é constituída de células epiteliais que atuam como uma barreira física efetiva contra a invasão dos microorganismos, pois as fortes junções entre as células adjacentes evitam o fácil acesso do patógeno ao interior do organismo. A importância dessa barreira epitelial na proteção contra

infecções torna-se clara quando ela é rompida, por exemplo, nas ulcerações e nas queimaduras, as quais criam vias de acesso aos patógenos, podendo originar processos infecciosos. Além disso, as superfícies epiteliais internas são recobertas por uma camada de muco que contém substâncias que suprimem ou inibem o crescimento dos patógenos. Entre as substâncias mais importantes destacam-se os peptídeos antimicrobianos, denominados α -defensinas, que são secretadas principalmente pelas células epiteliais da mucosa das vias aéreas e do trato gastro-intestinal. Esses pequenos peptídeos catiônicos são similares às β -defensinas encontradas nos grânulos azurófilos dos neutrófilos e possuem uma alta atividade antimicrobiana, apresentando um papel importante na resposta local de defesa contra uma infecção (Cunliffe, 2003).

No entanto, quando os microorganismos conseguem quebrar a barreira epitelial e iniciam a replicação nos tecidos do hospedeiro, na maioria dos casos, são eficientemente controlados pelos mecanismos de defesa do sistema imune inato e adquirido. Esses mecanismos iniciam-se com o reconhecimento do microorganismo invasor. O reconhecimento ocorre através de moléculas expressas nos microorganismos, denominadas padrões moleculares associados a patógenos (*pathogen-associated molecular patterns* ou PAMPs). PAMPs são estruturas conservadas, constitutivamente expressos na superfície dos patógenos, e reconhecidos por receptores encontrados em células do sistema imune inato como macrófagos, neutrófilos e células dendríticas. Esses receptores são coletivamente denominados de receptores de reconhecimento de padrões (*pattern recognition receptors* ou PRRs). Entre os membros mais importantes dos PRRs destacam-se os TLRs (*toll-like receptors*) e os receptores do tipo NOD (*nucleotide-binding and oligomerization domain*) (Takeda *et al.*, 2003; Rasmussen *et al.*, 2009). A ativação desses receptores desencadeia uma resposta inflamatória caracterizada por vermelhidão, calor, inchaço no local da infecção e dor. Os vasos sanguíneos dilatam-se e tornam-se permeáveis, levando ao acúmulo local de proteínas plasmáticas, como componentes do sistema do complemento e fatores da coagulação. Além disso, células residentes

no local da infecção começam a produzir uma grande variedade de moléculas sinalizadoras, como prostaglandinas, leucotrienos, citocinas e quimiocinas, culminando no recrutamento de leucócitos aos sítios da infecção. O recrutamento de leucócitos ativados aos locais de infecção é uma das funções mais importantes da imunidade inata (Janeway, 2001; Janeway e Medzhitov, 2002).

O rolamento, adesão e transmigração dos leucócitos para os locais inflamatórios foram descritos pela primeira vez no século XIX (Ley *et al.*, 2007). Posteriormente, com a descoberta das integrinas, selectinas e das quimiocinas e seus receptores e ligantes, a cascata de adesão dos leucócitos emergiu como um conceito para explicar o recrutamento dos diversos tipos de leucócitos para os diferentes sítios inflamatórios. Classicamente o modelo de adesão dos leucócitos pode ser descrito em 3 etapas: o rolamento médiado pelas selectinas, a ativação médiada pelas quimiocinas e a adesão médiada pelas integrinas. Entretanto, recentes evidências sugerem que etapas adicionais também ocorrem na cascata da adesão leucocitária. Uma importante etapa que não figura no modelo de adesão dos leucócitos é a migração transendotelial. Além disso, a adesão dos leucócitos é caracterizada por pelo menos duas etapas: adesão dos leucócitos que rolam no endotélio, o qual é médiado pelo aumento da avidéz pelo endotélio, e por uma fase posterior de estabilização da adesão. Os mecanismos envolvidos nesses processos ainda não estão totalmente elucidados, entretanto na última década, as descobertas sobre as estruturas e vias de sinalização envolvidas na adesão dos leucócitos são suficientes para expandir as 3 etapas clássicas da cascata da adesão. Atualmente, também são reconhecidas as etapas de rolamento lento, firme adesão, prolongamento intraluminal dos leucócitos (*crawling*), migração paracelular e transcelular e migração através da membrana basal (Ley *et al.*, 2007).

1.2.2. Mecanismos envolvidos no recrutamento de neutrófilos

Normalmente, os leucócitos são mantidos no centro dos vasos sanguíneos, onde o fluxo é mais rápido. No entanto, nos locais de inflamação, onde os vasos estão dilatados, o fluxo circulatório mais lento permite que os leucócitos se movam do centro dos vasos para a periferia e, assim, possam interagir com o endotélio vascular, evento conhecido como marginalização. A migração de leucócitos dos vasos sanguíneos para o local da inflamação ocorre em regiões específicas do sistema vascular, denominadas vênulas pós-capilares. Temporalmente, o primeiro tipo celular recrutado para o foco inflamatório é o neutrófilo (Huttenlocher *et al.*, 1995; Meng *et al.*, 2004; Petri *et al.*, 2008).

A fase inicial do processo de migração é mediada principalmente por uma família de moléculas de adesão, denominadas selectinas (E- e P-selectinas). A P-selectina, inicialmente descrita como uma molécula expressa na superfície de plaquetas ativadas, também está constitutivamente presente no interior das vesículas de *Weibel-Palade* nas células endoteliais. Portanto, a expressão da P-selectina na superfície endotelial não requer síntese *de novo*, mas sim translocação e fusão das vesículas com a membrana celular, surgindo na superfície poucos minutos após estimulação induzida pelos mediadores inflamatórios, como histamina, C5a, LTB₄, TNF- α e IL-1 β . A expressão da segunda selectina no endotélio, a E-selectina, requer síntese *de novo*, levando algumas horas para ser expressa na superfície endotelial. Vários mediadores induzem a expressão da E-selectina, dentre eles os principais são LTB₄, TNF- α e IL-1 β . Uma vez na superfície das células endoteliais, as selectinas interagem com a estrutura *sialil-Lewis X* de certas glicoproteínas, como a PSGL-1 (*P-selectin glycoprotein ligand-1*), ESL-1 (*E-selectin ligand-1*) e L-selectina (CD62L), que estão presentes na membrana dos leucócitos. A PSGL1 possui um papel dominante como ligante para as 3 selectinas (E-, P- e L-selectina), embora tenha sido originalmente descrita como um

ligante para a P-selectina. A ligação da PSGL-1 a L-selectina permite a interação entre os leucócitos e facilita a captura dessas células pelo endotélio. A natureza química da primeira interação leucócito-endotélio resulta em uma aderência transitória e de baixa afinidade, processo conhecido como rolamento ou *rolling* (Ley, 2002; 2003; Ley *et al.*, 2007).

A interação entre as selectinas não serve apenas para o contato entre as células, mas também ativa cascatas de sinalização via selectinas ou através de receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) adjacentes a essas moléculas de adesão. Essa sinalização favorece a ativação das integrinas nos leucócitos e a expressão das integrinas endoteliais. Além do papel central das selectinas para o rolamento, as integrinas também participam desse processo, principalmente na fase lenta do rolamento (Simon e Green, 2005; Ley *et al.*, 2007).

O rolamento lento dos leucócitos permite que ocorram interações mais fortes entre os leucócitos e o endotélio vascular, resultando na segunda fase da migração leucocitária que compreende a adesão. Essa fase é estabelecida pela interação entre as integrinas leucocitárias, principalmente $\beta 2$ -integrinas, com as moléculas membros da superfamília das imunoglobulinas, VCAMs (*vascular cell adhesion molecules*) e ICAMs (*intercellular adhesion molecule*) expressas pelo endotélio ativado. Vários mediadores induzem a expressão de VCAMs e ICAMs nas células endoteliais, entre eles os principais são TNF- α , IL-1 β e LPS. As integrinas estão normalmente expressas nos leucócitos em um estado de baixa afinidade por ligantes. No entanto, durante o rolamento sobre os vasos, os leucócitos passam a interagir com quimiocinas, como a IL-8 e as quimiocinas da família GRO, que se encontram ancoradas nos glicaminoglicanos presentes na superfície luminal das células endoteliais, resultando na ativação dos leucócitos. Essa ativação promove alterações conformacionais nas integrinas presentes nos leucócitos em rolamento, que aumentam a sua capacidade adesiva em frações de milisegundos. Essa rapidez na ativação das

integrinas permite a adesão dos leucócitos mesmo em oposição a força exercida pela corrente sanguínea. Como consequência, a velocidade do rolamento diminui até os leucócitos aderirem firmemente ao endotélio vascular (Huttenlocher *et al.*, 1995; Meng *et al.*, 2004; Ley *et al.*, 2007). Além das integrinas médiarem a adesão dos leucócitos, a sinalização intracelular gerada por essas moléculas regula várias funções celulares, incluindo a mobilidade, proliferação e apoptose celular (Shattil, 2005; Giagulli *et al.*, 2006).

A transmigração através da parede vascular é a etapa final do processo de emigração dos leucócitos para os tecidos inflamados e ocorre com o mínimo rompimento da complexa estrutura dos vasos. Nesse processo de transmigração os leucócitos precisam atravessar 3 diferentes barreiras: células endoteliais, a membrana basal das células endoteliais e os pericitos.

Inicialmente, as interações entre as quimiocinas presentes nas células endoteliais e seus receptores nos leucócitos juntamente com as interações entre as integrinas, induzem a formação de projeções celulares chamadas “*docking structures*” ou “*transmigratory cups*” que são estruturas ricas em ICAM-1 e VCAM1, proteínas citoplasmáticas como ERM (*ezrin, radixin e moesin*) e componentes do citoesqueleto como vinculina, α -actina e talina-1. Essas projeções iniciam o ancoramento dos leucócitos às células endoteliais e podem iniciar a transmigração através da via paracelular ou transcelular. Entretanto, antes de atravessar as paredes das vênulas pós-capilares, os neutrófilos e monócitos procuram na parede dos vasos (um movimento denominado de *crawling*) os melhores lugares para a transmigração (Schenkel *et al.*, 2004; Phillipson *et al.*, 2006).

A migração dos neutrófilos pela via transcelular é associada com áreas delgadas (ou com uma camada fina) de células endoteliais, um fator que facilita a migração dos leucócitos por encurtar a distância de transmigração. Dessa forma, as condições e os tipos de leucócitos que utilizam essa rota parecem ser determinados principalmente pela composição dos leitos vasculares. A ligação da ICAM-1 leva a translocação da ICAM-1 para regiões ricas em F-actina e caveolina-1.

A ligação das caveolas com ICAM-1 forma organelas vesículo-vasculares que formam um canal intracelular através do qual os leucócitos podem migrar (Cinamon *et al.*, 2004; Millan *et al.*, 2006). Nessas condições, a estabilização da membrana celular ocorre principalmente pela ação da actina e da vimectina (Millan *et al.*, 2006; Nieminen *et al.*, 2006).

A via de transmigração paracelular é a mais utilizada pelos leucócitos e é facilitada pela redução do contato entre as células endoteliais, permitindo assim que os leucócitos passem pelas junções intercelulares. Neste processo, a ativação de vias de sinalização dependente da ICAM-1 leva ao aumento do cálcio no interior das células endoteliais, culminando na ativação da cadeia leve da miosina e subsequente contração das células endoteliais. Algumas moléculas importantes em manter as junções intercelulares também facilitam a passagem dos leucócitos. Entre essas moléculas estão os membros da superfamília das imunoglobulinas PECAM1 (*platelet endothelial cellular adhesion molecules*), ICAM-1, ICAM-2, JAM-A (*junctional adhesion molecule*), JAM-B, JAM-C e ESAM (*endothelial cell-selective adhesion molecule*) assim como o CD99. Enquanto ICAM-1 e ICAM-2 interagem com a integrina leucocitária LFA1 (*lymphocyte function-associated antigen*), PECAM1 e CD99 sustentam interações homofílicas e as JAM estão envolvidas em ambas as interações homofílicas e com as integrinas (Simon e Green, 2005; Ley *et al.*, 2007).

Atravessar a barreira endotelial pode levar de 2 a 5 min, entretanto atravessar a membrana basal (composta de diversas proteínas como o colágeno do tipo IV e laminina-10) pode levar um pouco mais de tempo (5 a 15 min). O movimento dos leucócitos nessa última etapa pode ser dificultado ou facilitado pela composição da membrana basal das células endoteliais, a qual é determinada principalmente pelo fenótipo das células endoteliais e pela razão células endoteliais – pericitos. A passagem dos leucócitos pela membrana basal ocorre em espaços deixados pelos pericitos adjacentes e regiões de baixo depósito de proteínas com a matriz extracelular. As lacunas existentes entre os pericitos também permitem a formação de gradientes quimiotáticos,

direcionando os leucócitos para os sítios mais favoráveis para a transmigração. A passagem dos leucócitos pela membrana basal é facilitada pela $\alpha_6\beta_1$ -integrina e pela ação de proteases dos neutrófilos, como as metaloproteases e a elastase (Ley *et al.*, 2007; Petri *et al.*, 2008).

Uma vez ultrapassada a barreira endotelial, os leucócitos se dirigem ao foco inflamatório através dos tecidos, um evento conhecido como *quimiotaxia*. Por definição, quimiotaxia é a locomoção orientada das células em direção a um gradiente de concentração de uma molécula quimiotóxica, ou no caso, em direção ao local de inflamação ou infecção (Kubes, 2002; Petri *et al.*, 2008). A quimiotaxia dos neutrófilos é um movimento lento, um neutrófilo consegue andar entre 10 e 40 μm por minuto, enquanto uma bactéria consegue percorrer a mesma distância em um tempo 100 vezes menor. O processo quimiotático requer pelo menos 3 passos distintos; o reconhecimento do gradiente quimiotático, a polarização celular e a locomoção. Os neutrófilos são altamente especializados em distinguir em minutos os diferentes mediadores quimiotáticos liberados por bactérias ou pelas células residentes nos locais de inflamação. Entre as várias moléculas quimioatraentes destacam-se as quimiocinas, IL-8 e as quimiocinas da família GRO, bem como os mediadores lipídicos LTB_4 e PAF, o fragmento do complemento C5a e fMLP (*N-formyl-L-methionyl-L-leucyl-pnenylalanine*). Essas moléculas ligam-se em proteoglicanos da matriz extracelular direcionando os leucócitos através dos GPCRs específicos para esses mediadores presentes nessas células (Van Haastert e Devreotes, 2004). Após esse reconhecimento inicial ocorre um rearranjo finamente coordenado e direcional do citoesqueleto da célula, principalmente pela polimerização da F-actina, produzindo pseudópodos que direcionam e levam as células em direção ao gradiente quimiotático (Eddy *et al.*, 2000). Para que esse movimento seja direcional, a polimerização da F-actina e a formação dos pseudópodos ocorrem em uma porção distal e lateral do córtex celular voltado para o gradiente quimiotático (Eddy *et al.*, 2000; Pollard e Borisy, 2003; Xu *et al.*, 2003). Modelos matemáticos e evidências experimentais indicam que durante a quimiotaxia

ocorrem diferenças na distribuição de proteínas e lipídios no interior dos neutrófilos; na parte voltada para o gradiente (frontal) são encontradas moléculas como PI3K (*phosphoinositide-3 kinase*), PIP3 (*phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate*), Rac e F-actina, enquanto na parte posterior estão presentes moléculas como PTEN, miosina e Rho. Essas diferenças fazem com que a parte frontal da célula ligue-se a matriz celular enquanto a parte posterior desligue-se dela, permitindo assim o movimento celular (Van Haastert e Devreotes, 2004).

1.2.3. Importância do recrutamento de neutrófilos no processo infeccioso

Em algumas doenças inflamatórias em que não há foco infeccioso, como artrite reumatóide, lupus eritematoso sistêmico, trauma e em modelo experimental de endotoxemia, a migração de leucócitos para os tecidos e órgãos é a principal causa de lesões teciduais com subsequentes disfunções de órgãos. Entretanto, o recrutamento de leucócitos durante uma infecção apresenta um papel fundamental na circunscrição e controle do processo infeccioso (Huttenlocher *et al.*, 1995; Carden e Granger, 2000; Doerschuk, 2001).

Os neutrófilos são células extremamente bem equipadas para eliminar microorganismos. Uma vez no foco infeccioso, eles são capazes de engolfar os patógenos por meio de um processo denominado fagocitose, culminando na formação de vesículas citoplasmáticas denominadas de fagossomas. A atividade microbicida ocorre dentro dos fagolisossomas, vesículas formadas pela fusão dos fagossomas e dos lisossomas, e é mediada por enzimas lisossomais, como elastase e defensinas, bem como por radicais livres derivados das espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. Além do mecanismo de fagocitose, a ativação dos neutrófilos leva à liberação de estruturas semelhantes a uma rede fibrosa composta de fragmentos de DNA conhecidos como NETs (*neutrophil extracellular traps*). Os NETs prendem os microorganismos e através de sua atividade proteolítica eliminam esses patógenos, permitindo assim um eficiente mecanismo extracelular de

combate aos microorganismos (Clark *et al.*, 2007). Além disso, os mediadores inflamatórios liberados pelos neutrófilos ativados, como citocinas (IL-1, TNF- α e IL-8) e eicosanóides (prostaglandinas, PAF e leucotrienos) promovem o recrutamento de mais leucócitos para o sítio infeccioso e auxiliam na indução da atividade microbicida (Janeway e Medzhitov, 2002).

A importância dos neutrófilos durante um processo infeccioso é claramente ilustrada por doenças ou tratamentos em que o número de neutrófilos está drasticamente reduzido. Por exemplo, a depleção de neutrófilos que ocorre durante o tratamento com agentes quimioterápicos está fortemente associada a infecções bacterianas e fúngicas. Restaurando-se os níveis de neutrófilos nesses pacientes, pela transfusão de frações sanguíneas ou pela estimulação de sua produção por fatores de crescimento específico, pode-se corrigir essa susceptibilidade (Faurschou e Borregaard, 2003; Kong *et al.*, 2005). Além disso, experimentos realizados com animais depletados de neutrófilos demonstraram que esses animais apresentam uma maior susceptibilidade à infecção bacteriana causada por *Staphylococcus aureus*, exibindo altos níveis séricos de citocinas, sinais graves de infecção e aumento do índice de mortalidade, sugerindo que a destruição dos patógenos pelos neutrófilos é uma etapa crítica durante uma infecção (Shirai *et al.*, 1989; Verdrengh e Tarkowski, 1997).

1.3. FALÊNCIA DA MIGRAÇÃO DE NEUTRÓFILOS NA SEPSE

1.3.1. Falência da Migração de Neutrófilos para o Foco Infeccioso na Sepsis Grave

Como anteriormente mencionado, o recrutamento de neutrófilos é um evento extremamente importante para o controle do processo infeccioso. Isso pode ser observado em algumas patologias como AIDS, cirrose e diabetes, nas quais os neutrófilos possuem uma redução da resposta quimiotática *in vitro*, assim como na capacidade migratória para o foco infeccioso *in vivo*,

tornando o hospedeiro susceptível a infecções (Pereira *et al.*, 1987; Mastroianni *et al.*, 1999; Fiuza *et al.*, 2002). De forma similar, diversos estudos mostram que neutrófilos de animais submetidos à sepse grave ou choque endotoxêmico também apresentam um comprometimento da sua resposta quimiotática *in vitro* e da capacidade de migrar para o foco infeccioso, evento denominado de paralisia ou falência da migração de neutrófilos. Essa falência da migração de neutrófilos correlaciona-se com a perda do controle local da infecção e consequente disseminação bacteriana, gerando uma resposta inflamatória sistêmica que pode levar a morte do hospedeiro (Benjamim *et al.*, 2000; Tavares-Murta *et al.*, 2001; Crosara-Alberto *et al.*, 2002). Além disso, assim como observado em modelos experimentais de sepse, neutrófilos de pacientes sépticos também apresentam uma redução significativa da resposta quimiotática induzida por diferentes estímulos como IL-8, LTB4 e fMLP. Da mesma forma, o comprometimento da função quimiotática dos neutrófilos correlaciona-se com o índice de mortalidade dos pacientes (Tavares-Murta *et al.*, 2002).

1.3.2. Mecanismos envolvidos na falência da migração dos neutrófilos

Os mecanismos envolvidos na falência da migração de neutrófilos não estão totalmente esclarecidos. No entanto, sabe-se que a redução da função quimiotática de neutrófilos de pacientes com sepse grave correlaciona-se com a redução da expressão na superfície dos neutrófilos do receptor quimiotático CXCR2, um dos receptores da quimiocina IL-8. O grau de redução da expressão do receptor CXCR2 está diretamente relacionado à piora dos índices prognósticos, demonstrado principalmente pela diminuição da relação PaO₂/FIO₂ e aumento do índice APACHE II (*Acute Physiology and Chronic Health Evaluation*) (Chishti *et al.*, 2004). A ativação constante e excessiva desses receptores por seus ligantes ou por outros fatores como citocinas e os produtos bacterianos LPS e o ácido lipoteicoico (LTA) presentes na circulação sanguínea durante a sepse, geram um aumento da expressão de duas enzimas conhecidas como a quinase 2 e a quinase 5 de

receptor acoplado à proteína G (GRK-2 e GRK-5, respectivamente) (Arraes *et al.*, 2006; Alves-Filho *et al.*, 2009). Essas enzimas promovem fosforilação dos GPCRs, levando a sua dessensibilização e internalização. Isso resulta na redução significativa da sinalização intracelular que culmina na redução da polimerização da actina nos neutrófilos, um evento crítico para a atividade quimiotática.

Além da dessensibilização dos receptores quimiotáticos e consequente redução da quimiotaxia, estudos demonstram também que durante a sepse, há uma redução do rolamento e da adesão dos leucócitos ao endotélio vascular (Alves-Filho *et al.*, 2008). Na sepse grave polimicrobiana, Gram-negativa ou Gram-positiva, os mecanismos de rolamento e de adesão dos neutrófilos ao endotélio vascular estão drasticamente reduzidos (Benjamim *et al.*, 2002; Crosara-Alberto *et al.*, 2002). Portanto, o conjunto de dados sugere que a falência da migração de neutrófilos para o foco infeccioso compromete diversas etapas da migração celular, incluindo a dessensibilização dos receptores para os fatores quimiotáticos e redução do rolamento e adesão e quimiotaxia dos neutrófilos.

Apesar dos mecanismos envolvidos na dessensibilização dos receptores e a redução do rolamento e da adesão não estarem totalmente elucidados, evidências sugerem que são consequências da ativação sistêmica de TLRs e das altas concentrações sistêmicas de citocinas e quimiocinas (Alves-Filho *et al.*, 2006; Alves-Filho *et al.*, 2009). As mesmas citocinas e quimiocinas, como TNF- α e IL-8, que são importantes para a migração de neutrófilos para o foco infeccioso, quando presentes em altas concentrações na circulação, diminuem a capacidade dos neutrófilos de migrarem para os sítios de infecção ou inflamação (Gimbrone *et al.*, 1989). Reforçando essa idéia, observou-se que a administração endovenosa de TNF- α e IL-8 promove uma redução na capacidade dos neutrófilos de rolarem e aderirem ao endotélio vascular e de migrarem para locais de inflamação (Tavares-Murta *et al.*, 1998). A incubação *in vitro* de neutrófilos com

altas concentrações de IL-8 promove a dessensibilização dos receptores CXCR2 e, conseqüentemente, redução da atividade quimiotática (Rios-Santos *et al.*, 2007). Sabe-se que durante a sepse, a produção excessiva de citocinas e quimiocinas na circulação induz a expressão da enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS) que leva ao aumento da produção sistêmica de óxido nítrico (NO) (Benjamim *et al.*, 2000; Benjamim *et al.*, 2002). Nesse sentido, estudos experimentais demonstram que os mecanismos pelos quais as citocinas e quimiocinas circulantes promovem a falência do recrutamento de neutrófilos são, pelo menos em parte, mediados pelo NO. De fato, a administração de doadores de NO diminui o rolamento e adesão de neutrófilos ao endotélio vascular, enquanto a inibição farmacológica ou a deficiência gênica da iNOS potencializa as interações entre leucócito-endotélio (Kubes *et al.*, 1991; Spiecker *et al.*, 1998; Secco *et al.*, 2003). Além disso, a redução da migração de neutrófilos para locais de inflamação induzida pela administração endovenosa de TNF- α e IL-8 também foi prevenida pela inibição da iNOS (Tavares-Murta *et al.*, 1998). A inibição da iNOS, tanto pelo uso de antagonistas farmacológicos específicos como pelo uso de animais geneticamente deficientes da enzima, resulta também em uma efetiva prevenção da redução do rolamento e adesão dos neutrófilos ao endotélio vascular e também da migração e da dessensibilização dos receptores quimiotáticos na sepse grave (Benjamim *et al.*, 2002; Rios-Santos *et al.*, 2007). Dados da literatura sugerem que esses efeitos do NO são parcialmente mediados pela ativação da guanilato ciclase solúvel (GCs) e conseqüente formação de 3'5' guanosina monofosfato cíclica (GMPc) (Ahluwalia *et al.*, 2004; Dal Secco *et al.*, 2006).

1.3.3. Proteínas de fase aguda e falência da migração de neutrófilos durante a sepse

Além do aumento do NO, outra conseqüência do aumento de citocinas séricas é a alteração no perfil biossintético do fígado. Em condições fisiológicas, o fígado sintetiza um grande número de proteínas plasmáticas em concentrações que se mantêm até que seja rompido o estado de

homeostasia do organismo. Durante uma reação de fase aguda, muitas dessas proteínas possuem seus níveis plasmáticos alterados, sendo denominadas proteínas de fase aguda (APPs). APP é definida quando sua concentração aumenta (positiva APP) ou diminui (negativa APP) em pelo menos 25% durante um processo inflamatório. Embora muitas APPs sejam sintetizadas por hepatócitos, outros tipos celulares também são capazes de sintetizá-las, incluindo monócitos, neutrófilos, células endoteliais, fibroblastos e adipócitos (Baumann e Gauldie, 1994).

Durante um processo inflamatório a expressão das APPs é induzida principalmente pelas citocinas IL-1 β , IL-6 e TNF- α . As apolipoproteínas séricas amiloide 1 e 2 (*serum amyloid A*, SAA1 e SAA2) são consideradas as principais APPs e suas concentrações podem aumentar mais de 1.000 vezes. Outras importantes APPs são a proteína C-reativa (*C-reactive protein*, CRP) e a alfa-1-glicoproteína ácida (AGP). Componentes do sistema complemento, proteínas transportadoras de ferro como haptoglobina e a hemopexina (Hx), proteínas do sistema de coagulação, proteínas com atividade fibrinolítica e inibidores de proteases também possuem suas concentrações aumentadas durante uma resposta de fase aguda (Ceciliani *et al.*, 2002).

Diversas são as funções das APPs, as quais podem contribuir tanto para o início do processo inflamatório como para o controle da inflamação, dessa forma, atuando em diferentes fases e locais durante este processo (Ceciliani *et al.*, 2002). Durante a sepse muitas APPs encontram-se elevadas no sangue, como CRP, AGP e SAA, as quais podem contribuir significativamente para o desenvolvimento desta patologia. Neste contexto, demonstramos que a administração por via intravenosa (*i.v.*) de soro séptico humano inibiu a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal induzida por carragenina em ratos. Através das técnicas de cromatografia em resina Blue-Sepharose e HPLC nós isolamos as proteínas com atividade inibitória sobre a migração dos neutrófilos. A dedução da sequência de aminoácidos por espectrometria de massa dessas proteínas

identificou a proteína de fase aguda AGP. Tanto a proteína isolada no nosso laboratório como a AGP comercial administradas por via *i.v.*, mimetizam o efeito do soro séptico, ou seja, inibem a migração de neutrófilos. O mecanismo de ação inibitória da AGP sobre o rolamento, adesão e migração de neutrófilos ocorre através da inibição da ativação da iNOS e consequente produção de NO (Mestriner *et al.*, 2007).

Anteriormente, nós também sugerimos que outra proteína de fase aguda, a Hx, também é um dos mediadores da falência da migração dos neutrófilos para o foco infeccioso durante a sepse. Soro coletado duas horas após a indução de sepse grave em camundongos, quando administrado por via *i.v.* em camundongos hígidos, inibiu a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal induzida por diferentes estímulos inflamatórios. A purificação através de cromatografias e eletroforeses e pela dedução de sequência de aminoácidos por espectrometria de massa, nós identificamos que a Hx estava presente nesse soro e tinha a atividade de inibir a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de camundongos. Dessa forma, estes resultados preliminares sugerem que a Hx possa mediar a redução da migração dos neutrófilos para o foco infeccioso já nas primeiras horas do desenvolvimento da sepse grave (resultados em Anexo 1).

Assim como na sepse, as APPs encontram-se elevadas em outras condições patológicas como na diabetes (Mcmillan, 1989), doença na qual também observa-se falência da migração de neutrófilos e correlaciona-se com alta incidência de infecções (Pereira *et al.*, 1987; Butler *et al.*, 2005; Talbot, 2005; Zgonis e Roukis, 2005).

1.4. DIABETES MELLITUS

1.4.1. Considerações Gerais da Diabetes Mellitus

A diabetes mellitus do tipo 1 é uma das doenças autoimunes mais prevalentes no mundo e acomete cerca de 10 a 20 milhões de pessoas. Essa doença se desenvolve com maior frequência na

infância e na adolescência, mas também pode se manifestar na fase adulta. De maneira similar às demais disfunções autoimunes, a etiologia da diabetes mellitus ainda permanece obscura, mas sabe-se que o risco de desenvolvimento da doença é determinado por fatores genéticos e pela interferência de fatores ambientais que incluem infecções virais, produtos alimentares, vacinação, toxinas e estresse (Rewers *et al.*, 1988).

A diabetes mellitus caracteriza-se pela disfunção do pâncreas decorrente da destruição seletiva das células β presentes nas ilhotas pancreáticas, as quais produzem insulina. Esse processo destrutivo leva à falta do hormônio insulina, resultando em hiperglicemia devido à diminuição da captação de glicose circulante. O início da hiperglicemia é precedido por um período pré-clínico designado como insulite devido à infiltração das células mononucleares, incluindo linfócitos T e B, monócitos, células dendríticas e natural “killers” nas ilhotas pancreáticas. A doença clínica se manifesta somente após a destruição de 80-90% das células β . Neste estágio, os pacientes precisam de tratamento diário com insulina para sobreviver, uma vez que os distúrbios metabólicos levam progressivamente à depressão do sistema nervoso central, coma e morte. Além disso, a diabetes mellitus é a principal causa de insuficiência renal, cegueira, amputação, doenças cardiovasculares e morte de prematuros (Notkins, 2002).

1.4.2. Diabetes mellitus e infecções

Infecção é uma complicação comum e frequentemente grave em pacientes com diabetes mellitus. A mortalidade de pacientes diabéticos ocasionada por infecções está em torno de 22% (Smitherman e Peacock, 1995; Joshi *et al.*, 1999). Além disso, os modelos experimentais de diabetes mellitus demonstram um aumento da susceptibilidade desses animais a infecções por *K. pneumoniae* (Wu e Tsai, 2005), *L. monocytogenes* (Ikejima *et al.*, 2005); *Streptococcus sp* (Puliti *et*

al., 2006) e *M. tuberculosis* (Martens *et al.*, 2007). Embora na literatura esteja bem estabelecido que o desenvolvimento da diabetes mellitus favoreça o surgimento de infecções, assim como o aumento da gravidade, pouco se sabe a respeito dos mecanismos que levam à imunossupressão nesta patologia (Geerlings e Hoepelman, 1999; Geerlings *et al.*, 2000).

Neste contexto, deficiências nas funções dos neutrófilos foram descritas em pacientes e em modelos experimentais de diabetes. Dentre essas deficiências estão: adesão e migração ao sítio inflamatório (Delamaire *et al.*, 1997), quimiotaxia (Sannomiya *et al.*, 1997), fagocitose (Panneerselvam e Govindasamy, 2003) e atividade microbicida (Alba-Loureiro *et al.*, 2006). A principal consequência da alta susceptibilidade dos diabéticos a infecções é o desenvolvimento de sepse, e suas variantes como a sepse grave e o choque séptico (Gupta *et al.*, 2007).

Como descrito anteriormente, novas descobertas têm atribuído um papel imunomodulatório para as APPs, consideradas por muito tempo apenas como marcadores bioquímicos (Morley e Kushner, 1982; Ceciliani *et al.*, 2002). Neste contexto, altos níveis circulantes de AGP e mudanças na glicosilação dessa proteína foram descritos em pacientes com diabetes mellitus (Gomes *et al.*, 2003). Dessa forma, assim como na sepse, a AGP pode inibir a migração dos neutrófilos durante um processo infeccioso em pacientes e/ou animais com diabetes.

2. HIPÓTESE

2. HIPÓTESE

Nossa hipótese é que a proteína de fase aguda Hx seja um mediador precoce da falência da migração de neutrófilos durante a sepse grave experimental e contribua significativamente para a mortalidade durante esta patologia. Além disso, os altos níveis séricos de AGP durante a diabetes mellitus possam levar à inibição da migração dos neutrófilos durante um processo infeccioso e, como consequência, levar ao aumento da mortalidade.

3. OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

Investigar o papel da Hx na gênese da resposta inflamatória sistêmica e também na falência da migração de neutrófilos durante a sepse. Além disso, investigar o papel da AGP na susceptibilidade dos camundongos diabéticos a infecções.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Animais

Foram utilizados camundongos machos (18 – 25 g) da linhagem C57BL/6, deficientes para o receptor do tipo Toll 2 (TLR2^{-/-}), C3H/HeJ (TLR4-deficiente), C3H/HePas (TLR4-constitutivo), deficientes para a molécula MyD88 (MyD88^{-/-}) e Swiss (22 – 25 g) obtidos do biotério do Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo. Também foram utilizados camundongos machos SV129 e animais deficientes para Hx (Hx^{-/-}) obtidos do Departamento de Biotecnologia Molecular, Universidade de Torino, Torino, Itália. Os resultados apresentados com animais Hx^{-/-} foram realizados no Departamento de Biotecnologia Molecular, Universidade de Torino, Torino, Itália, sob orientação dos Professores Emanuela Tolosano e Emilio Hirsch. Os animais foram mantidos em gaiolas, em um ambiente com temperatura controlada (22 a 24 °C) e receberam água e ração *ad libitum*. Os experimentos foram conduzidos de acordo com o Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, SP. Projeto aprovado sob o número de processo 089/2006.

4.2. Modelos de Sepses

A sepsis foi induzida pelo modelo de CLP (Wichterman *et al.*, 1980). Os animais foram anestesiados com Ketamina (62,5 mg/kg) e Xilazina (12,5 mg/kg) e uma incisão mediana de aproximadamente 1 cm foi efetuada no abdômen. O ceco foi exposto, envolto com um fio de algodão abaixo da válvula íleo-cecal e perfurado com agulha estéril. Para os animais C57BL/6 foi utilizado agulha 30 G (2 furos para o grupo sepsis não grave, SNG) ou agulha 18 G (2 furos para o grupo sepsis grave, SG). Em seguida o ceco foi recolocado no abdômen, fechando-se a cavidade. Para os animais Swiss, SV129, Hx^{-/-} foi utilizado agulha 30 G (4 furos para o grupo SNG) ou

agulha 18 G (4 furos para o grupo SG). Todos os animais receberam 1 ml de salina subcutânea (sc) imediatamente após a cirurgia.

Outro modelo de sepse utilizado foi o de inoculação bacteriana por via intraperitoneal (*i.p.*) (Alves-Filho *et al.*, 2006). Os camundongos foram inoculados com 2×10^8 UFC (unidades formadoras de colônia) de bactérias *Escherichia coli* (*American Type Culture Collection*, ATCC, número 12014) ou inoculados com 1×10^7 ou 4×10^8 com *Klebsiella pneumoniae* (ATCC, número 700603). Este número de UFC foi previamente determinado de acordo com a curva de mortalidade dos animais submetidos a diferentes quantidades de bactérias.

4.3. Cultivo das Bactérias

K. pneumoniae e *E. coli* foram cultivadas durante uma semana em meio BHI a 37°C. Diariamente o falcon de 50 mL foi centrifugado (2500 g, por 15 min) e o pellet ressuscitado com 45 mL de meio BHI e mantido em estufa a 37°C. Posteriormente, as bactérias foram lavadas 3 vezes com PBS e alicotadas. O conteúdo de 3 tubos de bactérias liofilizadas foi ressuscitado em 45 mL de BHI e incubado por 18 h a 37°C. Os tubos foram centrifugados a 2500g por 15 minutos a 4°C, o sobrenadante foi descartado e o material ressuscitado em 45 mL de salina estéril 0,9%, homogeneizado para lavar as bactérias e centrifugado novamente. Esta lavagem foi realizada 2 vezes. Ao final, cada sedimento foi ressuscitado em 1 mL de salina estéril 0,9%. A seguir, foram realizadas diluições dessa suspensão em solução salina (1:10, 1:50, 1:100, 1:1.000, 1:10.000 e 1:100.000). Destas suspensões, 200 µL foram colocados em placas de 96 poços e as respectivas densidades ópticas determinadas em espectrofotômetro a 600 nm (Spectra Max-250, Molecular Devices). Concomitantemente, 10 µL das mesmas diluições foram semeadas em triplicata em placas de Petri contendo meio Agar Mueller Hinton (Difco Laboratories). Após a semeadura, as

placas foram incubadas a 37° C por 24 horas e o número de unidades formadoras de colônia contadas.

4.4. Quantificação da AGP sérica

A concentração sérica da AGP foi avaliada 1, 2, 3, 4 e 6 horas após a indução de sepse nos camundongos por imunoturbidimetria usando um kit comercial (Quibasa Química Básica Ltda., Belo Horizonte, MG, Brasil). A dosagem foi realizada de acordo com as indicações do fabricante. Método imunoturbidimétrico - ponto final com curva de calibração. Princípio do Teste: A AGP forma com o antisoro específico um complexo insolúvel, produzindo turbidez, cuja absorbância é proporcional a concentração da AGP na amostra.

4.5. Quantificação da Hx Sérica

A concentração da Hx foi avaliada no soro de camundongos por ELISA usando um kit comercial (Immunology Consultants Laboratory, Inc. Newberg, OR, EUA). Cada kit contém uma placa de 96 poços sensibilizados com anticorpo anti-Hx de camundongos, 50 mL de diluente, 50 mL de solução para lavagem da placa, anticorpo anti-Hx de camundongo conjugado, 12 mL de substrato tetrametilbenzidina (TMB), 12 mL de solução para parar a reação e calibrador com Hx de camundongo.

4.6. Migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal

A migração de neutrófilos foi avaliada 4 ou 6 horas após a indução da sepse, administração por via *i.p.* de tioglicolato (4%, 500 µl) ou administração por via *i.p.* de MIP-2 (3 – 30 ng/cavidade). Os animais foram mortos em câmara de CO₂ e as células presentes na cavidade

peritoneal coletadas com 3 mL de tampão fosfato salina (PBS) contendo ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA, 1 mM). A contagem total foi realizada através de um contador de células (Coulter Ac T series analyser; Coulter Corp., Miami, Flo, EUA) e a contagem diferencial realizada através de esfregaços corados pelo May-Grunwald Giemsa (Rosenfeld). Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão médio (EPM) do número de neutrófilos $\times 10^6$ /cavidade.

4.7. Rolamento e adesão de leucócitos na microcirculação mesenterica

O rolamento e adesão de leucócitos ao endotélio foram avaliados 2 horas após a indução de sepse, conforme metodologia descrita (Fortes *et al.*, 1991). Os animais foram anestesiados com Ketamina (62,5 mg/kg) e Xilazina (12,5 mg/kg). Através de incisão lateral cutânea na cavidade abdominal, o mesentério foi exteriorizado para a observação da microcirculação *in situ*. Os animais foram mantidos sobre uma placa aquecida (37°C), dotada de área transparente, sobre a qual o tecido foi fixado. A preparação foi mantida úmida e aquecida por irrigação com solução de PBS à 37°C. A placa aquecida foi mantida sobre o “charriot” de um microscópio óptico tri-ocular ao qual estão acoplados um fototubo, com sistema de lentes ampliadoras superpostas e um monitor de computador que permite a projeção e gravação de imagem. O aumento final foi de 3.400 vezes. Os vasos selecionados para o estudo foram vênulas com diâmetro variando entre 10 e 16 μm . 2 horas após a indução da sepse foi avaliado o rolamento de leucócitos por 10 minutos e o número de leucócitos aderidos (por mais de 30 s e durante 5 min) ao endotélio. Os resultados foram expressos como média \pm EPM do número de células aderidas/100 μm^2 e o rolamento expresso como média \pm EPM do número de células aderidas por min. Três determinações numéricas foram feitas por animal, estimando-se o resultado como média das medidas.

4.8. Isolamento dos neutrófilos

Os animais foram anestesiados com injeção *i.p.* de Ketamina (62,5 mg/kg) e Xilazina (12,5 mg/kg) e receberam heparina *i.v.* (1 U/g de peso). O sangue foi coletado por punção do plexo retro-orbital com o auxílio de pipeta Pasteur heparinizada. Já as células da medula óssea foram coletas do fêmur e tíbia dos camundongos. Os neutrófilos foram purificados através da utilização de gradiente de Percoll (Sigma, densidade 1,130 g/mL) com algumas modificações da metodologia descrita (Coelho *et al.*, 2004; Itou *et al.*, 2006). Primeiramente, foi feita uma solução contendo 9 partes de Percoll e 1 parte de Hanks concentrado 10 vezes. A partir dessa solução foram feitos dois gradientes de Percoll; um a 72% e outro a 65%, utilizando como diluente Hanks concentrado 1 vez. Em um tubo de falcon de 15 mL foram montados os gradientes, primeiro o Percoll 72% e posteriormente acrescido lentamente o gradiente de Percoll 65%. Um mL de sangue diluído em 1 mL de Hanks (1x) ou 1 mL de Hanks contendo as células da medula óssea de 1 camundongo foram acrescentadas lentamente aos gradientes. Os tubos foram centrifugados por 30 min a 1.200 g, aceleração e desaceleração lenta, a 22^oC. Após a centrifugação, observaram-se duas camadas de células, sendo a superior a camada rica em células mononucleares e a camada inferior rica em neutrófilos. A camada de células rica em neutrófilos foi coletada e submetida à lise das hemácias com tampão de cloreto de amônio (NH₄Cl). As células foram centrifugadas a 400 g, a 22^oC. Em seguida, os neutrófilos foram lavados com solução de Hanks por 2 vezes. Posteriormente, o sobrenadante foi desprezado e as células resuspensas em meio RPMI. A contagem total de leucócitos foi realizada em câmara de Neubauer e a pureza dos neutrófilos em lâminas através de esfregaços corados pelo método May-Grunwald Giemsa. A viabilidade das células foi observada por exclusão em azul de tripan.

4.9. Ensaio de quimiotaxia

Após a separação, 1×10^6 neutrófilos/mL foram ressuspensos em meio RPMI/albumina sérica bovina (BSA, 0,1 %) e incubados a 37°C na presença de meio ou meio adicionado de diferentes drogas. Os neutrófilos foram lavados com solução de Hanks, ressuspensos em 1 mL com RPMI/BSA (0,1 %) e os ensaios de quimiotaxia *in vitro* realizados em Câmara de Boyden utilizando diferentes estímulos (C5a 50 e 100 nM, IL-8 10 ng/mL ou MIP-2 3 - 30 ng/mL, PeproTech Inc., Rocky Hill, NJ, EUA). Após 1 h de incubação das células com os estímulos quimiotáxicos, a membrana foi retirada do sistema e corada com o kit Diff-Quik (Baxter Scientific Products; Baxter Health Corporation, McGaw Park, IL – EUA) e colocada sobre uma lâmina de vidro para a quantificação das células. Os neutrófilos foram contados em microscópio óptico, cinco campos (1.000X) em cada poço. Os resultados foram expressos pela média \pm EPM do número de neutrófilos por campo.

4.10. Formação do complexo Hx-heme e BSA-heme

Hx ou BSA foram complexadas ao grupamento heme em uma razão molar de 1:1 em PBS, pH 7,4, por 1 hora a 37°C .

4.11. Determinação dos níveis de desidrogenase láctica (LDH) no sobrenadante de neutrófilos

Os níveis de LDH foram determinados de acordo com as instruções do fabricante utilizando kit comercial proveniente da Labest Diagnóstica. Princípio do teste: A LDH catalisa a conversão do piruvato a lactato na presença de NADH. O decréscimo na absorbância em 340 nm é devido a oxidação do NADH é proporcional à atividade da LDH na amostra.

4.12. Avaliação do número de bactérias no lavado peritoneal e no sangue

O conteúdo de bactérias no sangue e lavado peritoneal foi determinado 6 horas após a indução da sepse. Os animais foram mortos e a cavidade peritoneal lavada com 1,5 mL de solução PBS estéril e o sangue coletado por punção cardíaca. Em alíquotas de 10 µL de amostra, foram realizadas diluições logarítmicas seriadas, posteriormente semeadas em meio Mueller–Hinton (Difco Laboratories, Detroit, Mich.). As UFCs foram contadas após incubação *overnight* a 37°C. Os resultados foram expressos por logaritmo de UFC/10µL.

4.13. Atividade de mieloperoxidase (MPO)

A atividade da MPO foi avaliada no pulmão e coração como quantificação indireta do número de leucócitos (Souza *et al.*, 2000). Os tecidos foram coletados, homogeneizados em tampão (0,1 M NaCl, 20 mM NaPO₄, 15 mM NaEDTA), pH 4,7 e centrifugado a 2.000 g por 10 minutos. O sedimento foi submetido à lise hipotônica (NaCl 0.2 %). Após nova centrifugação, foi acrescentado ao sedimento tampão (50 mM NaPO₄ contendo 0,5% de brometo de amônio hexadeciltrimetil, H-TAB). O homogenato foi congelado e descongelado em nitrogênio líquido (3 vezes) e em seguida centrifugado (15 min, 8.000 g). Atividade de MPO foi avaliada no sobrenadante usando como substrato TMB (1,6 mM) e H₂O₂ (0,5 mM) e lido em espectrofotômetro a 450 nm. Como curva padrão do número de neutrófilos foram coletados neutrófilos da cavidade peritoneal e determinado a atividade da MPO por neutrófilo. Os resultados foram expressos pelo número de neutrófilos por mg de tecido.

4.14. Quantificação de citocinas e quimiocinas

A quantificação de citocinas no soro e lavado peritoneal foi realizada 6 horas após a indução de sepse. Os animais foram anestesiados e o sangue coletado por punção cardíaca e a cavidade peritoneal lavada com 1,5 ml de solução estéril de PBS/EDTA (1 mM). As dosagens de TNF- α , IL-1 β , IL-6, MIP-2 e KC foram realizadas através do método imunoenzimático ELISA. Placas de 96 poços foram cobertas com 50 μ L/poço do anticorpo específico anti-TNF- α (2 μ g/mL), anti-IL-6 (2 μ g/mL), anti-IL-1 β (2 μ g/mL), anti-MIP-2 (1 μ g/mL) e anti-KC (2 μ g/mL) (Pharmigen, San Diego, CA, EUA). Estes anticorpos foram diluídos em solução de ligação (binding buffer) pH 9,0 e incubados por 18-24 horas a 4°C. As placas foram lavadas por três vezes com PBS/Tween-20 (0,05% Sigma). As ligações não específicas foram bloqueadas com 100 μ L de PBS/BSA 1% por 120 minutos em temperatura ambiente. As amostras e o padrão (curva padrão) contendo as concentrações para TNF- α (2.000 pg/mL), IL-6 (4.000 pg/mL), IL-1 β (4.000 pg/mL), MIP-2 (4.000 pg/mL) e KC (4.000 pg/mL) (Pharmigen) foram colocados nas placas (50 μ L) e incubados por 18-24 horas a 4°C. Após esse período, as placas foram lavadas com PBS/Tween e 50 μ L dos anticorpos biotinizados específicos para cada citocina foram adicionados nas concentrações: TNF- α (1:1.000), IL-6 (1:1.000), IL-1 β (1:1.000), MIP-2 (0,2 μ g/mL) e KC (0,2 μ g/mL). Após uma hora, as placas foram lavadas com PBS/Tween e o conjugado avidinaperoxidase, na diluição de 1/5.000 adicionado a cada poço e as placas incubadas por 30 min. As placas foram lavadas com PBS/Tween e 100 μ L do substrato OPD (o-fenilenediaminadihidrocloro; Sigma) em tampão substrato (pH 5,0) foram adicionados. As placas então foram incubadas por 15 a 20 min em temperatura ambiente. A reação foi interrompida com 50 μ L de H₂SO₄ (1 M) e a densidade óptica medida a 490 nm em espectrofotômetro (Spectra Max-250, Molecular Devices). Os resultados foram expressos em pg/mL.

4.15. Western blot

Para análise por *Western blot*, o sangue foi coletado de camundongos Wild-type (Wt, SV129) e Hx^{-/-} 2 horas após a indução de SG (n=5). O sangue foi centrifugado e foi realizado um *pool* de soro proveniente de camundongos Wt e um *pool* de soro proveniente de camundongos Hx^{-/-}. Esta análise também foi realizada com um *pool* de neutrófilos isolados da medula óssea de 3 camundongos Wt e outro *pool* de neutrófilos isolados da medula óssea de 3 camundongos Hx^{-/-}. Quarenta microgramas de proteína de cada amostra foram separadas por gel de poliacrilamida 10% (SDS-PAGE) e transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Amersham). A membrana foi incubada *overnigh* a 4°C com anticorpo monoclonal anti-Hx (1:5.000) ou anticorpo monoclonal anti-vinculina (1:4.000). Posteriormente, as membranas foram incubadas com os anticorpos secundários específicos conjugados com peroxidase (Southern Biotechnology Associates, Birmingham, AL) e revelados com o sistema ECL (Amersham).

4.16. PCR Real Time para Hx

RNA foi extraído com kit comercial (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. Os *primers* para Hx foram *forward* 5'-ATC TCA GCG AG GTG GAA GAA TC-3', *reverse* 5'-CCT TCA CTC TGG CAC TCT CCA C-3'. As condições de reação foram 95°C/2 min; 95°C/30 seg, 60°C/30 seg, 72°C/30 seg para 35 ciclos e monitorados pelo programa ABIPrism (Applied Biosystems). A expressão do gene da Hx foi normalizada pelos níveis do RNAr 18S para cada amostra de RNA.

4.17. PCR *Real Time* para AGP

Seis horas após a cirurgia os camundongos foram mortos e o fígado coletado em nitrogênio líquido, mantidos a -70°C até a realização dos ensaios. Para a extração do RNA total as amostras foram trituradas como auxílio de gral e pistilo autoclavados e tratados com água DEPC (Dietil-pirocarbonato) para evitar ação de RNAses. Cada amostra foi colocada em um tubo tipo *ependorfe* com reagente Trizol (1 mL para cada mg de tecido), agitados vigorosamente por 30 s e deixados a T ambiente por 5 min. Para cada 1 mL de suspensão foram adicionados 200 μL de clorofórmio (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), e centrifugadas a 12.000 g por 15 min a 4°C . A fase aquosa foi transferida para um tubo novo, ao qual foi adicionado o mesmo volume de isopropanol; em seguida agitados vigorosamente e incubados por 2 h a -20°C para precipitar o RNA da fase aquosa. Novamente os tubos foram centrifugados a 12.000 g por 15 min a 4°C . O precipitado foi lavado em etanol 100% e secado a T ambiente com o tubo invertido em papel filtro. As amostras de RNA foram ressuspensas em 50 μL de água deionizada e livre de RNAses e armazenadas a -20°C . Uma alíquota de 5 μL foi utilizada para a quantificação da concentração de RNA/ μL nas amostras usando o aparelho GeneQuant (Pharmacia, EUA). Uma amostra de 1 μg de RNA foi utilizada para a produção do DNA complementar, de acordo com as instruções do fabricante (Superscript II, Gibco Life Technologies, Grand Island, NY, EUA).

A análise quantitativa do gene da AGP foi realizada por meio de reações de *Real Time* PCR utilizando o sistema fluorescente SYBR Green (Applied Biosystems, Warrington, RU). Esse sistema realiza as reações de amplificação, detecção e quantificação das amostras (ABI Prism Software) por meio de nucleases fluorogênicas utilizadas na reação, sendo tal expressão normalizada com base em controles endógenos. O DNA complementar sintetizado a partir do RNA mensageiro foi utilizado juntamente com reagentes SYBR Green, como especificado pelo

fabricante. As condições de reação foram de 40 ciclos de 94°C/1 min; 56°C/1 min, 72°C/2 min. Nas reações com o SYBR Green, um ciclo final de 20 min com T crescente de 60 a 95°C foi empregado para obtenção de uma curva de dissociação dos produtos da reação, utilizada para a análise da especificidade de amplificação. Os resultados foram analisados com base no valor de TC (threshold cycle) ou linha de corte, definido após a reação, sendo este o ponto correspondente ao número de ciclos em que a amplificação atinge o limiar que permite a análise quantitativa da expressão do fator avaliado.

Os pares de primers para β -actina e AGP foram: AGP *forward*: 5`-CAC AGC AAA TAG TTC AAC CA-3; AGP *reverse*: 5`-CAA AGG TTT CTA CTC CTC CT-3`; β -actina *forward*: 5`-AGC TGC GTT TTA CAC CCT TT-3`; β -actina *reverse*: 5`-AAG CCA TGC CAA TGT TGT CT-3`.

4.18. Citometria de fluxo para análise da expressão de CXCR2, CD62L e CD11b

A análise de citometria de fluxo foi realizada em sangue total e em neutrófilos isolados do sangue ou da medula óssea.

Os animais foram anestesiados com injeção *i.p.* de Ketamina (62,5 mg/kg) e Xilazina (12,5 mg/kg) e receberam heparina *i.v.* (1 U/g de peso). Em seguida, o sangue dos camundongos foi coletado por punção do plexo retro-orbital com o auxílio de pipeta Pasteur heparinizada. Cem μ L de sangue total foram incubadas por 30 min a 4° C com os anticorpos monoclonais anti-Gr1 conjugado com proteína clorofil de peridina (PercP) (1:200; BD Biosciences) e anti-CXCR2 conjugado com ficoeritrina (PE) (1:50; R&D Systems). Em outro tubo os neutrófilos foram incubados com anticorpo anti-GR1-PercP, anti-CD62L-PE e anti-CD11b-FITC (fluoresceína) Em seguida as hemácias foram lisadas com tampão de lise cloreto de amônio e as células lavadas 2

vezes com 2 mL do tampão PBS-BSA 0.5%. Posteriormente, as células foram ressuspensas em 200 µl de PBS-formol a 1%. A análise de citometria de fluxo foi realizada usando um FACSort® (Becton Dickinson, San Jose, CA, EUA).

Os neutrófilos foram isolados da medula óssea ou do sangue dos animais como anteriormente descrito. Após isolamento, as células foram estimuladas com AGP, Hx ou LPS ou previamente incubadas com inibidores. Posteriormente as células foram lavadas com PBS a 4^oC e incubadas com 50 µL de anticorpo anti-CD16/CD32 (Fc block, clone 2.4G2; BD Pharmingen) durante 40 minutos a 4 °C. Em seguida, as amostras foram incubadas por 30 minutos a 4° C com dois anticorpos monoclonais anti-Gr1-Percp (1:200; BD Biosciences) e anti-CXCR2-PE (1:50; R&D Systems) ou com anti-GR1-PerCP, anti-CD62L-PE e anti-CD11b-FITC. Em seguida, a solução com as células foi lavada com 2 mL do tampão PBS-BSA 0,5% e ressuspensas em 200 µl de PBS-formol a 1%. A análise de citometria de fluxo foi realizada usando um FACSort®.

4.19. Imunofluorescência para GRK-2

Para o ensaio de imunofluorescência, as lâminas contendo os leucócitos totais do sangue, foram permeabilizadas com PBS contendo Triton X-100 0.2% (Amersham Pharmacia Biotech, San Francisco, CA, EUA) por 5 minutos. Em seguida, as lâminas foram lavadas com PBS e incubadas com albumina sérica bovina 1% (BSA, Sigma) contendo soro normal de cabra (1:50) por 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, as lâminas foram incubadas “overnight” a 4 °C com o anticorpo policlonal anti-GRK-2 feito em coelho (1:200; Santa Cruz biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA). A seguir, as lâminas foram lavadas com PBS e incubadas com o composto fluorescente vermelho Alexa Flúor 594 (anti-coelho feito em cabra; 1:400; Invitrogen, Eugene, Oregon, EUA) por 1 hora a temperatura ambiente. As lâminas foram lavadas e incubadas com DAPI 1 mM e, posteriormente montadas usando uma solução de fluormounte em PBS. As imagens

das células marcadas foram capturadas utilizando-se um microscópio de epifluorescência (BX-40; Olympus, Japan) equipado com filtros apropriados (aumento de 400 x).

4.20. Modelo de Diabetes

Os animais foram mantidos com privação de comida por 12 h e a diabetes induzida pela administração por via *i.v.* de aloxana (50 mg/kg, Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, EUA) em 100 µL de salina. O grupo controle recebeu 100 µL de salina por via *i.v.* Os camundongos foram considerados diabéticos com níveis de glicose sanguínea maiores que 300 mg/dL 5 dias após o tratamento com aloxana. Amostras de sangue foram coletadas da cauda dos animais e os níveis de glicose medidos por um glicômetro (Precision Xtra Abbott, Alameda, CA, EUA). Os camundongos foram tratados 2 vezes por dia com salina ou insulina por via subcutânea (*s.c.*) durante 5 dias a partir do quinto dia após o tratamento intravenoso e divididos nos seguintes grupos: Não-Diabéticos + salina; Diabéticos + salina; Diabéticos + insulina. O grupo tratado com insulina foi tratado com dois tipos de insulina, pela manhã com insulina de pâncreas bovino (Sigma) e no início da noite com insulina glargina (insulina de longa ação, Sanofi-aventis Atlanta, GA, EUA). As insulinas foram administradas nas doses de 1 UI para cada 200 mg/dL de glicose sanguínea.

4.21. Análise dos resultados

A sobrevivência dos animais foi expressa como porcentagem de animais sobreviventes e o teste X^2 foi utilizado para determinar as diferenças entre as curvas de sobrevivência. Os demais resultados serão expressos com média \pm EPM e foram analisados pela Variância de uma via (ANOVA) seguida pelo teste de Bonferroni para a determinação da significância entre os grupos, sendo que as diferenças consideradas significativas para valores de $P < 0,05$.

5. REAGENTES E SOLUÇÕES

5. REAGENTES E SOLUÇÕES

5.1. Tampão fosfato em salina (PBS) 10 X

Cloreto de Sódio (<i>NaCl, Merck, Darmstadt, GER</i>)	80 g
Cloreto de Potássio (<i>KCl, Merck, Darmstadt, GER</i>)	2 g
Fosfato de Sódio dibásico (<i>Na₂HPO₄, Merck, Darmstadt, GER</i>).....	11,5 g
Fosfato de Potássio monobásico (<i>KH₂PO₄, Merck, Darmstadt, GER</i>).....	20 g
Água Mili-Q q.s.p.....	1000 mL

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

5.2. Tampão fosfato em salina (PBS) 1 X

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

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

5.3. PBS – EDTA

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

5.4. Solução de tribromoetanol 2,5%

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

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

5.5. Meio ágar Mueller-Hinton

Ágar Mueller-Hinton (<i>OXOID, Basingstok, Hampshire, England</i>)	38 g
Água deionizada q.s.p.	1 L

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

5.6. Solução de Triton X-100 0,2%

Triton X-100 (<i>Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA</i>)	200 µL
Água Mili-Q q.s.p.	100 mL

5.7. Tampão de lise

Cloreto de amônio (NH_4Cl , Merck, Rio de Janeiro, BR)	8,04 g
EDTA (Merck, Rio de Janeiro, BR)	0,36 g
Bicarbonato de sódio (NaHCO_3 , Vetec, Rio de Janeiro, BR)	0,64 g
Água Mili-Q q.s.p.	1 L

5.8. Meio RPMI

Meio RPMI-1640 (<i>Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA</i>)	10,4 g
Hepes (<i>Merck, Darmstadt, GER</i>)	2,38 g
NaHCO_3 (Vetec, Rio de Janeiro, BR)	2,20 g
Água Mili-Q q.s.p.	1 L

O pH da solução foi ajustado a 7,2, em seguida a solução foi filtrada a vácuo e mantida a 4°C até o uso.

5.9. Meio RPMI + 0,1% de BSA

RPMI.....100 mL

BSA (*Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA*).....0,01 g

5.10. Corante Panótico Rápido (LaborClin)

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

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

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

5.11. Tampões utilizados para o ensaio de ELISA

5.11.1. Solução de ligação (binding buffer) pH 9.0

Na₂PO₄ (*Merk, Darmstadt, GER*)0,1 M

5.11.2. Tampão substrato pH 5.0

Ácido cítrico (*Merk, Darmstadt, GER*)34,7 mM

Na₂PO₄ (*Merk, Darmstadt, GER*) 66,7 mM

5.11.3. Substrato

OPD (*Sigma, St. Louis, MO,EUA*).....0,4 mg

H₂O₂ (*Merk, Darmstadt, GER*)0,4µL

Tampão substrato q.s.p.1 mL

5.12. Soluções utilizadas para o ensaio de MPO

5.12.1. Tampão NaPO₄ 0,08M

Solução A: NaH₂PO₄ (Merck)12,48 g/L

Solução B: Na₂HPO₄ (Merck)11,35 g/L

Solução A: 196 ml + Solução B 4,0 mL. O pH foi ajustado para 5,4.

5.12.2. Tampão NaPO₄ 0,05M

Tampão NaPO₄ 0,08M (Merck)125
mL

Água Milli-Q75 mL

5.12.3. Solução de H-TAB 0,5 %

Brometo de hexadeciltrimetil amônio, H-TAB (Sigma)1 g

Fosfato de sódio, NaPO₄ 0,05M (Merk)200 mL

Ajustar pH 5,4

5.12.4. Solução de TMB (3,3',3,3' - tetrametil-benzidina)

TMB (Sigma)3,845 mg

Dimetil sulfóxido (DMSO)1.000 µL

5.12.5. Solução de peróxido de hidrogênio (H₂O₂)

Peróxido de hidrogênio, H₂O₂ 3 %10,0 µL

Fosfato de sódio, NaPO₄ 0,08M (Merck)12,5 mL

5.13 Hanks 10x

NaCl80 g

KCl4 g

Glicose10 g

KH₂PO₄600 mg

Na₂HPO₄475 mg

Fenol *red*170 mg

pH 7,2

Água miliQ q.s.p.....100 mL

5.14. Hanks 1x

NaCl80 g

KCl4 g

Glicose10 g

KH₂PO₄600 mg

Na₂HPO₄475 mg

Fenol *red*170 mg

pH 7,2

Água miliQ q.s.p.....1.000 MI

6. RESULTADOS

6. RESULTADOS

6.1. Caracterização do modelo de sepse por CLP

6.1.1. Camundongos submetidos à sepse grave tiveram falência da migração de neutrófilos para o foco infeccioso e infiltrado de neutrófilos em tecidos secundários ao foco infeccioso

A Figura 1A mostra que 90% dos camundongos submetidos à SNG pelo modelo de CLP sobreviveram 7 dias após a cirurgia. No entanto, 100% dos animais submetidos à SG morreram dois dias após a infecção. Todos os animais falso-operados (FO) sobreviveram 7 dias após a cirurgia. Esses resultados confirmam dados previamente publicados pelo nosso grupo de pesquisa (Alves-Filho *et al.*, 2008).

Buscando compreender as alterações fisiopatológicas que ocorrem durante a sepse induzida por CLP, 1, 3, 6, 12 e 24 h após a indução da sepse os animais foram mortos e as células presentes na cavidade peritoneal, assim como o pulmão e o coração foram coletados. Como mostra a Figura 1B, a partir da sexta hora, os animais submetidos à SNG tiveram um aumento significativo no número de neutrófilos presentes na cavidade peritoneal em comparação com os animais FO. Entretanto, nos animais com SG o número de neutrófilos foi significativamente reduzido em comparação com os animais com SNG.

A Figura 1C mostra que na primeira hora após a indução da SG ocorreu um aumento significativo no infiltrado de leucócitos no pulmão, sendo que o aumento máximo foi registrado na terceira hora. Já na sexta hora o infiltrado de leucócitos no pulmão estava diminuído em comparação com a terceira hora, entretanto este aumento permaneceu significativo nos tempos 12 e 24 horas em comparação com os animais com SNG. No coração também pôde ser visto um aumento significativo no infiltrado de leucócitos na terceira e sexta hora após a indução de SG em comparação com os animais FO ou com SNG, sendo este aumento não observado 12 e 24 h após a SG.

Protocolo experimental Figura 1.

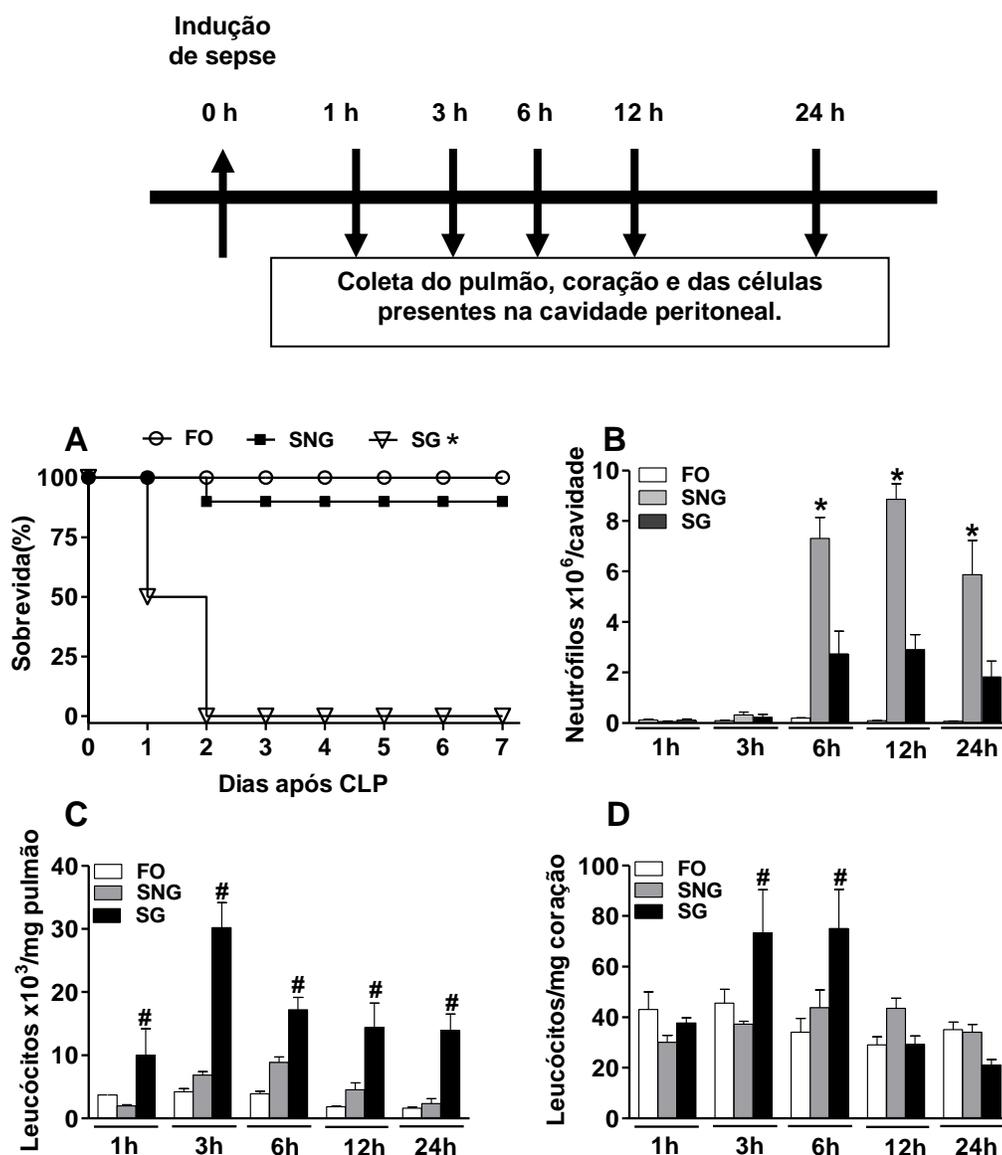


Figura 1. Camundongos submetidos à sepse grave possuem falência da migração de neutrófilos para o foco infeccioso e infiltrado de leucócitos em tecidos secundários a infecção. Camundongos foram submetidos à sepse não-grave (SNG), sepse grave (SG) ou falsos-operados (FO, *sham-operated*) pelo modelo de ligação e perfuração do ceco (CLP). (A) Taxa de sobrevivida monitorada por 7 dias. Resultados expressos em percentual de sobrevivida. * $P < 0,05$ quando comparado a SNG teste de *Mantel-Cox log-rank* ($n=10$). Uma, 3, 6, 12 e 24 h após a cirurgia os animais foram mortos e foi coletado o pulmão, coração e as células presentes na cavidade peritoneal. (B) Migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal através da contagem do número de células totais e diferenciais em microscópio óptico. Sequestro de leucócitos no (C) pulmão e (D) coração determinado através da avaliação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO). Resultados foram expressos como média \pm EPM do número de neutrófilos $\times 10^6$ /cavidade; leucócitos $\times 10^3$ /mg de pulmão; leucócitos/mg coração ($n=5$). * $P < 0,05$ comparado com FO e SG; # $P < 0,05$ comparado com FO e SNG (ANOVA, seguido por teste de Bonferroni). CLP = ligação e perfuração do ceco.

6.1.2. Nas primeiras horas após a sepse grave ocorreu diminuição do rolamento e adesão dos leucócitos ao endotélio da microcirculação mesentérica

A migração dos neutrófilos para o foco infeccioso ocorre através de uma complexa rede de interações entre os leucócitos e o endotélio como, por exemplo, o rolamento e adesão (Simon e Green, 2005). Dessa forma, avaliamos o rolamento e adesão dos leucócitos na circulação mesentérica 2 horas após a cirurgia pela técnica da microscopia intravital. A Figura 2 mostra que os animais submetidos à SNG tiveram um aumento significativo no número de neutrófilos que rolaram e aderiram ao endotélio, em comparação com os animais FO. Por outro lado, os camundongos com SG possuíram uma diminuição nesses parâmetros em comparação com os animais com SNG.

Protocolo experimental Figuras 2 e 3.

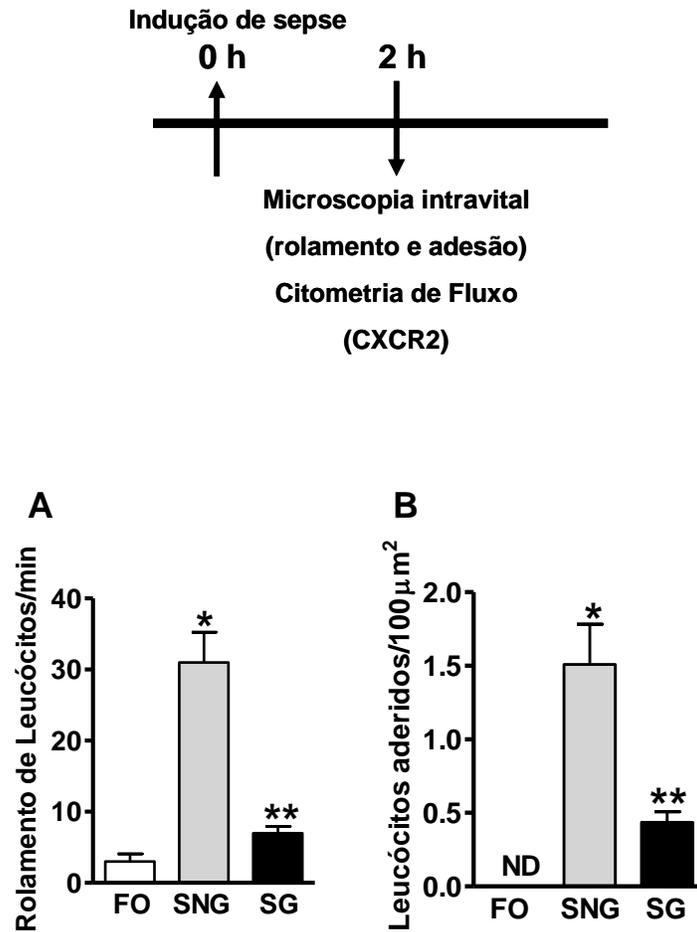


Figura 2. Camundongos com sepse grave possuem redução do rolamento e adesão dos leucócitos ao endotélio da microcirculação mesentérica. *Ex vivo* análise do rolamento (A) e adesão (B) dos leucócitos nas vênulas mesentéricas foi realizada 2 horas após a indução de sepse por CLP pela técnica da microscopia intravital. Os resultados do rolamento foram expressos como média \pm EPM do número de leucócitos que rolaram por min (leucócitos/min) e para adesão como média \pm EPM do número de leucócitos aderidos por $100 \mu\text{m}^2$ (n=5); * $P < 0,01$ comparado com FO; ** $P < 0,01$ comparado com SNG (ANOVA, seguido por teste de Bonferroni). FO = falso-operado; SNG = sepse não grave; SG = sepse grave; CLP = ligação e perfuração do ceco.

6.1.3. Camundongos com sepse grave tiveram redução da expressão do receptor CXCR2 nos neutrófilos

Durante o rolamento dos leucócitos no endotélio ocorre a ativação de receptores de quimiocinas presentes nos leucócitos pelos seus ligantes ancorados nas células endoteliais, facilitando a adesão e a migração dessas células. Entretanto, se essa ativação ocorrer nos neutrófilos circulantes essas células não migram para o foco infeccioso (Rios-Santos *et al.*, 2007).

Confirmando esses resultados, a Figura 3C mostra que neutrófilos de camundongos com SG tiveram redução significativa na expressão do receptor CXCR2 em comparação com camundongos com SNG. Figura 3A mostra um *dot-plot* que representa a granulocitose em Y pelo tamanho das células em X do sangue total dos animais; o *gate* desenhado neste painel representa os neutrófilos. Figura 3B representa as células do *gate* de neutrófilos GR-1 positivas. Figura 3C é o histograma representativo da expressão do CXCR2 das células GR-1 positivas.

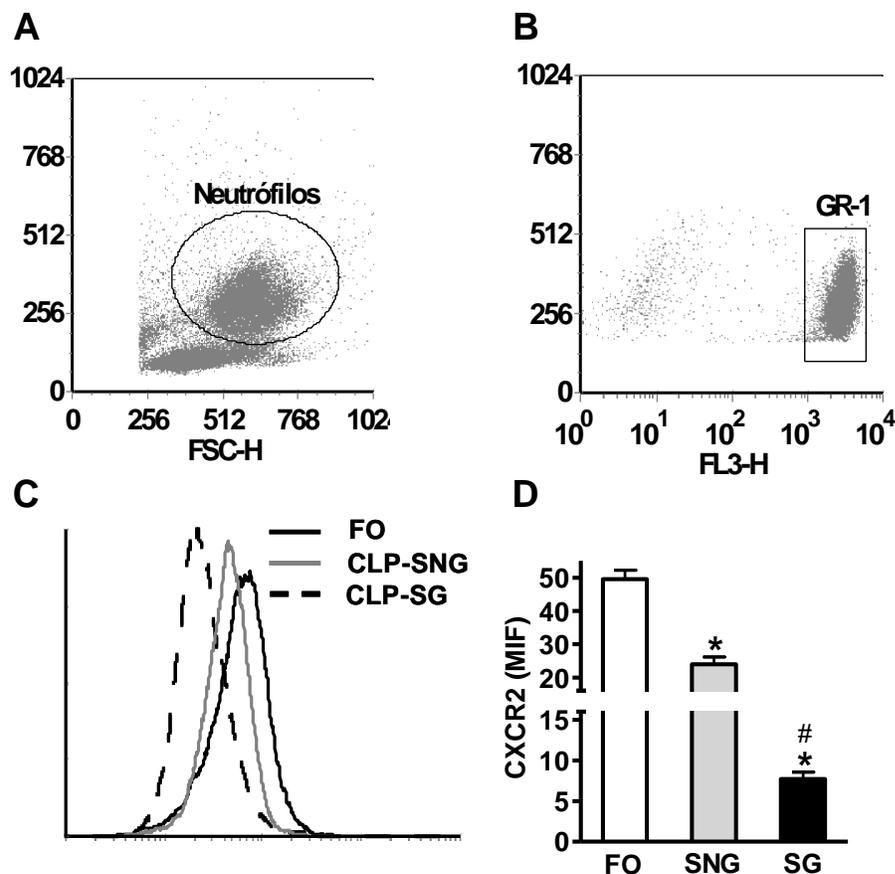


Figura 3. Camundongos com sepse grave possuem redução da expressão do receptor CXCR2 nos neutrófilos. Duas horas após a indução de sepse o sangue foi coletado e a expressão dos receptores CXCR2 avaliada nos neutrófilos. O sangue total dos animais foi marcado com anticorpo anti-GR-1 (Percy) e anti-CXCR2 (PE) ou anticorpos controles. (A) População de neutrófilos selecionadas como neutrófilos pela relação tamanho (FSC-H)/granulosidade (SSC-H). (B) Expressão da molécula GR-1 do gate de neutrófilos no painel A. (C) Histograma representativo da expressão do CXCR2 na população de células presentes no gate GR-1 do painel B, eixo Y = número de eventos; eixo X = MIF da expressão do CXCR2. (D) Quantificação da expressão do CXCR2. Os resultados foram expressos como média \pm EPM da intensidade de fluorescência (MFI) e são representativos de 2 experimentos independentes (n=5). * $P < 0,05$ comparado com FO; # $P < 0,01$ comparado com SNG. FO = falso-operado; SNG = sepse não grave; SG = sepse grave; CLP = ligação e perfuração do ceco.

6.1.4. Níveis séricos de AGP aumentaram significativamente somente seis horas após a indução de sepse grave em camundongos

Os níveis séricos de AGP estão aumentados durante um processo inflamatório sistêmico (Fournier *et al.*, 2000) e durante a sepse em humanos (Brinkman-Van Der Linden *et al.*, 1996). Além disso, nosso grupo de pesquisa demonstrou que a AGP é um dos mediadores da falência da migração de neutrófilos durante a sepse em humanos (Mestriner *et al.*, 2007). Na SG induzida em camundongos pelo modelo de CLP, os níveis séricos de AGP aumentaram significativamente somente 6 h após a cirurgia (Figura 4). Entretanto, em camundongos submetidos à SNG ou FO, os níveis circulantes de AGP permaneceram inalterados durante as seis primeiras horas.

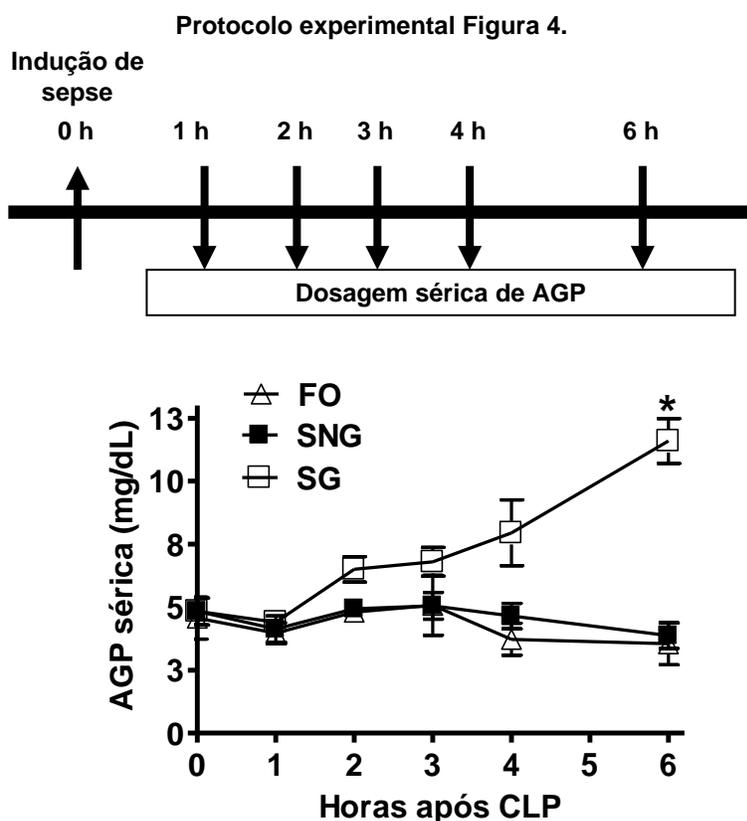


Figura 4. Os níveis plasmáticos da alfa-1-glicoproteína ácida (AGP) aumentam significativamente após a sexta hora da indução de sepse grave (SG) por CLP. O sangue dos camundongos foi coletado 6 horas após a indução de sepse pelo modelo de ligação e perfuração do ceco (CLP) e os níveis séricos de AGP determinados por imunoturbidimetria. Os resultados foram expressos como média \pm EPM mg/dL (n=5). * $P < 0,05$ comparado aos grupos FO (falso-operados) e SNG (sepse não grave).

6.2. Caracterização das proteínas com atividade inibitória sobre a migração dos neutrófilos expressas nas primeiras horas após a sepse grave em camundongos

Como demonstrado pelos resultados acima, durante a SG em camundongos os níveis plasmáticos de AGP são significativamente maiores somente 6 h após a cirurgia, em comparação com camundongos com SNG. Entretanto, duas horas após a indução de SG existe um comprometimento em etapas fundamentais para a migração dos neutrófilos, como diminuição da expressão do receptor de quimiocinas CXCR2 na membrana dessas células e diminuição do rolamento e adesão dos leucócitos na microcirculação mesentérica. Embora AGP possa ser um mediador importante para a falência da migração de neutrófilos na sepse, nossos resultados sugerem que esta proteína não está envolvida nos estágios iniciais da sepse em camundongos. A identificação de mediadores envolvidos nas etapas iniciais da sepse pode revelar importantes alvos terapêuticos, uma vez que a intervenção terapêutica nas fases iniciais da sepse pode inibir a disfunção de múltiplos órgãos e, como consequência, diminuir a mortalidade (Rivers *et al.*, 2001).

Para identificar os mediadores envolvidos na falência da migração de neutrófilos na fase inicial da SG, nós coletamos soro sanguíneo de camundongos 2 h após a indução da SG. A administração do soro proveniente de camundongos com SG inibiu a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de camundongos. Através das cromatografias com resina Blue-Sepharose e HPLC e pela eletroforese nativa, nós isolamos as proteínas presentes nesse soro com atividade inibitória sobre a migração de neutrófilos. A análise por espectrometria de massa mostrou que uma dessas proteínas era a Hx (para maiores detalhes ver Anexo 1).

6.3. Papel da proteína de fase aguda Hx na falência da migração de neutrófilos durante a sepse

6.3.1. Hemopexina inibiu a migração de neutrófilos para o foco infeccioso e diminuiu a sobrevida de camundongos com sepse

Administração *i.v.* de Hx (10, 30 ou 150 $\mu\text{g}/\text{camundongo}$), 30 min antes da cirurgia em camundongos com SNG, reduziu significativamente a migração de neutrófilos para o foco infeccioso, em comparação com o grupo SNG pré-tratados com PBS (Figura 5A).

O efeito da administração *i.v.* de Hx sobre a sobrevida de camundongos com SNG é mostrada na Figura 5B. Camundongos pré-tratados (30 min) com PBS tiveram uma taxa de sobrevida em torno de 80% 7 dias após a cirurgia. Todavia, a sobrevida de camundongos submetidos à SNG e pré-tratados (30 min) com 10 ou 30 $\mu\text{g}/\text{camundongo}$ foi reduzida para ~65% 1,5 dias após a cirurgia. Esta redução na taxa de sobrevida ficou mais evidente quando os camundongos foram pré-tratados com 150 $\mu\text{g}/\text{camundongo}$ de Hx (~50 % de sobrevida 3 dias após a cirurgia).

Protocolo experimental Figura 5.

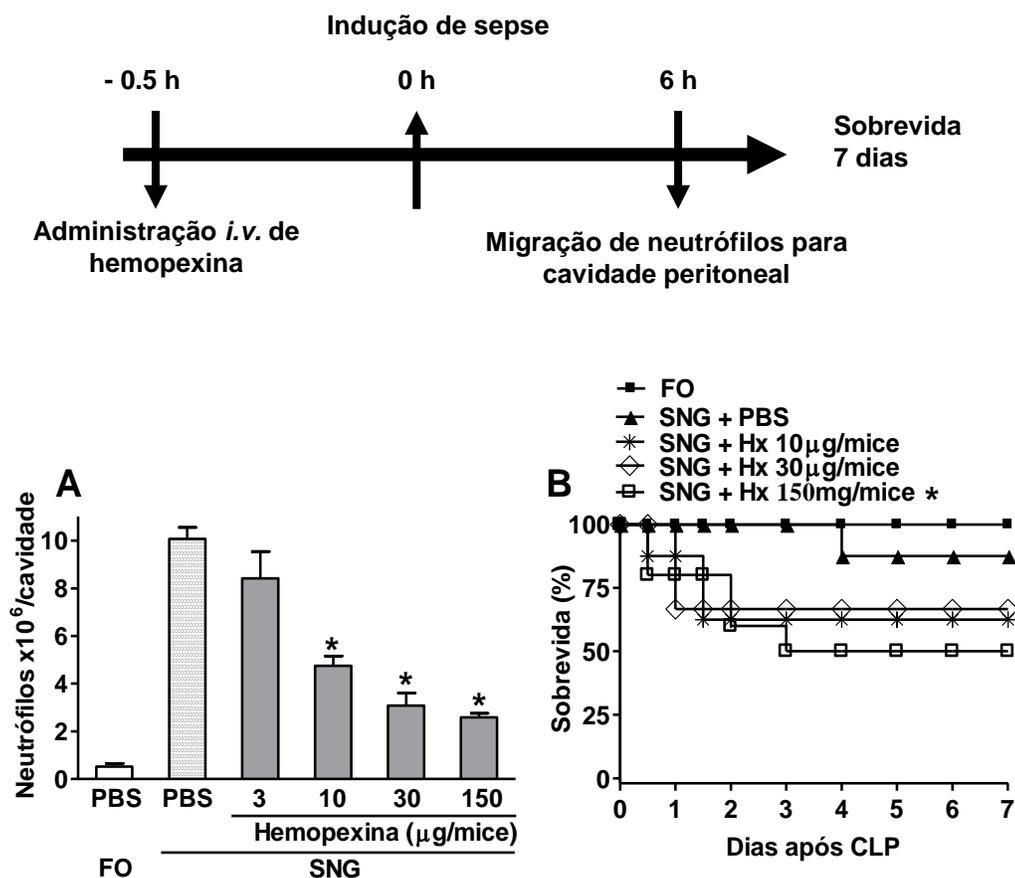


Figura 5. Hemopexina inibe a migração de neutrófilos para o foco infeccioso e aumenta a mortalidade em camundongos com sepse não grave. Hemopexina (Hx) foi administrada *i.v.* em camundongos com sepse não-grave (SNG) 30 min antes da cirurgia. Camundongos com sepse grave (SG) e FO receberam somente PBS *i.v.* (A) A migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal foi quantificada 6 horas após a indução de sepse por ligação e perfuração do ceco (CLP). Resultados foram expressos como média ± EPM (número de neutrófilos x 10⁶/cavidade; n=5). **P*<0,05 comparado aos grupos SNG+PBS. (B) Sobrevivência de camundongos submetidos à sepse ou falso-operados. Os dados foram expressos como percentual de animais sobreviventes em cada grupo (n=10-12). **P*<0,001 comparado aos grupos FO ou SNG+PBS (teste de Mantel-Cox log-rank).

6.3.2. Soro coletado de camundongos selvagens com sepse grave inibiu a migração de neutrófilos para o foco inflamatório enquanto soro de camundongos deficientes para hemopexina com sepse grave não possuiu esse efeito

Duas horas após a indução de SG em camundongos selvagens (Wt) ou em camundongos deficientes para Hx (Hx^{-/-}) foram coletados sangue e os soros separados e reunidos em dois *pools*. A análise por *Western blot* inserida na Figura 6 mostra que o *pool* de soro (30 µg) proveniente de camundongos Wt possui a proteína Hx, enquanto o *pool* de soro (30 µg) de camundongos Hx^{-/-} não possui esta proteína.

A Figura 6 mostra que a administração de carragenina (500 µg/camundongo) por via *i.p.* induziu uma significativa migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal, quando comparados com animais controles (salina *i.p.*). Entretanto, camundongos *naïves* pré-tratados (30 min) por via *i.v.* com soro (40 mg de proteína/camundongo) proveniente de camundongos Wt com SG tiveram uma significativa inibição da migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal em comparação com o grupo tratado com carragenina *i.p.* e salina *i.v.* De maneira interessante, a administração do soro (40 mg de proteína/camundongo, *i.v.*) coletado de camundongos Hx^{-/-} com SG não inibiu a migração de neutrófilos para o foco inflamatório. A administração de soro proveniente de camundongos FO (*sham-operated*) ou soro de camundongos com SNG não inibiu a migração de neutrófilos para o foco inflamatório (resultados não mostrados).

A Figura 6 também mostra que a administração de Hx (10 µg/camundongo, *i.v.*) purificada do soro de humanos (99% de pureza) também inibiu significativamente a migração de neutrófilos para o foco inflamatório.

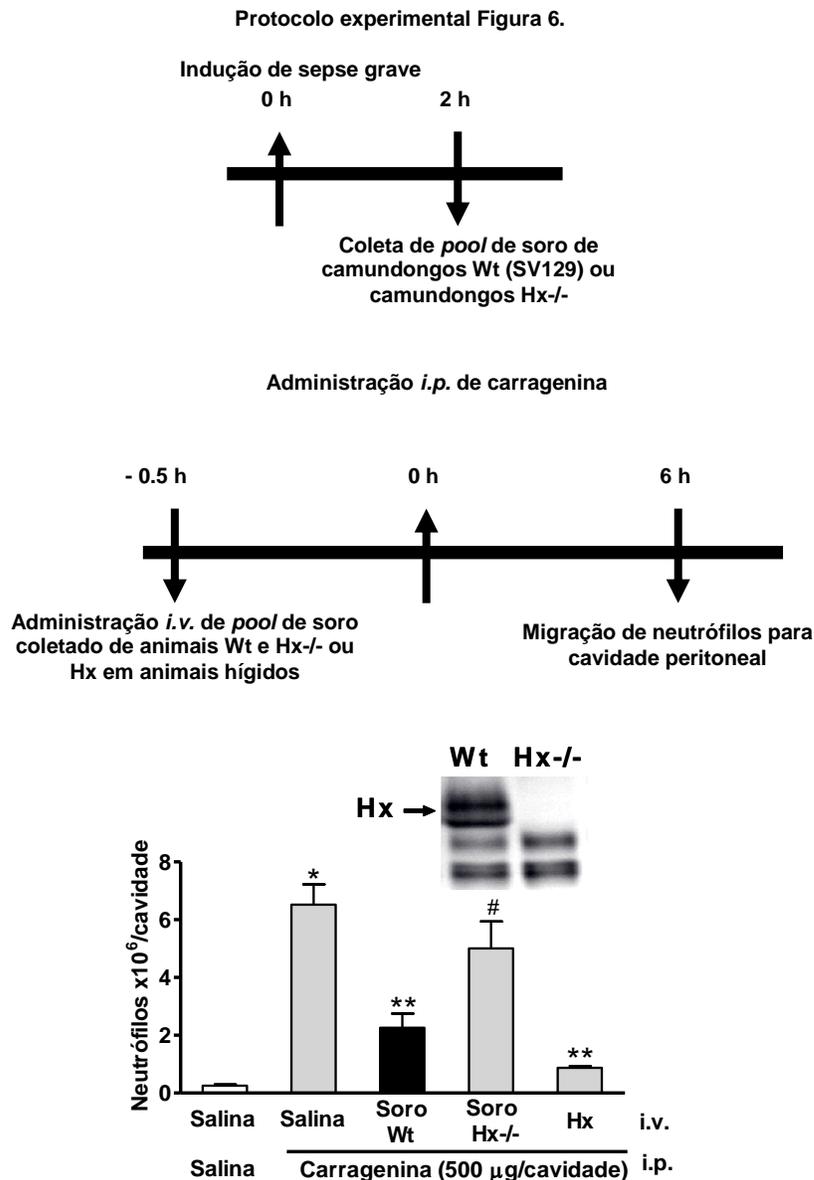


Figura 6. Administração por via *i.v.* de soro coletado de camundongos Hx^{-/-} com sepse grave não inibiu a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal. Duas horas após a indução de sepse grave em camundongos selvagens (Wt) ou camundongos nocautes para hemopexina (Hx^{-/-}) foi coletado sangue por punção cardíaca e o soro separado. Posteriormente, camundongos Wt *naives* foram pré-tratados (30 min) por via *i.v.* com salina (100 µL), hemopexina humana (Hx, 10 µg/100µL), soro (40 mg de proteína/100µL) proveniente de camundongos Wt com sepse grave (Soro Wt) ou soro (40 mg de proteína/100µL) proveniente de camundongos Hx^{-/-} com sepse grave (Soro Hx^{-/-}). Posteriormente, foi administrado carragenina (500 µg/cavidade) por via *i.p.* e 6 h após os animais foram mortos e o número de neutrófilos na cavidade peritoneal quantificado. Os resultados foram expressos como média ± EPM e são representativos de dois experimentos independentes. **P*<0,01 comparado com grupo Salina *i.v.* + Salina *i.p.*; ***P*<0,05 comparado com grupo Salina *i.v.* + Carragenina *i.p.*; # *P*<0,05 comparado com grupo Soro Wt *i.v.* + Carragenina *i.p.* (One-way ANOVA seguido de teste de Bonferroni). A inserção da figura mostra um experimento de *Western blot* (anticorpo primário anti-hemopexina) das amostras de soro coletadas de camundongos Wt e Hx^{-/-} com sepse grave.

6.3.3. Camundongos Hx^{-/-} não apresentaram falência da migração de neutrófilos para o foco infeccioso durante a sepse grave

Seis horas após a indução de SNG pelo modelo de CLP, observamos uma eficiente migração de neutrófilos para o foco infeccioso tanto em camundongos Wt como em camundongos Hx^{-/-} (Figura 7A). Como mostrado anteriormente, camundongos Wt submetidos a um estímulo séptico grave possuem falência da migração de neutrófilos para o foco infeccioso. Entretanto, camundongos Hx^{-/-} submetidos ao mesmo estímulo séptico grave que os animais Wt, apresentaram eficiente recrutamento de neutrófilos para o foco infeccioso.

Quando avaliamos a migração de neutrófilos para o foco infeccioso 4 horas após a indução de SNG, observamos que os camundongos Hx^{-/-} possuíam aproximadamente duas vezes mais neutrófilos no foco infeccioso que os camundongos Wt (Figura 7B).

Protocolo experimental Figuras 7 – 11A, 12.

Indução de sepse em camundongos Wt (SV129) e Hx^{-/-}

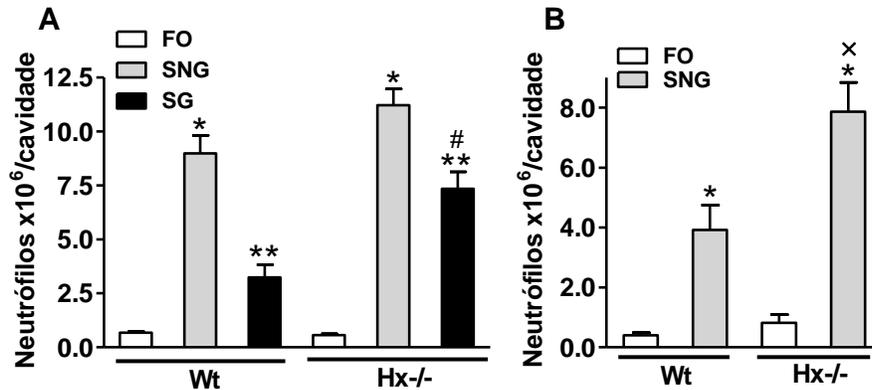
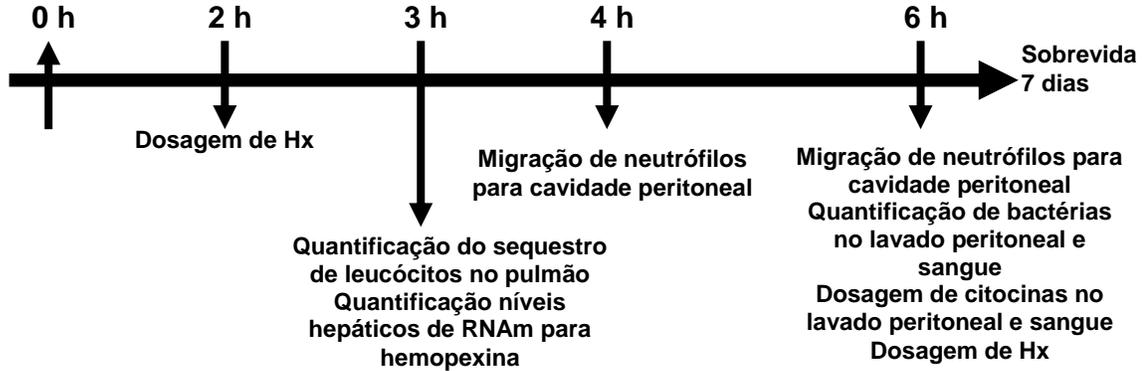


Figura 7. Camundongos Hx^{-/-} possuem mais neutrófilos no foco infeccioso após a indução de sepse em comparação com camundongos Wt. A migração de neutrófilos para o foco infeccioso foi determinada 6 h (A) ou 4 h (B) após a indução da sepse por ligação e perfuração do ceco (CLP). Os camundongos foram submetidos à sepse não-grave (SNG), sepse grave (SG) ou falsos-operados (FO). Resultados foram expressos como média \pm EPM (número de neutrófilos $\times 10^6$ /cavidade; n=5) e são representativos de 3 experimentos independentes. * $P < 0,001$ comparado ao grupo FO; ** $P < 0,05$ comparado ao grupo SNG; # $P < 0,05$ comparado ao grupo SG Wt. x $P < 0,05$ comparado ao grupo SNG Wt. Wt = camundongos selvagens; Hx^{-/-} = camundongos deficientes para hemopexina.

6.3.4. Camundongos Hx^{-/-} demonstraram melhor controle do foco infeccioso após a indução de sepse polimicrobiana

Seis horas após a indução de sepse polimicrobiana pelo modelo de CLP foi determinado o número de bactérias no foco infeccioso (cavidade peritoneal) e sangue. Como mostra a Figura 8, o número de bactérias no foco infeccioso (8A) e no sangue (8B) foi significativamente maior nos camundongos submetidos à SG do que em camundongos submetidos à SNG, em ambas as linhagens de camundongos.

Corroborando com uma eficiente migração de neutrófilos demonstrado pelos camundongos Hx^{-/-} após a indução de SG, esses animais também possuem um eficiente controle do foco infeccioso. Este controle do foco infeccioso pôde ser evidenciado pela significante redução no número de bactérias no lavado peritoneal e no sangue dos animais Hx^{-/-} com SG, quando comparados aos camundongos Wt submetidos ao mesmo estímulo séptico.

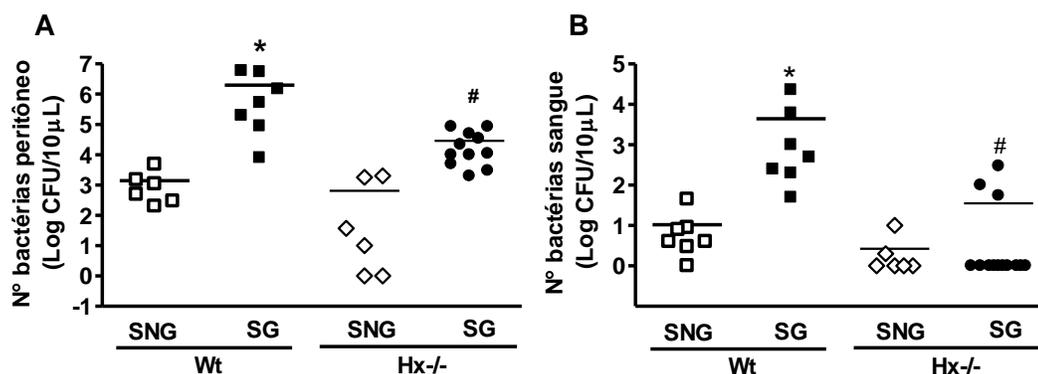


Figura 8. Camundongos Hx^{-/-} demonstram melhor controle da infecção em comparação com camundongos Wt. O número de bactérias no lavado peritoneal (A) e sangue (B) foi determinado 6 h após a indução de sepse não-grave (SNG) ou sepse grave (SG) por CLP. Os dados foram expressos como log de unidades formadoras de colônias a cada 10 μL de amostra (UFC/10 μL). * $P < 0,05$ comparados com o grupo SNG; # $P < 0,05$ comparados com o grupo SG Wt (teste T, seguido por *Mann-Whitney U test*). Wt = camundongos selvagens; Hx^{-/-} = camundongos nocautes para hemopexina. CLP = ligação e perfuração do ceco.

6.3.5. Camundongos Hx^{-/-} tiveram menor sequestro de leucócitos no pulmão e menores níveis séricos de TNF- α que animais Wt após a indução de sepse grave

Três horas após a indução de SG, os camundongos foram mortos e os pulmões coletados para a quantificação de leucócitos através da atividade da MPO. Este tempo de análise foi escolhido baseando-se na Figura 1C, na qual se pode observar que o número máximo de leucócitos no pulmão ocorre 3 h após a SG induzida por CLP. A Figura 9 mostra que 3 horas após a indução de SNG ou SG ocorreu um significativo aumento do número de leucócitos no pulmão de camundongos Wt e Hx^{-/-}, quando comparados aos animais FO. Entretanto, o número de leucócitos no pulmão de camundongos Hx^{-/-} com SG foi significativamente menor que o número de leucócitos no pulmão dos animais Wt com SG. Estes resultados sugerem que ocorre uma menor ativação do sistema imune nos camundongos Hx^{-/-} com SG em relação aos camundongos Wt com SG.

Para confirmar esta hipótese nós quantificamos os níveis de TNF- α sistêmicos. Como mostra a Figura 9B, os níveis séricos de TNF- α foram significativamente menores 6 horas após a indução de SG nos camundongos Hx^{-/-} em relação aos camundongos Wt submetidos ao mesmo estímulo séptico.

Trabalhos anteriores demonstraram que a falência da migração de neutrófilos na SG não ocorre por falta de mediadores inflamatórios no foco infeccioso (Benjamim *et al.*, 2000; Crosara-Alberto *et al.*, 2002; Alves-Filho *et al.*, 2006). Esta hipótese é sustentada pelo fato de que os níveis de citocinas e quimiocinas durante a SG no foco infeccioso são similares ou elevados em relação aos animais com sepse não grave, os quais possuem uma eficiente migração de neutrófilos para o foco infeccioso. Confirmando esses resultados, a Figura 10 mostra que os níveis de citocinas foram similares ou elevados durante a SG em relação à SNG. Além disso, não houve diferença entre os níveis de citocinas no local da infecção entre os camundongos Wt e Hx^{-/-}.

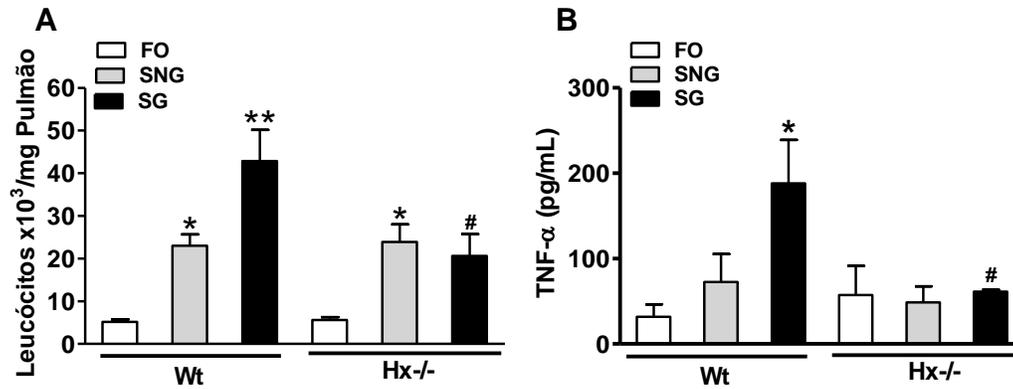


Figura 9. Camundongos Hx^{-/-} demonstram menor resposta inflamatória sistêmica após a indução de sepse grave em comparação com camundongos Wt. (A) O sequestro de leucócitos no pulmão foi determinado 3 h após a indução de sepse através da avaliação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO). Resultados representam dois experimentos independentes e foram expressos como média ± EPM do número de leucócitos x10³/mg de tecido (n=5). **P*<0,01 comparados com grupo FO; ***P*<0,01 comparados com grupo SNG; #*P*<0,01 comparados com grupo SG Wt (ANOVA, seguido por teste de Bonferroni). **(B)** Seis horas após a cirurgia foi coletado sangue por punção cardíaca e os níveis de TNF-α quantificados no soro pelo sistema BioPlex. Os resultados foram expressos como média ± EPM pg/mL. **P*<0,05 quando comparados com SNG; #*P*<0,01 comparados com grupo SG Wt (ANOVA, seguido por teste de Bonferroni). SNG = sepse não-grave; SG = sepse grave; FO = falsos-operados; Wt = camundongos selvagens; Hx^{-/-} = camundongos nocautes para hemopexina. CLP = ligação e perfuração do ceco.

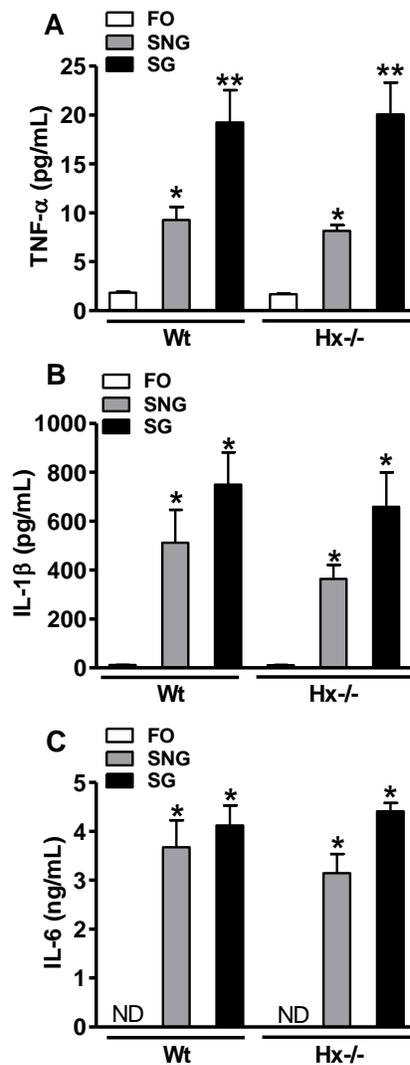
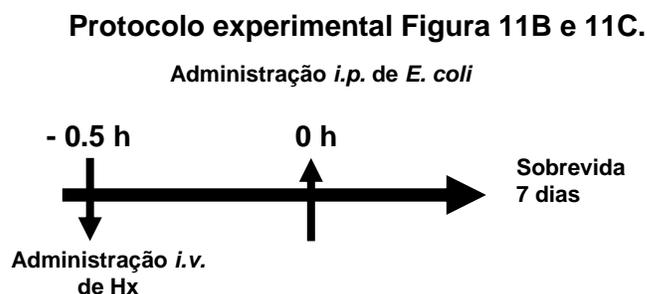


Figura 10. Os níveis das citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-6 no foco infeccioso foram similares entre os camundongos deficientes para hemopexina e selvagens. Seis horas após a cirurgia foi coletado o lavado peritoneal e os níveis das citocinas (A) TNF- α , (B) IL-1 β e (C) IL-6 quantificados pelo sistema BioPlex. Resultados foram expressos como média \pm EPM pg/mL ou ng/mL (n=5). * P <0,05 quando comparado com FO; ** P <0,05 comparados com grupo SNG (ANOVA, seguido por teste de Bonferroni). SNG = sepse não-grave; SG = sepse grave; FO = falsos-operados; Wt = camundongos selvagens; Hx-/- = camundongos nocautes para hemopexina. CLP = ligação e perfuração do ceco. ND = não detectado.

6.3.6. Camundongos Hx-/- foram mais resistentes a sepse grave que camundongos Wt

A Figura 11A mostra que tanto os camundongos Wt como os camundongos Hx-/- submetidos à SNG tiveram uma taxa de sobrevivência em torno de 90% 7 dias após a cirurgia. Na SG os camundongos Wt tiveram uma taxa de sobrevivência de 0% 2 dias após a cirurgia. Em acordo com a eficiente migração de neutrófilos e controle da infecção, os camundongos Hx-/- com SG tiveram um aumento em torno de 40% na taxa de sobrevivência em relação aos camundongos Wt com SG.

Em outro modelo de sepse induzido por inoculação *i.p.* de bactérias gram-negativas (*E. coli*, 2×10^8 UFC/camundongo) os camundongos Hx-/- também foram mais resistentes a sepse (Figura 11B). Reforçando esses dados, a Figura 11C mostra que o pré-tratamento (30 min) dos camundongos com Hx (30 μ g/camundongo, *i.v.*) resultou em 0% de sobrevivência dos animais Wt 1 dia após a inoculação de *E. coli*.



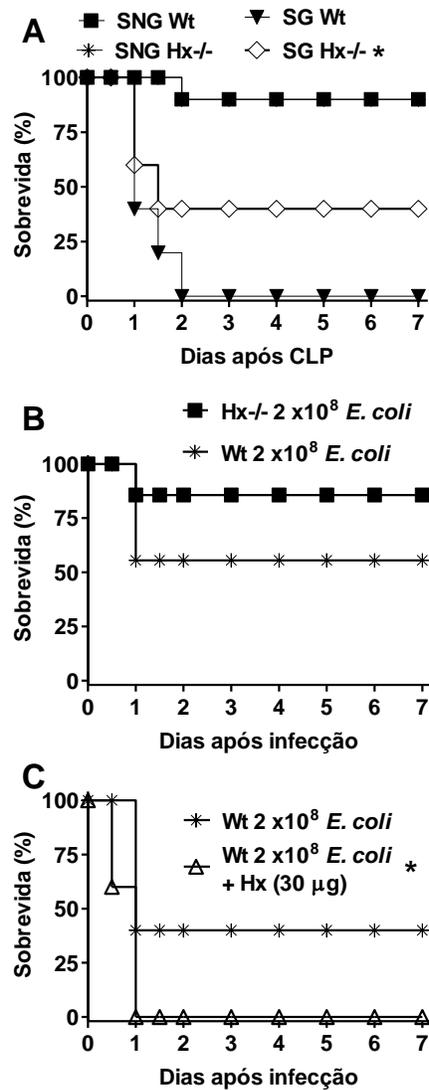


Figura 11. Camundongos deficientes para hemopexina são mais resistente a sepse. (A) A sobrevivência de camundongos submetidos à sepse não-grave (SNG), sepse grave (SG) ou falso-operados (FO) pelo modelo de CLP foi determinada durante 7 dias. Os resultados foram expressos como percentual de animais sobreviventes em cada grupo (n=10-12). * $P < 0,05$ comparado ao grupo SG Wt (Mantel-Cox log-rank test). (B) Sobrevivência dos camundongos inoculados por via *i.p.* com 2×10^8 UFC de *E. coli* (n=10-12). * $P < 0,05$ comparado ao grupo Wt (Mantel-Cox log-rank test). (C) Os camundongos foram pré-tratados (30 min) por via *i.v.* com salina (100 µL) ou hemopexina (Hx, 30 µg/mice) e posteriormente inoculados com *E. coli* por via *i.p.* Wt = camundongos selvagens; Hx^{-/-} = camundongos nocautes para hemopexina; CLP = ligação e perfuração do ceco.

6.3.7. Os níveis séricos de hemopexina estavam diminuídos após a sepse

Duas e seis horas após a indução de sepse em camundongos Wt o sangue foi coletado e o soro separado para avaliação dos níveis de Hx por ELISA. Surpreendentemente, como mostra a Figura 12A, duas horas após a indução de SNG e SG os níveis séricos de Hx estavam diminuídos e em 6 horas após a cirurgia essa diminuição foi significativa em relação ao grupo FO.

Embora os níveis séricos de Hx estivessem diminuídos, os níveis hepáticos do RNAm de Hx estavam elevados 3 horas após a indução de sepse (Figura 12B). Nos camundongos com SNG esse aumento foi em torno de 4 vezes em relação aos animais FO. Já nos camundongos submetidos à SG este aumento foi mais expressivo, sendo em torno de 18 vezes maior que nos animais FO.

Em outro modelo de SG induzido por inoculação *i.p.* de *K. pneumoniae* (4×10^8 UFC/camundongo), 6 h após a indução de sepse os níveis séricos de Hx também estavam diminuídos (Figura 13A) em comparação com os animais com SNG (1×10^7 UFC/camundongo).

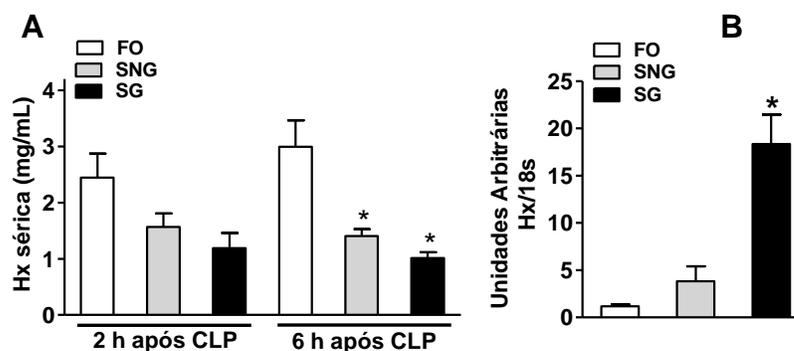


Figura 12. Os níveis séricos de hemopexina diminuem após a sepse. (A) Duas e 6 h após a CLP foi coletado sangue por punção cardíaca e o soro separado para avaliação da concentração de hemopexina por ELISA (n=5). A concentração de hemopexina foi expressa como média ± SEM mg/mL. *P<0,05 quando comparado com FO (ANOVA, seguido por teste de Bonferroni). (B) Três horas após a CLP foi coletado fígado para a quantificação dos níveis do RNAm de hemopexina por *real time* PCR (n=5). Os resultados foram expressos como aumento médio ± EPM de unidades arbitrárias do RNAm de hemopexina/RNAm de 18s. *P<0,05 quando comparado com FO ou SNG (ANOVA, seguido por teste de Bonferroni). SNG = sepse não-grave; SG = sepse grave; FO = falsos-operados; Wt = camundongos selvagens; Hx^{-/-} = camundongos nocautes para hemopexina; CLP = ligação e perfuração do ceco.

Protocolo experimental Figura 13.

Administração i.p. de *K. pneumonia*

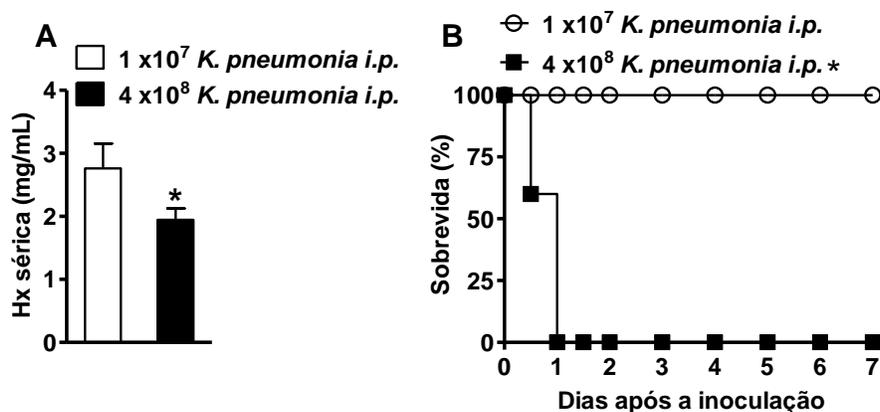
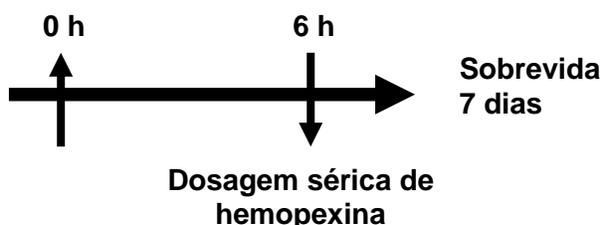


Figura 13. Os níveis séricos de hemopexina também estão diminuídos após a sepse grave induzida por *K. pneumonia*. (A) Seis h após a inoculação bacteriana foi coletado sangue e a concentração sérica de hemopexina determinada por ELISA (n=5). Os resultados foram expressos como média ± SEM mg/mL. * $P < 0,05$ quando comparado ao grupo 1 x10⁷ *K. pneumonia* (teste T). (B) Sobrevida dos camundongos inoculados por via i.p. com 1 x10⁷ ou 4 x10⁸ UFC de *K. pneumonia*. Os dados foram expressos como percentual de animais sobreviventes em cada grupo (n=10-12). * $P < 0,05$ comparado ao grupo 1 x10⁷ *K. pneumonia* (Mantel-Cox log-rank test).

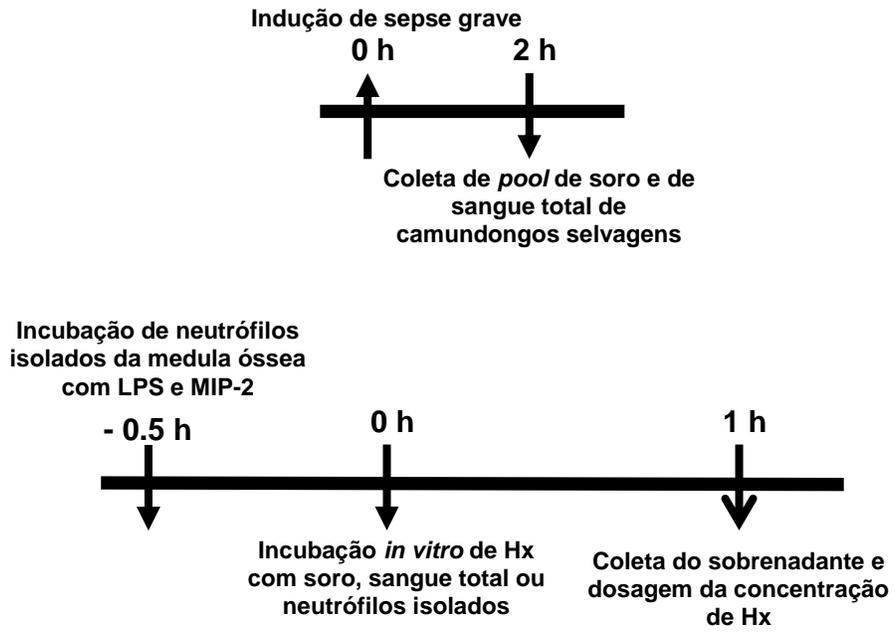
6.3.8. A concentração de hemopexina não diminuiu após a incubação com sangue total ou soro de animais com sepse

A diminuição da concentração sérica de Hx concomitante com o aumento dos níveis de RNAm hepáticos para essa proteína sugerem que durante a SG pode ocorrer um grande consumo ou degradação dessa proteína. Com o objetivo de esclarecer esta hipótese, nós incubamos Hx purificada com sangue total ou soro dos animais *naives*, FO, com SNG ou SG. O sangue dos animais foi coletado 2 h após a cirurgia e em seguida foi feito um *pool* desse sangue. Uma parte desse sangue foi incubada com Hx (1,45 mg/mL) por 1 h a 37⁰C e outra parte foi utilizada para obtenção do soro. O soro dos animais também foi incubado com Hx (2,45 mg/mL) por 1 h a 37⁰C. A Figura 14A e 14B mostram que tanto a incubação de soro como do sangue total com Hx exógena não diminuiu a concentração de Hx do sobrenadante.

Em outro experimento, os neutrófilos foram isolados da medula óssea pelo gradiente de Percoll e incubados com RPMI ou RPMI na presença de LPS (10 µg/mL) e MIP-2 (10 nM) por 30 min a 37⁰C. Em seguida, foi adicionado Hx (1,0 mg/mL) por mais 1 h a 37⁰C. Como mostra a Figura 14C os níveis de Hx não diminuíram do meio de cultura na presença dos neutrófilos.

Esses resultados sugerem que durante a sepse os níveis séricos de Hx diminuem provavelmente por um consumo hepático ou por outro tipo celular e não por quebra da proteína.

Protocolo experimental Figura 14.



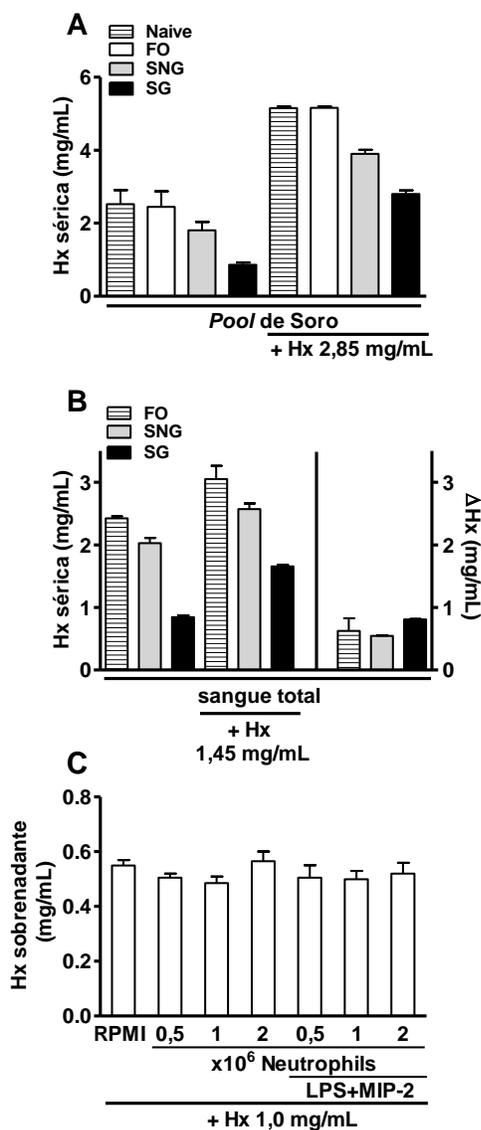


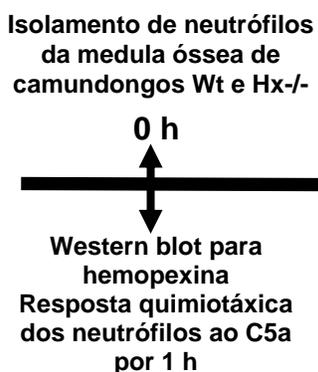
Figura 14. A concentração de hemopexina não diminui após a incubação com sangue total ou soro de animais com sepse. Seis horas após a CLP foi coletado sangue dos animais. (A) Um *pool* de soro ou (B) sangue total dos animais foi incubado na ausência ou presença de Hx exógena por 1 h a 37°C e posteriormente os níveis de hemopexina quantificados por ELISA (n=5). (C) Neutrófilos isolados da medula óssea foram incubados com RPMI ou LPS (10 µg/mL) e MIP-2 (10 nM) por 1 h a 37°C e posteriormente incubados por mais 1 h com Hx (1,0 mg/mL). A concentração de hemopexina foi expressa como média ± SEM mg/mL. SNG = sepse não-grave; SG = sepse grave; FO = falsos-operados; Hx = hemopexina.

6.3.9. *In vitro*, a resposta quimiotática ao C5a de neutrófilos Hx^{-/-} foi similar a resposta quimiotática de neutrófilos Wt

Neutrófilos isolados da medula óssea de camundongos Wt e Hx^{-/-} foram submetidos à resposta quimiotática induzida por C5a ou RPMI (controle) em câmara de Boyden. A Figura 15 mostra que neutrófilos estimulados com 50 nM de C5a tiveram uma significativa resposta quimiotática em comparação com a migração randômica dos neutrófilos (RPMI). Além disso, a resposta dos neutrófilos ao C5a foi dose-dependente, uma vez que essas células possuíram uma resposta significativamente ($P < 0,001$) maior com a dose de 100 nM em relação a dose de 50 nM.

Sobreposto na Figura 15 está uma análise por *Western blot* de amostras de soro e de neutrófilos isolados da medula óssea de camundongos Wt e Hx^{-/-}. A sobreposição na figura mostra a presença de Hx na amostra de soro proveniente dos animais Wt, entretanto por essa técnica não observamos Hx no extrato (40 µg) de neutrófilos proveniente dos animais Wt.

Protocolo experimental Figura 15.



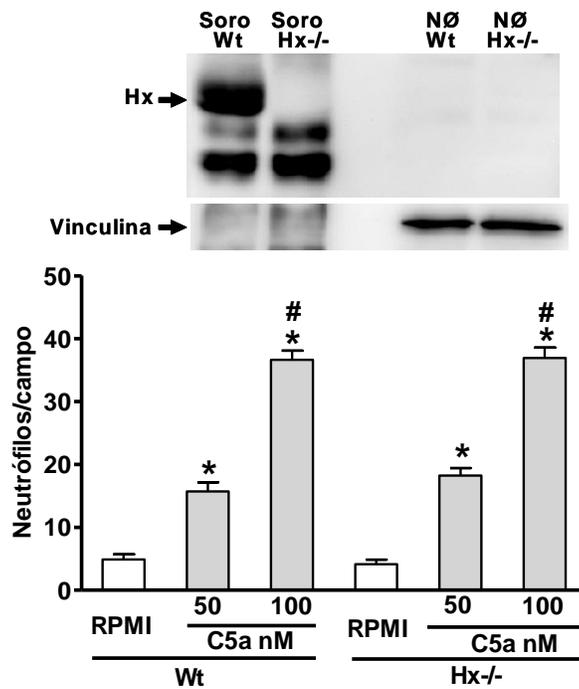


Figura 15. Neutrófilos de camundongos Hx^{-/-} e Wt respondem de maneira similar a quimiotaxia induzida por C5a. Neutrófilos purificados da medula óssea de camundongos hígidos selvagens (Wt) e deficientes para hemopexina (Hx^{-/-}) foram estimulados por C5a (50 e 100 nM) em câmara de Boyden. Os resultados foram expressos como média ± EPM do número de neutrófilos por campo e são representativos de 3 experimentos independentes. * $P < 0,001$ comparados com RPMI; # $P < 0,001$ comparados com 50 nM C5a (ANOVA, seguido por teste de Bonferroni). Inserido na figura está um experimento de Western blot utilizando anticorpo primário anti-hemopexina e anti-vinculina de amostras de soro de camundongos Wt e Hx^{-/-} e também de amostras de um pool de neutrófilos (NØ) de camundongos Wt e Hx^{-/-}.

6.3.10. Hx inibiu a resposta quimiotática de neutrófilos *in vitro*

Neutrófilos isolados da medula óssea de camundongos Wt foram incubados com RPMI ou RPMI na presença de Hx (1 μ M), Hx-hemin (Hx-He, 1 μ M), BSA-He (1 μ M) por 1 h a 37°C. Em seguida essas células (95% das células viáveis pela exclusão com *Trypan blue*) foram submetidas à migração *in vitro* em resposta ao C5a (100 nM) em câmara de Boyden. Como mostra a Figura 16, o tratamento das células com Hx ou com Hx-He resultou em uma significativa inibição da quimiotaxia dos neutrófilos. O pré-tratamento com BSA-He não teve efeito sobre a quimiotaxia dos neutrófilos. A Figura 17A também mostra que Hx induziu, de maneira dose-dependente, uma significativa inibição da resposta quimiotática dos neutrófilos ao MIP-2.

Além disso, Hx (1 ou 5 μ M) também inibiu a quimiotaxia de neutrófilos de camundongos deficientes para TLR4 e para a molécula MyD88 (Figura 18). Como esperado, o LPS inibiu a quimiotaxia dos animais TLR4^{+/+} mas não inibiu a quimiotaxia dos neutrófilos de animais TLR4^{-/-}. Esse experimento mostra que o efeito da Hx sobre a resposta quimiotática dos neutrófilos não é devido à contaminação da amostra por LPS.

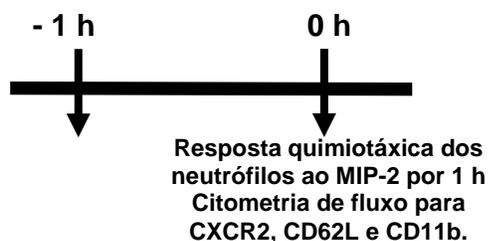
Todas as doses das drogas incubadas (4 h, 37°C) com os neutrófilos utilizadas nos experimentos *in vitro* produziram níveis similares de LDH no sobrenadante da cultura em comparação com as células incubadas com RPMI. Entretanto, no sobrenadante dos neutrófilos incubados com RPMI e submetidos à lise em nitrogênio líquido foi observado um aumento de 7 vezes nos níveis de LDH em comparação com as células incubadas com RPMI sem a lise em nitrogênio (dados não mostrados). LDH é um marcador comumente utilizado para indicar lesão ou morte celular.

6.3.11. Hemopexina diminuiu a expressão do CXCR2 e CD62L e aumentou a expressão do CD11b na membrana dos neutrófilos

Estudos *in vitro* têm demonstrado que a diminuição do receptor CXCR2 na membrana dos neutrófilos pode ser responsável pela redução da resposta quimiotática ao MIP-2 (Adams *et al.*, 2001). Dessa forma, nós avaliamos se a incubação de Hx com neutrófilos isolados da medula óssea levava a diminuição da expressão do CXCR2. A análise por citometria de fluxo mostrou que o tratamento dos neutrófilos por 1 h a 37⁰C com Hx (1, 5 e 10 μ M) significativamente diminuiu a expressão do CXCR2 nos neutrófilos (Figura 17B). Além disso, Hx também induziu, de maneira dose-dependente, a diminuição da L-selectina (CD62L, Figura 17C) e aumentou a expressão de CD11b (Figura 17D).

Protocolo experimental Figura 17.

Incubação de neutrófilos
isolados da medula óssea
com Hx



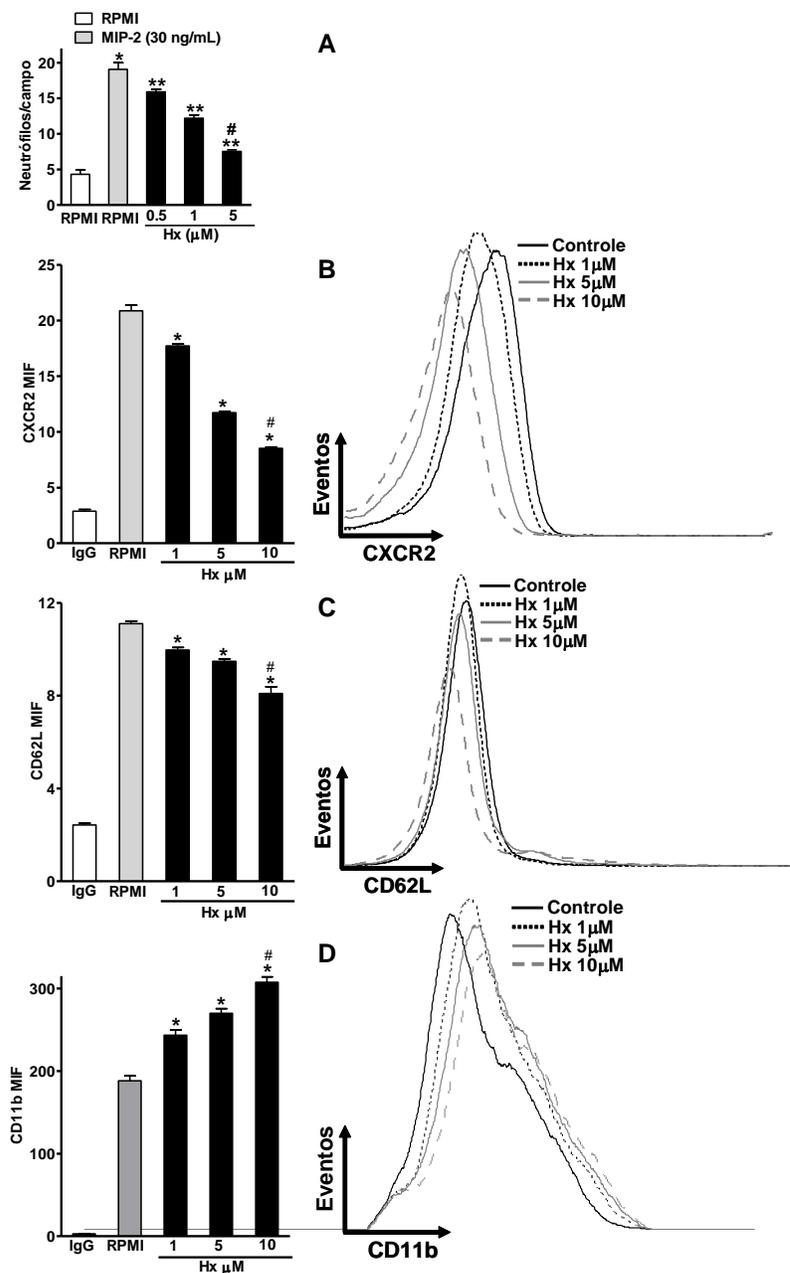


Figura 17. Hemopexina inibiu a quimiotaxia dos neutrófilos induzida por MIP-2, reduz a expressão do CXCR2 e CD62L e aumenta a expressão de CD11b. (A) Neutrófilos purificados da medula óssea de camundongos foram incubados por 1 h a 37^o com RPMI, Hx (0,5, 1 ou 5 μM) e estimulados por MIP-2 (30 ng/mL) em câmara de Boyden. Os resultados foram expressos como média ± EPM do número de neutrófilos por campo e são representativos de 3 experimentos independentes. **P*<0,001 comparados com RPMI; ***P*<0,001 comparados com RPMI mais C5a (ANOVA, seguido por teste de Bonferroni). Neutrófilos purificados da medula óssea de camundongos foram incubados por 1 h a 37^o com RPMI ou Hx (1, 5 ou 10 μM) e posteriormente as células foram marcadas com anticorpo anti-CXCR2, anti-CD62L ou anti-CD11b. Histogramas representativos e quantificação da expressão do receptor (B) CXCR2, (C) CD62L e (D) CD11b. Hx = hemopexina.

6.4. Papel da proteína de fase aguda AGP na falência da migração de neutrófilos na diabetes experimental

6.4.1. Padronização do modelo de diabetes em camundongos

A administração de aloxana em camundongos é um modelo animal comumente utilizado para mimetizar a diabetes mellitus dependente de insulina que ocorre em humanos (Im Walde *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2007). Dessa forma, no presente trabalho a diabetes foi induzida em camundongos pela administração *i.v.* de aloxana (50 mg/kg). Como mostra a Figura 19A, os níveis de glicose sanguínea medidos 10 dias após o tratamento dos animais com aloxana (camundongos Diabéticos) aumentou significativamente ($P < 0,001$) em comparação com os animais tratados com salina (Não-Diabéticos: $96,75 \pm 3,76$ mg/dL; Diabéticos: $411,1 \pm 12,8$ mg/dL). Três dias após o tratamento dos animais com aloxana os camundongos já apresentavam níveis elevados de glicose no sangue (resultados não mostrados).

Além do aumento dos níveis de glicose no sangue, os camundongos diabéticos também tiveram uma redução ($-3,2 \pm 1,4$ g) no peso corporal 10 dias após o tratamento com aloxana (Figura 19B). Entretanto, os animais tratados com salina apresentaram um aumento ($2 \pm 0,2$ g) no peso corporal durante o mesmo período de observação.

Para confirmar que as alterações observadas nos camundongos pelo tratamento com aloxana eram pela falta de insulina, os camundongos foram tratados durante 5 dias com duas doses diárias de insulina. O tratamento com insulina foi iniciado 5 dias após a administração de aloxana (para detalhes ver material e métodos). A Figura 19A mostra que os camundongos diabéticos tratados com insulina possuem níveis de glicose no sangue ($102,5 \pm 39,22$ mg/dL) similares aos animais não diabéticos. Além disso, em 5 dias o tratamento com insulina aumentou ($2,05 \pm 0,20$ g) o peso corporal dos animais diabéticos.

Em conjunto, esses resultados confirmam o desenvolvimento de diabetes nos camundongos. Dessa forma, os próximos experimentos foram realizados 10 dias após o tratamento com aloxana.

Protocolo experimental Figura 19.

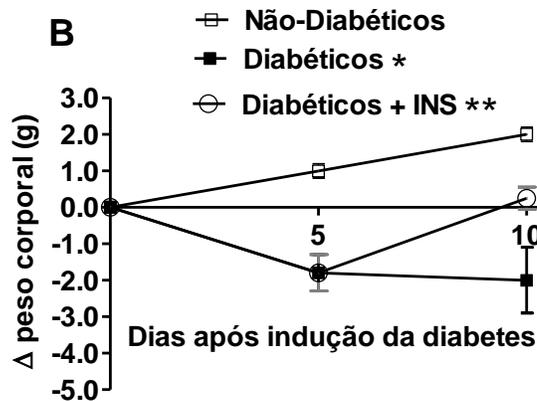
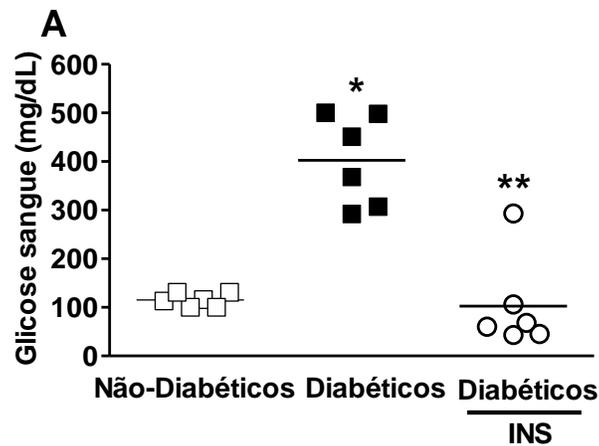
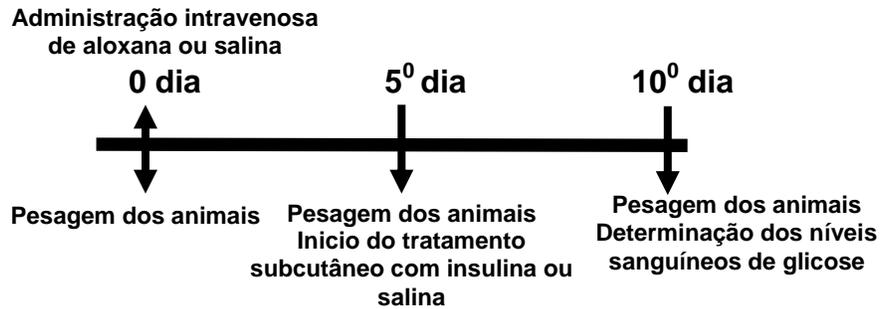


Figura 19. Padronização do modelo de diabetes. Os camundongos foram tratados por via *i.v.* com salina ou aloxana (50 mg/kg). **(A)** Níveis de glicose sanguínea 10 dias após o tratamento por via *i.v.* dos camundongos com salina (Não-Diabéticos) ou com aloxana (Diabéticos). Cinco dias após a administração de aloxana um grupo de camundongos foi tratado com duas doses (1 UI) diárias de insulina por 5 dias consecutivos conforme descrito em materiais e métodos. **(B)** Diferença (Δ) do peso corporal dos animais medidos no quinto e no décimo dia após o tratamento com salina ou aloxana. * $P < 0,05$ comparado ao grupo Não-Diabéticos; ** $P < 0,05$ comparado ao grupo Diabéticos (ANOVA, seguido por teste de Bonferroni).

6.4.2. Camundongos diabéticos são mais susceptíveis à sepse polimicrobiana não grave

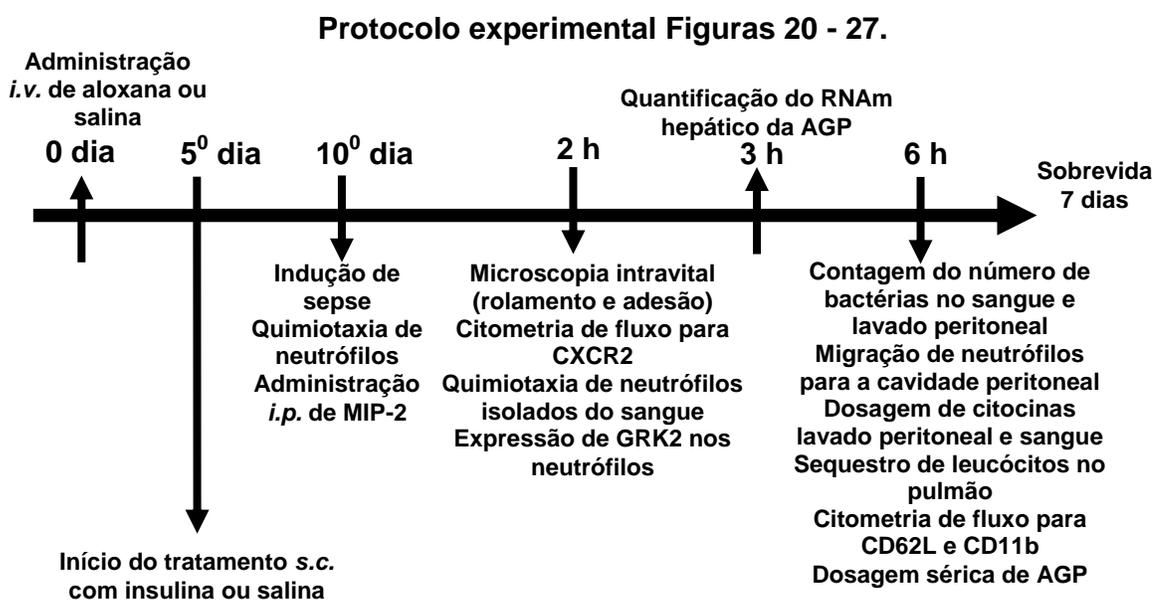
Primeiro, nós investigamos a susceptibilidade dos camundongos diabéticos a SNG induzida por CLP. Camundongos diabéticos tiveram 100% de mortalidade 4 dias após a indução de SNG, enquanto os camundongos não diabéticos submetidos ao mesmo estímulo infeccioso sobreviveram em torno de 80% 7 dias após a cirurgia (Figura 20A). Todos os camundongos diabéticos e não diabéticos FO sobreviveram durante o período observado (resultados não mostrados). Como previamente mostrado, todos os animais com SG morreram nos primeiros 3 dias após a cirurgia.

Os elevados níveis séricos de glicose e/ou baixos níveis de insulina associados a diabetes mellitus podem ser responsáveis pelos distúrbios da resposta imune inata, resultando em uma bem documentada pré-disposição a infecções observada em indivíduos diabéticos (Rajagopalan, 2005). De maneira interessante, o tratamento com insulina preveniu significativamente a mortalidade dos animais diabéticos a SNG (Figure 20A).

Corroborando com os resultados de sobrevivência, os camundongos diabéticos submetidos à SNG não possuíram um eficiente controle da infecção, como demonstrado pela alta quantidade de UFC no lavado peritoneal e sangue desses animais (Figura 20B e 20C). Por outro lado, os camundongos não diabéticos submetidos à SNG tiveram baixos níveis de UFC tanto no lavado peritoneal como no sangue, em comparação com animais não diabéticos com SG e diabéticos com SNG. O tratamento dos animais diabéticos com insulina promoveu um melhor controle da infecção como mostra a Figura 20.

Seis horas após a indução de sepse por CLP nós avaliamos o recrutamento de neutrófilos para a cavidade peritoneal dos camundongos diabéticos e não diabéticos. De acordo com resultados prévios (Alves-Filho *et al.*, 2008), a Figura 20D mostra que camundongos não diabéticos submetidos a SNG tiveram um aumento significativo no número de neutrófilos para a cavidade peritoneal, quando comparados com os animais FO. Por outro lado, os camundongos diabéticos

com SNG tiveram uma significativa redução da migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal, similar à migração observada nos animais não diabéticos com SG. O tratamento com insulina impediu a falência da migração dos neutrófilos para o foco infeccioso nos animais diabéticos.



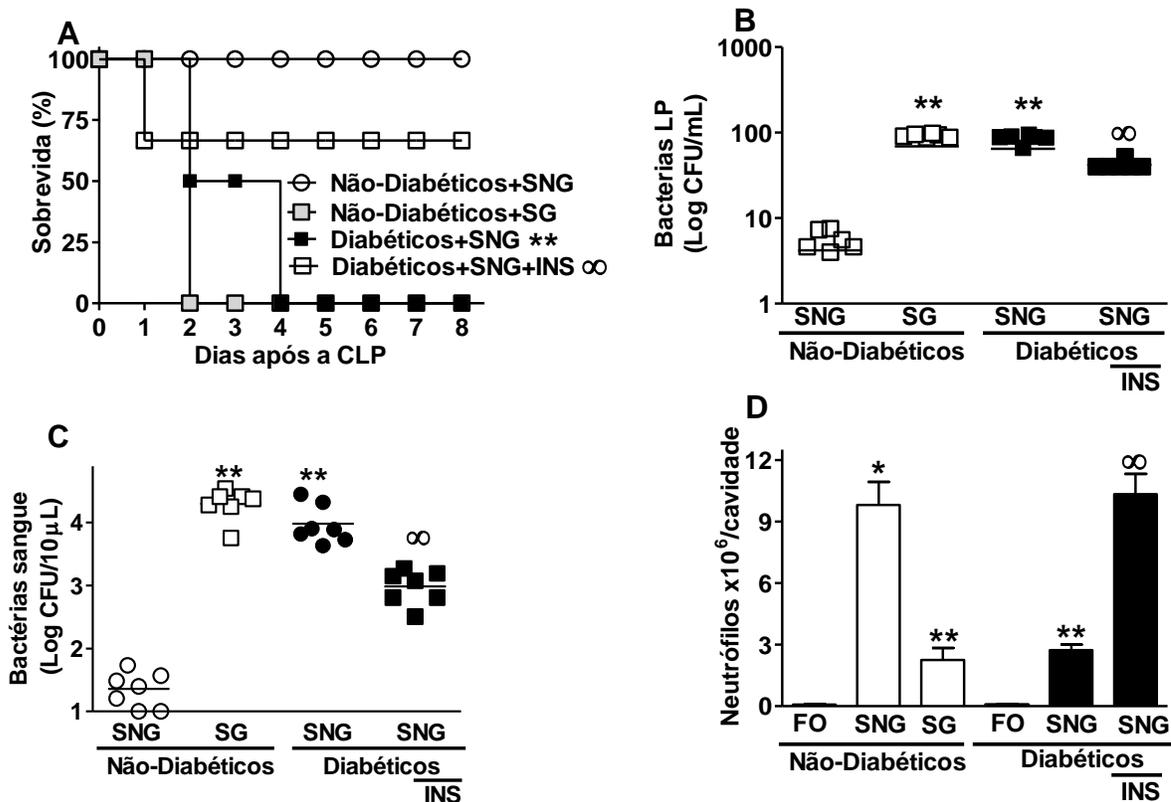


Figura 20. Camundongos diabéticos são menos resistentes a sepse e o tratamento com insulina previne essa susceptibilidade. Um grupo de camundongos diabéticos foi tratado com insulina (INS) conforme descrito em materiais e métodos. A sepse foi induzida dez dias após o tratamento com salina ou aloxana. (A) A sobrevivência de camundongos submetidos à sepse não-grave (SNG), sepse grave (SG) ou falso-operados (FO) pelo modelo de CLP foi determinada durante 7 dias. Os dados foram expressos como percentual de animais sobreviventes em cada grupo (n=10-12). ** $P < 0,05$ comparado ao grupo Não-diabéticos + SNG; $\infty P < 0,05$ comparado ao grupo Diabéticos + SNG (teste de *Mantel-Cox log-rank*). O número de bactérias no lavado peritoneal (LP) (B) e sangue (C) foi determinado 6 h após a cirurgia. Os resultados foram expressos como log de unidades formadoras de colônias a cada 10 μL de amostra (UFC/10 μL). ** $P < 0,05$ comparados com o grupo Não-Diabéticos SNG; $\infty P < 0,05$ comparados com o grupo Diabético SNG (*t test*, seguido por *Mann-Whitney U test*). A migração de neutrófilos (D) para o foco infeccioso foi determinada 6 h após a indução da sepse. Resultados foram expressos como média \pm EPM do número de neutrófilos $\times 10^6$ /cavidade (n=5) e são representativos de 3 experimentos independentes. * $P < 0,001$ comparado ao grupo FO; ** $P < 0,05$ comparado ao grupo Não-Diabéticos SNG; $\infty P < 0,05$ comparado ao grupo Diabéticos SNG. CLP = ligação e perfuração do ceco.

6.4.3. O tratamento com insulina dos animais diabéticos preveniu a exacerbada inflamação sistêmica após a indução de sepse não grave

Elevadas concentrações de citocinas séricas assim como o sequestro de leucócitos em tecidos distantes do foco infeccioso são correlacionados com a severidade da sepse (Rittirsch *et al.*, 2008). Dessa forma, nós avaliamos os níveis séricos de KC e MIP-2 e o sequestro de leucócitos no pulmão durante a sepse em camundongos não diabéticos, diabéticos e diabéticos tratados com insulina.

Como mostra a Figura 21A e 21B, os níveis séricos de MIP-2 e KC estavam significativamente elevados 6 h após a sepse nos camundongos diabéticos com SNG, em comparação com os animais não diabéticos com SNG. Os níveis dessas quimiocinas no soro dos animais não diabéticos com SG foi similar àqueles encontrados nos camundongos diabéticos. O tratamento com insulina diminuiu significativamente as concentrações séricas de MIP-2 e KC nos animais diabéticos.

A Figura 21C mostra que nos camundongos diabéticos com SNG ocorreu um aumento significativo no acúmulo de leucócitos no pulmão em relação aos camundongos não diabéticos com SNG, entretanto esse acúmulo foi similar ao observado nos animais com SG. O tratamento com insulina reduziu o sequestro de leucócitos no pulmão dos camundongos diabéticos.

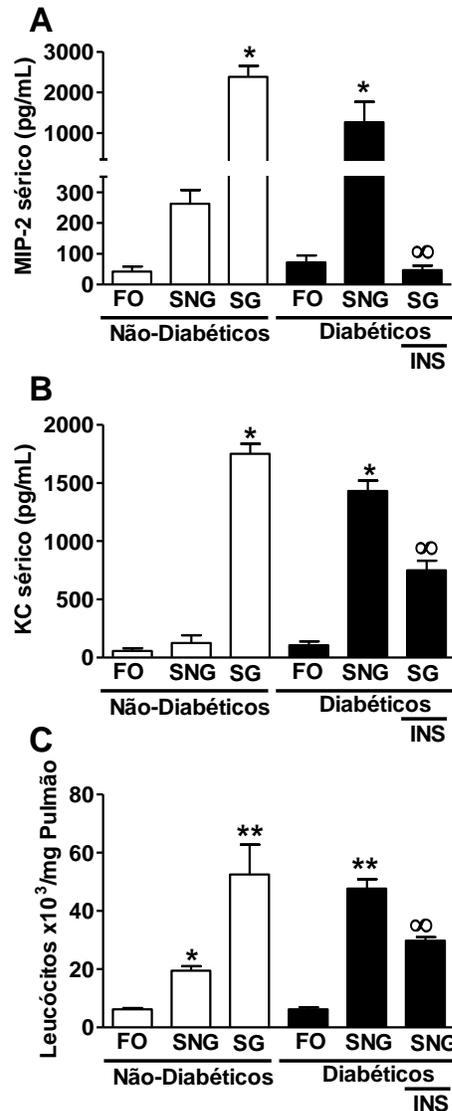


Figura 21. Camundongos diabéticos desenvolvem uma resposta inflamatória sistêmica maior que os camundongos não diabéticos após a indução da sepse. A sepse foi induzida dez dias após o tratamento com salina ou aloxana. Um grupo de camundongos diabéticos foi tratado com insulina (INS). Os níveis séricos de MIP-2 (A) e KC (B) foram avaliados 6 h após a indução de sepse não-grave (SNG), sepse grave (SG) ou falso-operados (FO) pelo modelo de CLP. Os dados foram expressos como média \pm EPM pg/mL (n=5) e são representativos de 2 experimentos independentes. * $P < 0,001$ comparado ao grupo SNG Não-Diabéticos; $\infty P < 0,05$ comparado ao grupo Diabéticos SNG. O sequestro de leucócitos (C) no pulmão foi determinado 6 h após a indução de sepse através da avaliação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO). Resultados representam dois experimentos independentes e foram expressos como média \pm EPM do número de leucócitos $\times 10^3$ /mg de tecido (n=5). * $P < 0,01$ comparados com grupo FO; ** $P < 0,01$ comparados com grupo Não-Diabéticos SNG; $\infty P < 0,01$ comparados com grupo Diabéticos SNG (ANOVA, seguido por teste de Bonferroni). CLP = ligação e perfuração do ceco.

6.4.4. Durante a sepse, camundongos diabéticos tiveram diminuição do rolamento e adesão dos leucócitos na microcirculação mesentérica pela modulação das moléculas de adesão

A redução da migração dos neutrófilos para o foco infeccioso nos animais diabéticos não é uma consequência da falta de mediadores inflamatórios no local da infecção. Como mostra a Figura 22, os níveis de MIP-2 e TNF- α nos camundongos diabéticos com SNG foram similares aos encontrados nos animais não diabéticos com SG e significativamente maiores em relação aos níveis dessas citocinas nos animais com SNG ou FO.

Explorando os mecanismos que levam os animais diabéticos a desenvolverem a falência da migração dos neutrófilos para o foco infeccioso, avaliamos o rolamento e adesão dos leucócitos nas vênulas da microcirculação mesentérica após a sepse. Camundongos não diabéticos com SNG tiveram um aumento significativo no rolamento e adesão dos leucócitos quando comparados com os animais FO (Figura 23). Entretanto, camundongos diabéticos com SNG tiveram uma significativa diminuição do rolamento e adesão quando comparados com os animais não diabéticos com SNG. Essa redução no rolamento e adesão também foi observada nos animais com SG. O tratamento com insulina aboliu a redução do rolamento e adesão nos camundongos diabéticos.

O rolamento e adesão dos leucócitos ao endotélio são mediados principalmente pelas selectinas (ex. CD62L) e integrinas (ex. CD11b/CD18). Além disso, diminuição ou aumento da expressão de CD62L e CD11b, respectivamente, são utilizados como marcadores da ativação dos neutrófilos (Panes *et al.*, 1999). A Figura 24A mostra que neutrófilos obtidos 6 h após a SG de camundongos não diabéticos, tiveram uma significativa redução da expressão de CD62L quando comparados com neutrófilos de camundongos não diabéticos com SNG ou FO. De maneira similar, os animais diabéticos com SNG também tiveram redução da expressão de CD62L em comparação

com camundongos não diabéticos com SNG. Por outro lado, o tratamento com insulina preveniu essas alterações nos neutrófilos de animais diabéticos.

A expressão de CD11b nos neutrófilos circulantes de camundongos não diabéticos com SNG e SG aumentou de maneira significativa em relação aos neutrófilos dos animais FO (Figura 24B). Além disso, também foi observado aumento significativo na expressão de CD11b na membrana dos neutrófilos de camundongos diabéticos com SNG em comparação com animais não diabéticos com SNG. O aumento do CD11b nos animais diabéticos foi abolido pelo tratamento com insulina.

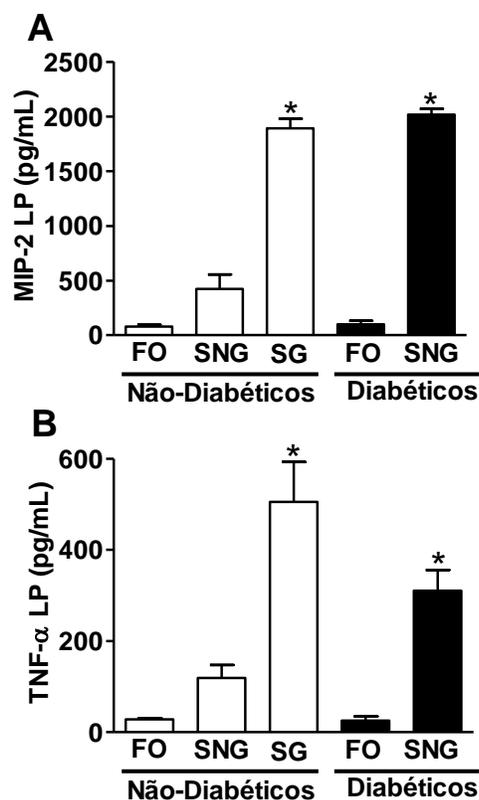


Figura 22. A redução da migração de neutrófilos nos animais diabéticos não ocorre pela falta de mediadores inflamatórios no foco infeccioso. A sepse foi induzida dez dias após o tratamento com salina ou aloxana. Os níveis de MIP-2 (A) e TNF- α (B) no lavado peritoneal foram avaliados 6 horas após a indução de sepse não-grave (SNG), sepse grave (SG) ou falso-operados (FO) pelo modelo de CLP. Os dados foram expressos como média \pm EPM (pg/mL; n=5) e são representativos de 2 experimentos independentes. * $P < 0,001$ comparado ao grupo SNG não-diabéticos. CLP = ligação e perfuração do ceco.

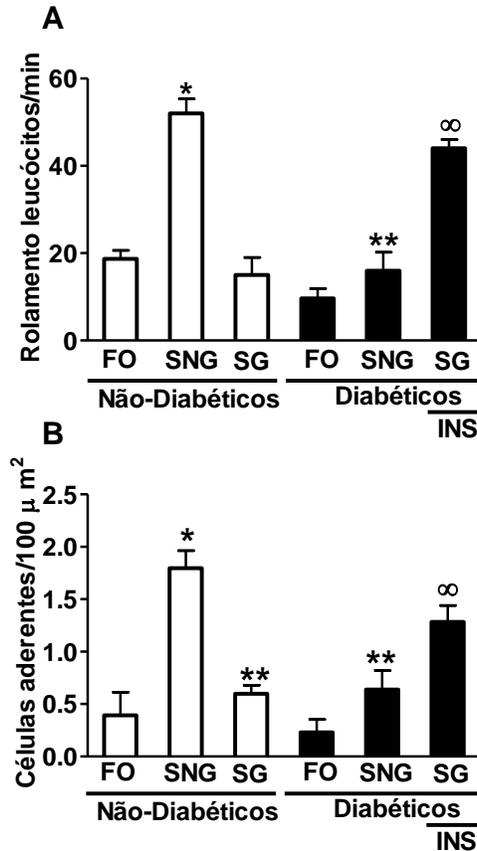


Figura 23. Camundongos diabéticos tiveram redução no rolamento e adesão dos leucócitos ao endotélio da microcirculação mesentérica. A sepse foi induzida dez dias após o tratamento com salina ou aloxana. Um grupo de camundongos diabéticos foi tratado insulina (INS). *Ex vivo* análise do rolamento (A) e adesão (B) dos leucócitos nas vênulas mesentéricas foi realizada 2 horas após a indução de sepse por CLP pela técnica da microscopia intravital. Os resultados do rolamento foram expressos como média \pm EPM do número de leucócitos que rolaram por min (leucócitos/min; $n=5$) e para adesão como média \pm EPM do número de leucócitos aderidos por $100 \mu\text{m}^2$ ($n=5$); * $P<0,01$ comparado com FO; ** $P<0,01$ comparado com Não-Diabéticos SNG. $\infty P<0,05$ comparado ao grupo Diabéticos SNG (ANOVA, seguido por teste de Bonferroni). FO = falso-operado; SNG = sepse não grave; SG = sepse grave. CLP = ligação e perfuração do ceco.

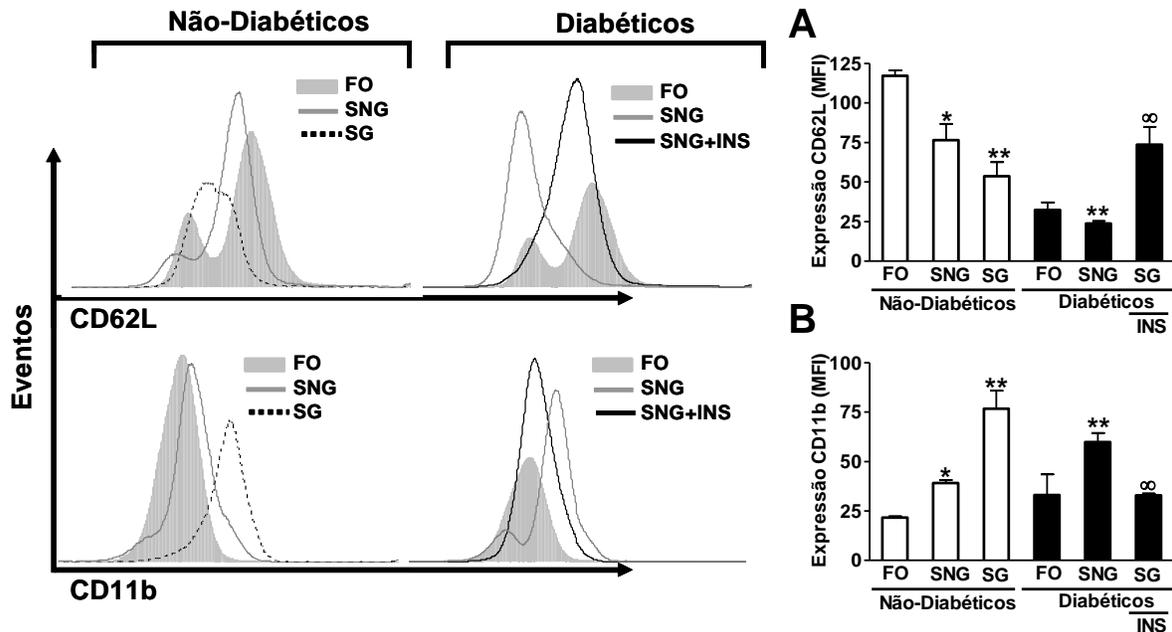


Figura 24: Em comparação com camundongos não diabéticos, camundongos diabéticos tiveram menor expressão de CD62L e aumento na expressão de CD11b em neutrófilos circulantes após a sepse. A sepse foi induzida dez dias após o tratamento com salina ou aloxana. Um grupo de camundongos diabéticos foi tratado com insulina (INS). Análise da expressão do receptor (A) CD62L e (B) CD11b nos neutrófilos circulantes de camundongos diabéticos e não diabéticos foi realizada 6 h após os animais serem submetidos à sepse não-grave (SNG), sepse grave (SG) ou falso-operados (FO) pelo modelo de CLP. Os dados foram expressos como média \pm EPM da intensidade de fluorescência média (MFI; $n=5$) e são representativos de 2 experimentos independentes. * $P<0,05$ comparado ao grupo FO Não-Diabéticos; ** $P<0,01$ comparado ao grupo SNG Não-Diabético; $\infty P<0,05$ comparado ao grupo Diabéticos SNG (ANOVA, seguido por teste de Bonferroni). CLP = ligação e perfuração do ceco.

6.4.5. Neutrófilos de camundongos diabéticos com sepse não grave tiveram redução na quimiotaxia, diminuição da expressão do CXCR2 e aumento da expressão de GRK2

Além do rolamento e adesão, a migração dos neutrófilos também depende da quimiotaxia (Simon e Green, 2005) até o local da lesão tecidual. Como mostra a Figura 25A, a indução de SNG nos animais diabéticos ou SG em camundongos não diabéticos resultou em uma significativa redução na resposta quimiotática dos neutrófilos circulantes ao MIP-2, quando comparada à resposta dos neutrófilos de camundongos não diabéticos com SNG ou FO. O tratamento dos camundongos diabéticos com insulina preveniu essa redução na quimiotaxia dos neutrófilos.

De maneira interessante, quando neutrófilos sanguíneos de camundongos diabéticos não submetidos à sepse foram induzidos à resposta quimiotática pelo MIP-2, nós verificamos um significativo declínio nesse parâmetro (Figura 25B). *In vivo*, administração de MIP-2 na cavidade peritoneal dos camundongos diabéticos também induziu uma quantidade de neutrófilos reduzida em comparação aos animais não diabéticos (Figura 26C).

A expressão do CXCR2 é necessária para a eficiente quimiotaxia e migração dos neutrófilos estimuladas por MIP-2 (Alves-Filho *et al.*, 2009) ou durante um processo infeccioso (Rios-Santos *et al.*, 2007). Dessa forma, a expressão do CXCR2 nos neutrófilos foi avaliada 6 h após a cirurgia por citometria de fluxo. A indução de SNG em camundongos diabéticos resultou em uma marcada redução na expressão do CXCR2 na membrana dos neutrófilos, quando comparados com neutrófilos de animais não diabéticos com SNG (Figura 25D). O tratamento com insulina preveniu a internalização do CXCR2 nos neutrófilos dos animais diabéticos com SNG. A Figura 25E mostra histogramas representativos da expressão do CXCR2 nos neutrófilos sanguíneos (células com alta expressão de GR-1).

O aumento na expressão de GRK2 tem sido descrita como um fator fundamental na dessensibilização do CXCR2 (Alves-Filho *et al.*, 2009). Dessa forma, nós examinamos por microscopia de fluorescência se o desenvolvimento de sepse SNG associada a diabetes modulava a expressão de GRK2 nos neutrófilos. Encontramos um significativo aumento na expressão da GRK2 nos neutrófilos de camundongos não diabéticos com SG e diabéticos com SNG, em comparação com animais não diabéticos com SNG ou FO (Figura 26). O tratamento com insulina preveniu o aumento de GRK2 nos neutrófilos dos animais diabéticos com SNG. A quantificação da imunofluorescência da GRK2 nos neutrófilos (realizadas com o programa ImageJ) confirmam os resultados descritos acima (dados não mostrados).

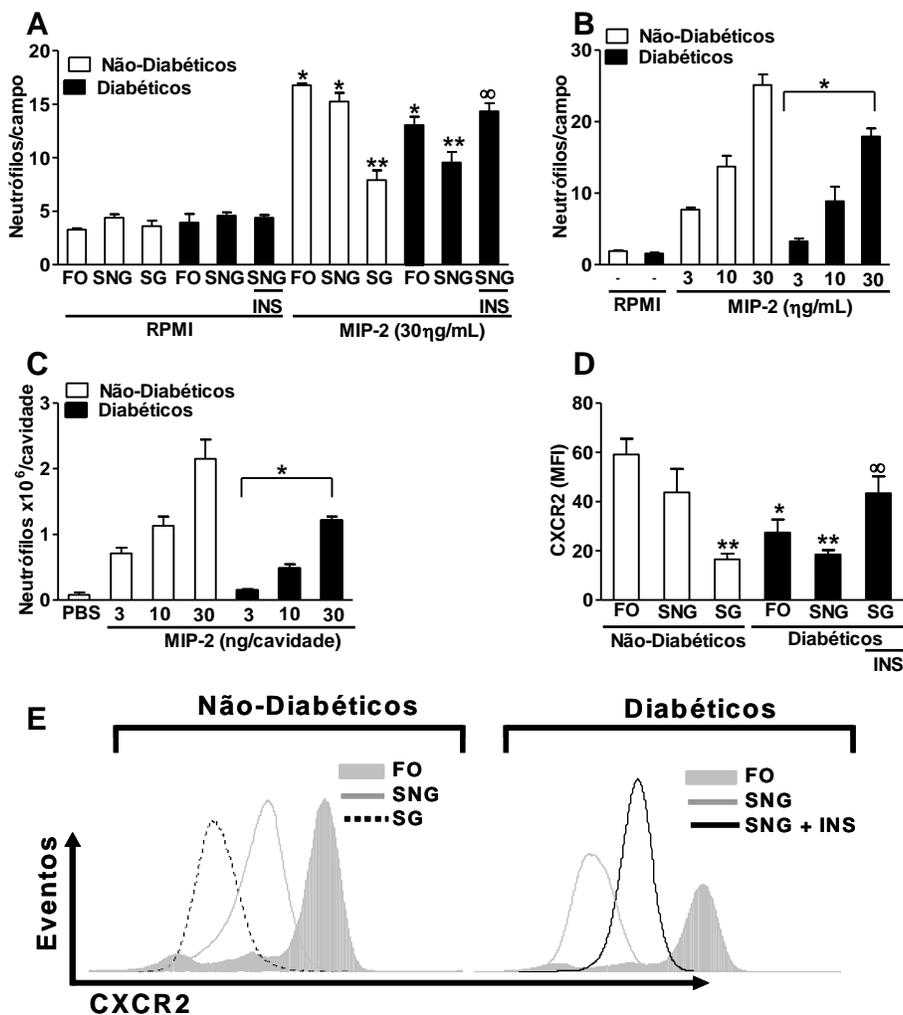


Figura 25: Neutr3filos de camundongos diab3ticos possuem redu3o na express3o do receptor CXCR2 e redu3o na resposta quimiot3tica induzida pelo MIP-2. Dez dias ap3s a administra3o de aloxana ou salina os camundongos foram submetidos 3 seps n3o-grave (SNG), seps grave (SG) ou falso-operados (FO) pelo modelo de CLP. Um grupo de camundongos diab3ticos foi tratado com insulina (INS). Duas horas ap3s a indu3o da seps o sangue dos animais foi coletado para an3lise do receptor CXCR2 nos neutr3filos ou para isolamento dos neutr3filos pelo gradiente de Percoll. **(A)** Os neutr3filos foram estimulados por 1 h em c3mara de Boyden com RPMI ou MIP-2 (30 ng/mL). Os resultados foram expressos como m3dia \pm EPM do n3mero de neutr3filos por campo. Os resultados s3o representativos de 2 experimentos independentes. * $P < 0,05$ comparado ao grupo FO N3o-Diab3ticos; ** $P < 0,01$ comparado ao grupo SNG N3o-Diab3tico; $\infty P < 0,05$ comparado ao grupo Diab3ticos SNG ANOVA, seguido por teste de Bonferroni). **(B)** Resposta quimiot3tica dos neutr3filos isolados do sangue dos camundongos dez dias ap3s o tratamento com salina (N3o-diab3ticos) ou aloxana (Diab3ticos). **(C)** Migra3o de neutr3filos para a cavidade peritoneal. Quatro horas ap3s a administra3o de MIP-2 (3 – 30 ng/cavidade, *i.p.*) os animais foram mortos e as c3lulas da cavidade peritoneal coletadas com PBS/EDTA. Os resultados foram expressos como m3dia \pm EPM do n3mero de neutr3filos $\times 10^6$ /cavidade. * $P < 0,05$ comparado aos grupos N3o-Diab3ticos (ANOVA, seguido por teste de Bonferroni). **(D)** Quantifica3o e **(E)** histograma representativo da express3o do receptor CXCR2 em neutr3filos circulantes de camundongos diab3ticos e n3o diab3ticos. Os resultados foram expressos como m3dia \pm EPM de intensidade de fluoresc3ncia m3dia (MIF; $n=5$). CLP = liga3o e perfura3o do ceco.

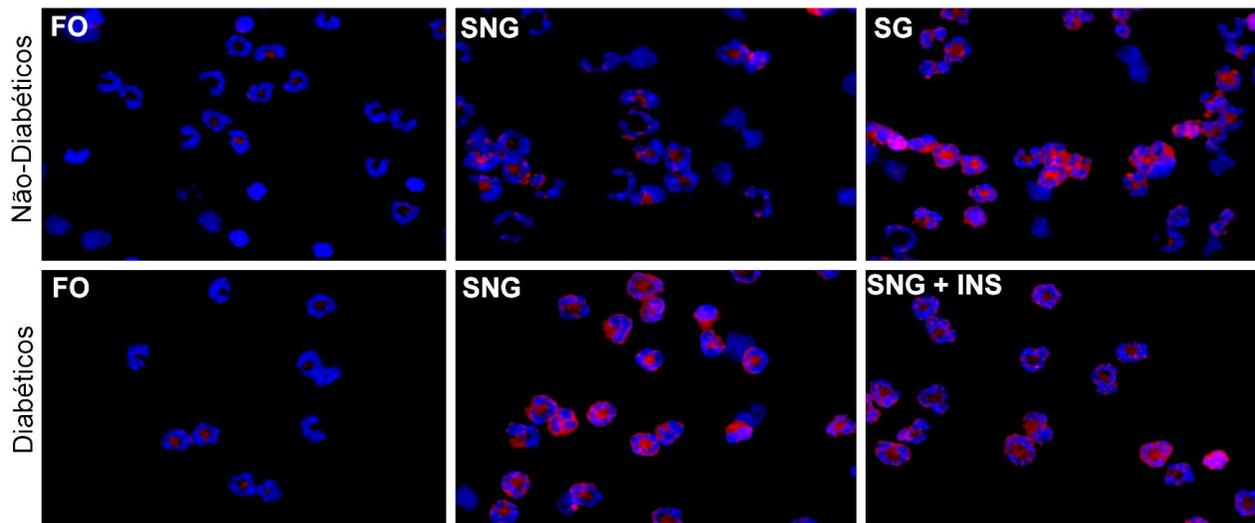


Figura 26: Neutrófilos de camundongos diabéticos possuem aumento na expressão de GRK2 após a indução da sepse não grave. Dez dias após a administração de aloxana ou salina os camundongos foram submetidos à sepse não-grave (SNG), sepse grave (SG) ou falso-operados (FO) pelo modelo de CLP. Um grupo de camundongos diabéticos foi tratado com insulina (INS). Duas horas após a indução da sepse o sangue dos animais foi coletado para análise da molécula GRK2 por imunofluorescência nos neutrófilos. CLP = ligação e perfuração do ceco; INS = insulina; GRK2 = quinase 2 de receptor acoplado à proteína G.

6.4.6. Altas concentrações séricas de AGP correlacionam-se com a inibição da migração de neutrófilos em camundongos diabéticos com SNG

Altos níveis séricos de AGP têm sido demonstrado em pacientes com diabetes mellitus (Gomes *et al.*, 2003). A Figura 27 mostra que em camundongos diabéticos com SNG ou FO os níveis séricos de AGP estavam aumentados em relação aos animais não diabéticos FO ou com SNG. Os níveis de AGP nos animais diabéticos com SNG foram similares aos níveis encontrados nos animais com SG. A Figura 27B também mostra que os níveis séricos de AGP foram correlacionados negativamente com o número de neutrófilos na cavidade peritoneal dos animais com sepse.

Em acordo com os níveis protéicos de AGP, os níveis de RNAm quantificados por *real-time* PCR foram significativamente maiores nos animais diabéticos FO ou com SNG em relação aos

camundongos não diabéticos FO ou com SNG (Figura 27C). O tratamento com insulina dos animais diabéticos resultou em uma significativa inibição dos níveis de RNAm.

Confirmando o papel inibitório da AGP sobre a migração dos neutrófilos (Mestriner *et al.*, 2007), nós observamos que a administração *i.v.* de AGP 30 min antes da cirurgia em camundongos com SNG inibiu a migração de neutrófilos para o foco infeccioso, assim como induziu redução na expressão de CD62L e aumento na expressão de CD11b nos neutrófilos circulantes (Figura 28B e 28C, respectivamente, parâmetros avaliados 6 h após a cirurgia). Como mostrado anteriormente, o tratamento com insulina previniu a falência da migração de neutrófilos nos animais diabéticos e também a redução na expressão de CD62L e o aumento na expressão de CD11b nos neutrófilos sanguíneos. Entretanto, esse efeito benéfico sobre os neutrófilos pelo tratamento com insulina foi abolido quando a AGP foi administrada por via *i.v.* antes da indução da sepse. A Figura 28 também mostra os histogramas representativos da expressão de CD62L e CD11b nos neutrófilos sanguíneos (células com alta expressão de GR-1).

A Figura 29 mostra a expressão de GRK2 nos neutrófilos 6 h após a cirurgia de camundongos não diabéticos e diabéticos tratados ou não com AGP e submetidos à sepse. Como mostrado anteriormente, a expressão da GRK2 nos neutrófilos de camundongos não diabéticos com SG e diabéticos com SNG aumentou significativamente em comparação com animais não diabéticos com SNG ou FO (Figura 29). De maneira interessante, o tratamento dos animais com AGP aumentou a expressão de GRK2, tanto nos neutrófilos de animais não diabéticos com SNG como nos diabéticos tratados com insulina e submetidos à SNG.

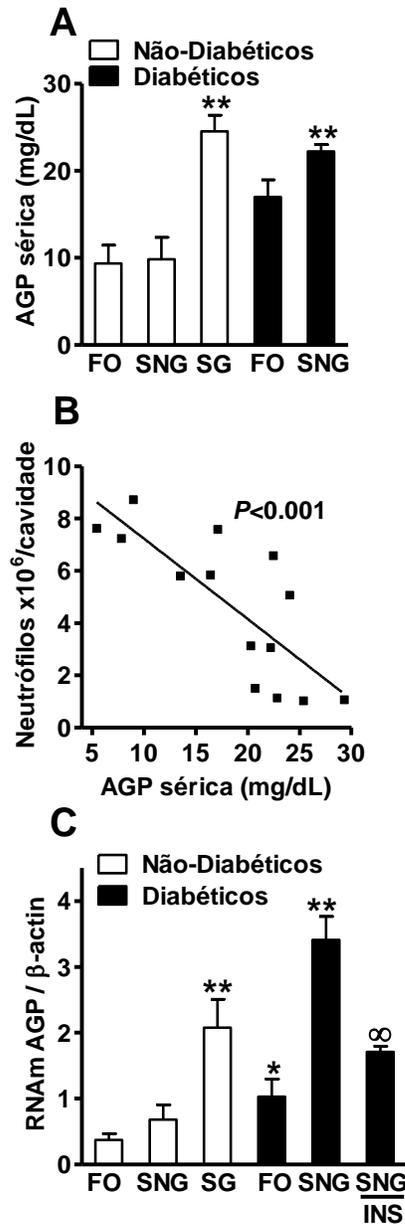


Figura 27: Os níveis séricos de alfa-1-glicoproteína ácida (AGP) correlacionam-se negativamente com a redução da migração de neutrófilos. Dez dias após a administração de aloxana ou salina, os camundongos foram submetidos à sepse não-grave (SNG), sepse grave (SG) ou falso-operados (FO) pelo modelo de CLP. Seis horas após a indução da sepse, o sangue dos animais foi coletado e o soro separado para quantificação da AGP. **(A)** Níveis séricos de AGP. **(B)** Correlação entre os níveis séricos de AGP e o número de neutrófilos presentes na cavidade peritoneal dos animais submetidos à SNG ou a SG. **(C)** Três horas após a indução da sepse, os animais foram mortos e o fígado coletado para análise do RNAm da AGP por *real time*-PCR. CLP = ligação e perfuração do ceco; INS = grupo de animais tratados com insulina.

Protocolo experimental Figuras 28 e 29.

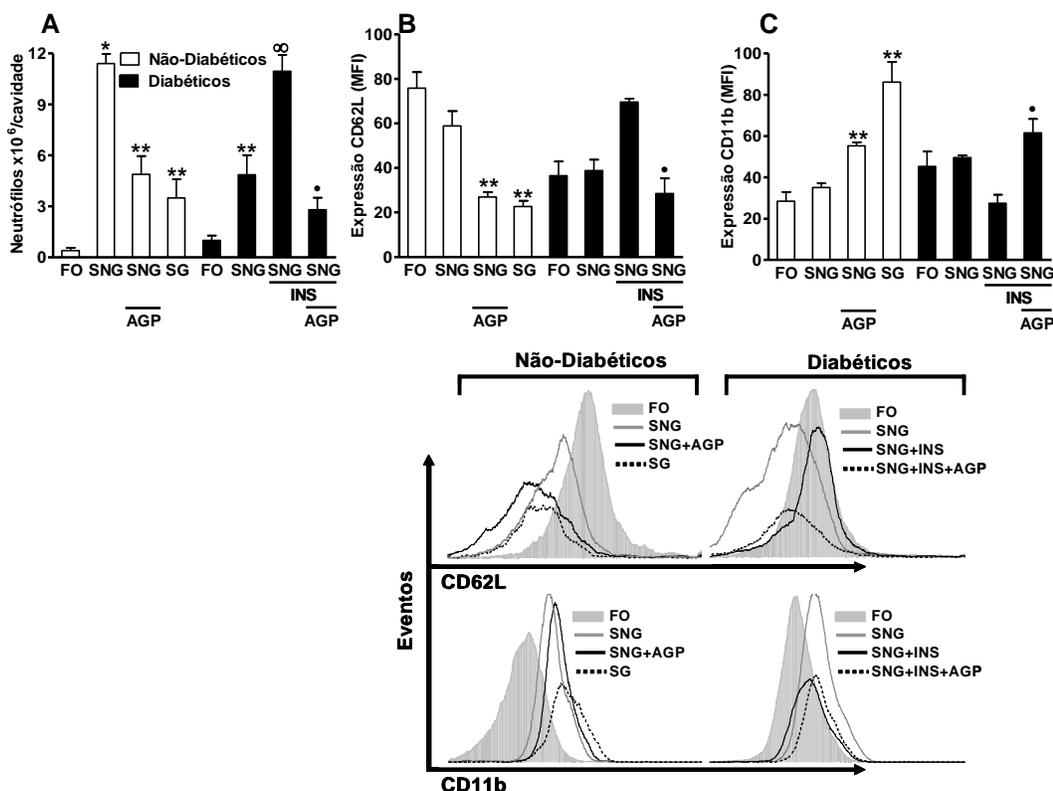
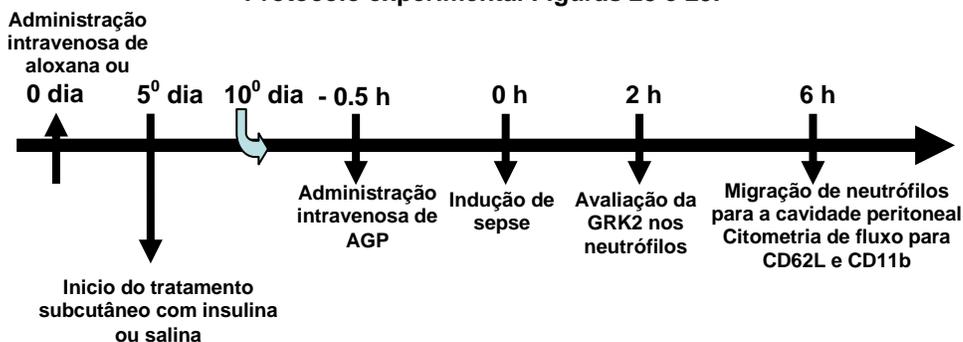


Figura 28: Administração de alfa-1-glicoproteína ácida (AGP) inibe a migração de neutrófilos e modula a expressão de moléculas de adesão nos neutrófilos. Trinta min antes da cirurgia foi administrado AGP (10 µg/camundongo, *i.v.*). Um grupo de camundongos diabéticos foi tratado com insulina (INS). Os camundongos diabéticos e não diabéticos foram submetidos à sepse não-grave (SNG), sepse grave (SG) ou falso-operados (FO) pelo modelo de CLP. Seis horas após a cirurgia o sangue e as células da cavidade peritoneal foram coletados. (A) Migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal. Expressão do receptor (B) CD62L e (C) CD11b nos neutrófilos circulantes. Os resultados foram expressos como média ± EPM de intensidade de fluorescência média (MFI) ou do número de neutrófilos por cavidade (n=5). Os resultados são representativos de 2 experimentos independentes. * $P < 0,05$ comparado ao grupo FO Não-Diabéticos; ** $P < 0,05$ comparado ao grupo SNG Não-Diabéticos; ∞ $P < 0,05$ comparado ao grupo SNG Diabéticos; • $P < 0,05$ comparado ao grupo SNG + INS Diabéticos (ANOVA, seguido por teste de Bonferroni). CLP = ligação e perfuração do ceco; INS = insulina.

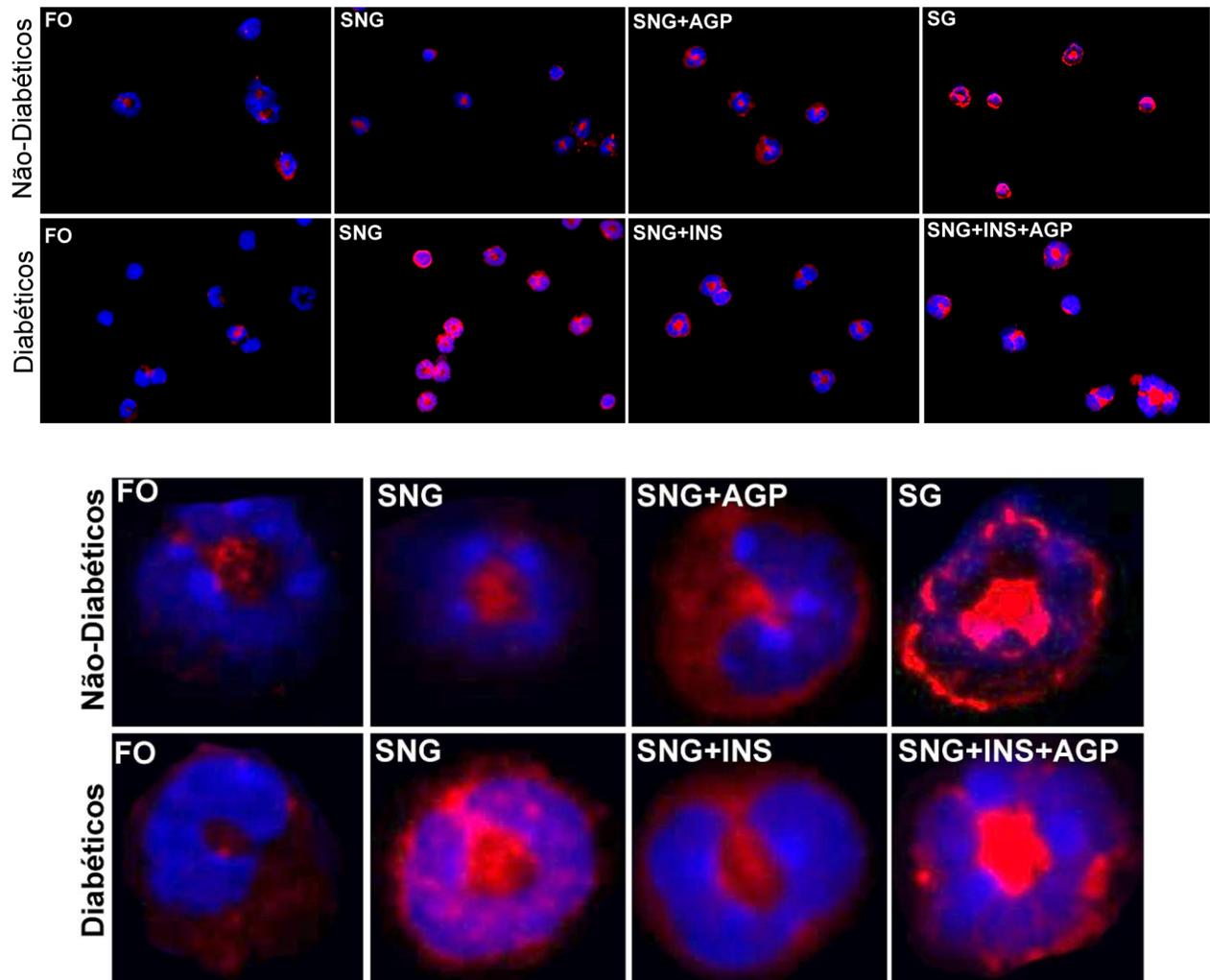
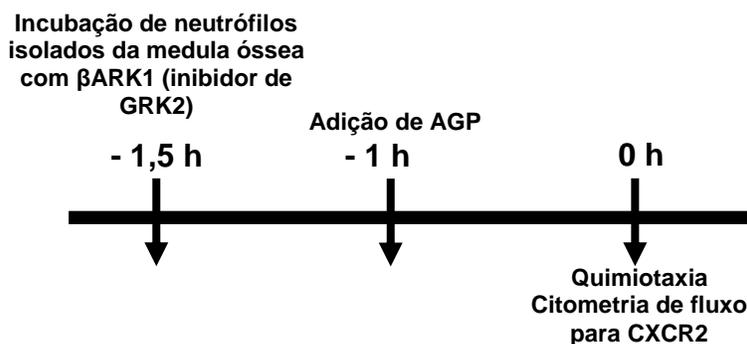


Figura 29: Administração de alfa-1-glicoproteína ácida (AGP) aumenta a expressão de GRK2 nos neutrófilos. Dez dias após a administração de aloxana ou salina os camundongos foram submetidos à sepse não-grave (SNG), sepse grave (SG) ou falso-operados (FO) pelo modelo de CLP. Um grupo de camundongos diabéticos foi tratado com insulina (INS). Trinta min antes da cirurgia foi administrado AGP (10 μ g/camundongo, *i.v.*). Duas horas após a indução da sepse o sangue dos animais foi coletado para análise da molécula GRK2 por imunofluorescência nos neutrófilos. CLP = ligação e perfuração do ceco; INS = insulina; GRK2 = quinase 2 de receptor acoplado à proteína G. Painel inferior aumento de 10 vezes em relação ao painel superior.

6.4.7. *In vitro*, AGP inibiu a quimiotaxia e diminuiu a expressão do CXCR2 nos neutrófilos

Previamente demonstramos que a AGP (50 e 500 $\mu\text{g/mL}$) inibe a quimiotaxia de neutrófilos isolados do sangue de voluntários saudáveis (Mestriner *et al.*, 2007). A Figura 30A mostra que a incubação de neutrófilos isolados da medula óssea de camundongos por 1 h a 37⁰C com AGP (500 $\mu\text{g/mL}$) inibiu significativamente a resposta quimiotática induzida por CXCL8 (10 $\eta\text{g/mL}$). Além disso, a incubação dos neutrófilos com AGP reduziu a expressão do CXCR2 na membrana dos neutrófilos (Figura 30B e 30C). O pré-tratamento (30 min) dos neutrófilos com um inibidor da GRK2 (βARK1 , *β -Adrenergic Receptor Kinase1 Inhibitor*; 150 μM) preveniu parcialmente o efeito inibitório da AGP sobre a quimiotaxia dos neutrófilos e aboliu a redução da expressão do CXCR2 induzida pela AGP (Figure 30D e 30E).

Protocolo experimental Figura 30.



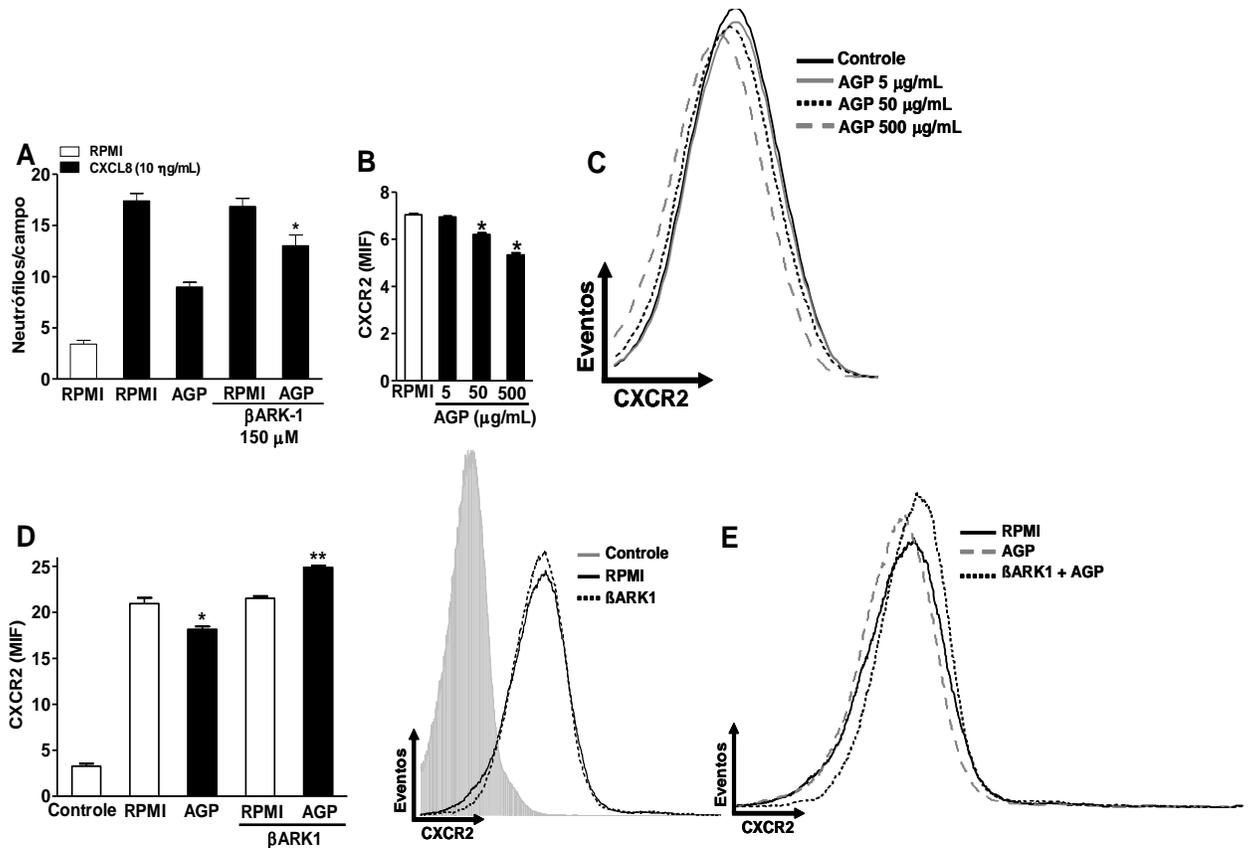


Figura 30. Alfa-1-glicoproteína (AGP) inibiu a quimiotaxia e reduziu a expressão do CXCR2 nos neutrófilos. Neutrófilos isolados da medula óssea de camundongos foram incubados por 30 min (37^o/5% CO₂) com RPMI ou RPMI mais β ARK1 (150 μ M, inibidor de GRK2) seguido por mais 1 h de incubação com RPMI (Controle), AGP (5, 50 ou 500 μ g/mL). Em seguida os neutrófilos foram submetidos à resposta quimiotática induzida por CXCL8 (10 ng/mL) (A; *P<0,05 comparado com AGP mais CXCL8) em câmara de Boyden ou marcados com anticorpo anti-CXCR2 e anti-GR-1. Histogramas representativos (C e E) e quantificação da expressão do receptor CXCR2 (B e D *P<0,05 comparado com RPMI; **P<0,05 comparado com AGP) nos neutrófilos (GR-1 positivos). (ANOVA, seguido por teste de Bonferroni).

7. DISCUSSÃO

7. DISCUSSÃO

7.1. Seps e Hemopexina

A falência da migração de neutrófilos para o foco infeccioso é um evento determinante para a alta taxa de mortalidade para a seps (Benjamim *et al.*, 2000; Crosara-Alberto *et al.*, 2002; Alves-Filho *et al.*, 2006). Os mecanismos que levam a esse fenômeno não estão totalmente compreendidos. Entretanto, as altas concentrações de citocinas e quimiocinas na circulação levam a redução do rolamento, adesão e quimiotaxia dos neutrófilos. Além de citocinas e quimiocinas, recentemente demonstramos que a proteína de fase aguda AGP é um dos mediadores da falência da migração de neutrófilos para o foco infeccioso na seps em humanos (Mestriner *et al.*, 2007).

Como descrito anteriormente, embora AGP possa ser um mediador importante para a falência da migração de neutrófilos na seps, nossos dados sugerem que esta proteína não está envolvida nos estágios iniciais da seps em camundongos. Dessa forma, nós isolamos e identificamos a Hx como um dos mediadores da fase inicial da falência da migração de neutrófilos durante a seps induzida por CLP em camundongos (Anexo 1). A Hx inibiu a migração de neutrófilos e aumentou a taxa de mortalidade dos animais com CLP. Em acordo com esses resultados, camundongos deficientes para Hx submetidos à seps grave não apresentaram falência da migração de neutrófilos para o foco infeccioso. Como consequência, esses camundongos tiveram menos bacteremia e um aumento na taxa de sobrevivência comparado com camundongos selvagens. Além disso, *in vitro*, Hx inibiu a quimiotaxia de neutrófilos e induziu a diminuição da expressão do CXCR2 e CD62L e aumentou a expressão de CD11b. Este estudo mostra pela primeira vez o papel deletério da Hx durante a seps.

Como é o caso de muitas APPs, a concentração sérica de Hx pode aumentar durante um processo inflamatório (Duan *et al.*, 2005; Wait *et al.*, 2005). Entretanto, 2 e 6 h após a seps

induzida por CLP ou administração de *K. pneumonia* os níveis séricos de Hx estavam diminuídos. Quando avaliamos a transcrição do RNAm hepático de Hx observamos que 3 h após a sepse grave esses níveis eram aproximadamente 18 vezes maiores em comparação com os animais FO. Esses resultados sugerem que durante a sepse pode ocorrer um consumo de Hx. Diminuição sérica de Hx ocorre em situações de hemólise intravascular ou de coagulação intravascular disseminada (Kastrup *et al.*, 1975; Delanghe e Langlois, 2001). A coagulação intravascular disseminada é encontrada com frequência durante a sepse grave e nessas condições pode ocorrer um aumento de grupamentos heme na circulação. Além disso, durante a sepse pode ocorrer um aumento de grupamentos heme devido a hemólise intravascular. Uma das funções da Hx é o transporte de grupamento heme da circulação para o fígado (Tolosano e Altruda, 2002). Dessa forma, a diminuição dos níveis séricos de Hx na sepse pode ocorrer pela depuração dos grupamentos heme da circulação. Alternativamente, os níveis de Hx poderiam estar diminuídos pela degradação dessa proteína, entretanto a incubação de Hx com sangue total ou soro dos animais com sepse descartou essa hipótese.

Hx é uma glicoproteína plasmática de aproximadamente 60 KDa com uma alta afinidade pelo grupamento heme, formando um complexo de equivalência molar 1:1. Após a ligação com o grupamento heme, Hx sofre uma mudança conformacional permitindo a interação com o receptor CD91/LRP (*lipoprotein receptor-related protein*) expresso principalmente em hepatócitos. Após a ligação com o receptor, o complexo Hx-heme é internalizado (Tolosano e Altruda, 2002; Hvidberg *et al.*, 2005). Como mencionado, Hx é a principal responsável pelo transporte intravascular de heme, dessa forma, previne tanto as lesões oxidativas ocasionadas pelo heme como também a perda de heme pelo organismo (Tolosano e Altruda, 2002). O papel da Hx como um depurador de heme da circulação foi claramente demonstrado em modelos animais de hemólise intravascular e administração de heme utilizando camundongos deficientes para Hx (Tolosano *et al.*, 1999). No

modelo de hemólise intravascular pela administração de fenilidrazina, os animais deficientes para Hx tiveram um agravamento nas lesões renais em comparação com os camundongos selvagens (Tolosano *et al.*, 1999). Além disso, em um modelo de administração de altas quantidades de heme, os camundongos deficientes para Hx tiveram uma maior ativação do endotélio, aumento da peroxidação lipídica e aumento na permeabilidade vascular (Vinchi *et al.*, 2008). Neste estudo, nós demonstramos um papel deletério da Hx na sepse. Hx administrada por via *i.v.* em camundongos submetidos à sepse não grave inibiu a migração de neutrófilos para o foco infeccioso e aumentou a taxa de mortalidade nesses camundongos. Além disso, camundongos deficientes para Hx e submetidos à sepse grave tiveram um significativo aumento no número de neutrófilos no foco infeccioso e aumento em torno de ~40% na taxa de sobrevivência, quando comparados com os animais selvagens. Esses resultados aparentemente contraditórios aos modelos de hemólise e sobrecarga de heme podem ser explicados por diferentes mecanismos envolvidos nessas condições patológicas. No modelo de administração de heme ou de hemólise intravascular as lesões teciduais observadas nos animais deficientes para Hx são ocasionadas principalmente por estresse oxidativo, ativação das células endoteliais e infiltrado de leucócitos (Tolosano *et al.*, 1999; Tolosano *et al.*, 2002; Vinchi *et al.*, 2008). Essas alterações são catalizadas principalmente pelo heme livre que é altamente tóxico pela sua habilidade em catalisar as reações de espécies reativas do oxigênio, promovendo assim dano oxidativo. Dessa forma, a Hx por sequestrar o heme livre, previne as lesões endoteliais e teciduais. Por outro lado, a eficiente migração de neutrófilos observada nos animais deficientes para Hx após a indução de sepse grave promoveu um melhor controle da infecção, como mostrado pela redução no conteúdo de UFC no foco infeccioso e sangue. As bactérias e seus produtos na circulação sanguínea podem induzir a ativação de TLRs aumentando os níveis séricos de citocinas e também ativando os leucócitos da circulação. A ativação dos leucócitos na circulação é seguida por falência da migração de neutrófilos para o foco infeccioso e

sequestro dessas células em tecidos como pulmão e coração (Figura 1). Corroborando com um melhor controle da infecção, os camundongos deficientes para Hx submetidos à sepse grave tiveram baixos níveis séricos de TNF- α e redução no sequestro de leucócitos no pulmão, quando comparados com animais selvagens. Os baixos níveis séricos de TNF- α e de leucócitos no pulmão provavelmente também contribuíram para o aumento na taxa de sobrevivência dos camundongos deficientes para Hx. O pulmão é um dos principais e primeiros órgãos afetados por lesões durante a sepse grave, principalmente pelo sequestro e infiltrado de leucócitos. No pulmão, os leucócitos ativados promovem a liberação de espécies reativas do oxigênio, enzimas proteolíticas e outros mediadores inflamatórios que podem levar à lesão aguda pulmonar (Guo *et al.*, 2002) e à síndrome da disfunção respiratória aguda, esta última associada a hipoxia tecidual e alta taxa de mortalidade durante o choque séptico (Connelly e Repine, 1997; Crimi e Slutsky, 2004). Além do sequestro de leucócitos no pulmão, os altos níveis séricos de TNF- α são descritos por possuírem uma função deletéria durante a sepse. Os níveis de TNF- α aumentam significativamente na circulação e são correlacionados com a mortalidade de pacientes com sepse grave (Damas *et al.*, 1989). *In vivo*, administração de TNF- α parcialmente recapitula os sintomas do choque séptico por induzir hipotensão, disfunção cardíaca, edema (Tracey *et al.*, 1986) e falência da migração de neutrófilos (Tavares-Murta *et al.*, 1998). Além disso, ausência da sinalização dos receptores de TNF- α leva a diminuição da resposta inflamatória sistêmica com diminuição da lesão tecidual e aumento na taxa de sobrevivência em camundongos com sepse (Secher *et al.*, 2009).

Outro resultado interessante mostrando o papel inibitório da Hx sobre a migração dos neutrófilos é que camundongos deficientes para Hx tiveram uma maior quantidade de neutrófilos 4 horas após a indução de sepse não grave, quando comparados aos animais selvagens (Figura 7B). Este aumento no número de neutrófilos não é devido ao aumento da concentração de citocinas no local da infecção, uma vez que os níveis de TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10 foram similares em ambas

as linhagens. Na sepse não grave experimental, os camundongos possuem uma eficiente migração de neutrófilos para o foco infeccioso e não desenvolvem as deletérias consequências da disseminação bacteriana (Alves-Filho *et al.*, 2008). Sendo assim, o aumento no número de neutrófilos nos animais deficientes para Hx sugere um papel regulador negativo da Hx sobre a migração dos neutrófilos. Corroborando com esses resultados, em outro modelo de peritonite estéril induzida por carragenina, a Hx também inibe a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal (Figura 6).

Explorando o mecanismo de ação da Hx sobre a migração dos neutrófilos, observamos uma resposta quimiotática similar ao C5a entre os neutrófilos isolados da medula óssea dos animais deficientes para Hx ou dos selvagens. Entretanto, quando Hx foi incubada com os neutrófilos antes do ensaio de quimiotaxia, a resposta ao C5a ou ao MIP-2 foi inibida. Este efeito inibitório também foi observado nos neutrófilos isolados dos animais TLR4^{-/-} ou MyD88^{-/-}, demonstrando que esse efeito não é devido a contaminação da amostra por LPS. A inibição da quimiotaxia foi observada com ambos Hx e o complexo Hx-heme, sugerindo que este efeito é independente do receptor CD91/LRP presente nestas células, uma vez que Hx não complexada possui baixa afinidade por esse receptor. O receptor CD91/LRP tem sido descrito como um internalizador do complexo Hx-heme (Hvidberg *et al.*, 2005). No interior das células, o heme é rapidamente catabolizado pela heme oxigenase (HO) que abre o anel porfirina produzindo biliverdina, monóxido de carbono (CO) e ferro livre, o qual pode se ligar a ferritina. A ativação da HO pelo LPS ou pelo hemim com a consequente produção de CO inibiu a resposta quimiotática dos neutrófilos e os inibidores da HO previnem este efeito (resultados não publicados, Freitas A e Cunha FQ). Neste contexto, embora o complexo Hx-heme também iniba a quimiotaxia de neutrófilos, os inibidores da HO (*zinc deuteroporphyrin 2,4-bis glycol, ZnDPBG or zinc protoporphyrin IX, ZnPP IX*) não impedem a inibição da quimiotaxia induzida pela Hx ou pelo complexo Hx-heme (resultados não mostrados),

sugerindo que o efeito inibitório da Hx sobre a quimiotaxia dos neutrófilos é independente da via CD91/HO/CO.

Como Hx liga nos neutrófilos e induz a redução da quimiotaxia/migração não foi explorado neste estudo. Entretanto, a inibição da quimiotaxia/migração dos neutrófilos pela Hx pode ser induzida através dos grupamentos de sialil Lewis X (sLeX) presentes nesta glicoproteína. As porções de carboidratos da Hx podem competir com as porções de ácido siálico das glicoproteínas presentes nas células endoteliais e/ou nos neutrófilos e, dessa forma, impedir a quimiotaxia dos neutrófilos e as interações endotélio-leucócitos (De Graaf *et al.*, 1993; Delmotte *et al.*, 2002; Higai *et al.*, 2005). Diversas lectinas que interagem com os grupamentos sLeX inibem a migração de neutrófilos e, mais especificamente, análogos estruturais do sLeX, como o composto CY-1503, inibem a migração de neutrófilos em diferentes modelos inflamatórios (Rubio-Avilla *et al.*, 1997; Schmid *et al.*, 1997; Garcia-Criado *et al.*, 1999). Neste contexto, alguns estudos demonstraram mudanças no conteúdo de glicanas presentes no soro sanguíneo em diversas patologias, como sepse, pancreatite aguda diabetes e artrite (Gornik *et al.*, 2007; Gornik e Lauc, 2008). Alterações nos grupamentos de carboidratos da Hx foram relatados em doenças como artrite, cancer e alcoolismo crônico (Saso *et al.*, 1992; Wang *et al.*, 1993; Matsumoto *et al.*, 1994; Zhao *et al.*, 2007). Corroborando com a hipótese de que Hx pode também inibir as interações entre os leucócitos com as células endoteliais, Suzuki e colaboradores demonstraram que Hx inibe a adesão de neutrófilos a superfícies recobertas com soro ou fibrinogênio (Suzuki *et al.*, 2003).

Alternativamente, Hx pode exercer seus efeitos inibitórios sobre os neutrófilos pela sua atividade proteásica (Cheung *et al.*, 1999). De acordo com esta hipótese, em indivíduos saudáveis a Hx poderia circular em uma conformação inativa ou complexada com inibidores e durante a sepse o aumento da atividade proteásica da Hx e/ou a expressão de uma isoforma ativa levaria a inibição da migração de neutrófilos. De fato, demonstramos que diferente do soro dos camundongos selvagens

com sepse grave, soro dos animais selvagens falso-operados ou com sepse não-grave não inibiu a migração de neutrófilos. Reforçando um efeito central da Hx no efeito inibitório do soro sobre os neutrófilos, soro dos animais com sepse grave deficientes para Hx não inibiu a migração dos neutrófilos (Figura 6). Os possíveis inibidores da atividade proteásica da Hx são os nucleotídeos da adenina ou serina proteases. Esta premissa é suportada pela demonstração de que nucleotídeos da adenina são envolvidos na manutenção da Hx em uma forma inativa, pois o contato da Hx sérica com ecto-ADPase resulta na ativação de uma forma de Hx com atividade proteásica. Por outro lado, a incubação da Hx com ADP ou ATP inibe a sua atividade proteásica. (Kapojos *et al.*, 2004). Em um contexto de sepse, isso pode ocorrer pelo aumento da expressão da ADPase endotelial devido a estímulos inflamatórios e/ou diminuição das concentrações séricas de ATP e ADP (Kittel, 1999). *In vitro*, LPS ou TNF- α induzem o aumento da expressão de ecto-ADPase em células endoteliais ou células mesenquimais e como resultado convertem a Hx em uma forma ativa (Kapojos *et al.*, 2004).

Quimiocinas coordenam a migração e quimiotaxia dos leucócitos através de sua ligação a receptores específicos (Ley *et al.*, 2007). CXCR2 desempenha um papel central no recrutamento dos neutrófilos da circulação para o foco infeccioso (Olson e Ley, 2002). Neste contexto, a falência da migração dos neutrófilos está correlacionada a uma precoce diminuição da expressão do CXCR2 nos neutrófilos circulantes (Rios-Santos *et al.*, 2007). Neste trabalho nós sugerimos a Hx como um mediador desse fenômeno, uma vez que Hx induziu a diminuição do CXCR2 nos neutrófilos. Essa diminuição do CXCR2 foi acompanhada pela redução da resposta quimiotática dos neutrófilos ao MIP-2. Além disso, Hx induziu uma redução na expressão de CD62L e aumento na expressão de CD11b. A redução na expressão de CD62L e o aumento na expressão de CD11b têm sido descritos como uma consequência da ativação dos neutrófilos na circulação durante a sepse (Seidelin *et al.*, 2002; Turunen *et al.*, 2005). Dessa forma, essas alterações induzidas pela Hx nos neutrófilos podem impedir o rolamento e a quimiotaxia, contribuindo assim para a falência da migração dessas células para o foco infeccioso.

7.2. Diabetes e AGP

Nesta parte do estudo, usamos o modelo de diabetes mellitus por administração de aloxana em camundongos para estudar os mecanismos envolvidos na susceptibilidade a infecções observadas nessa patologia. Nosso trabalho pela primeira vez demonstra que a redução nas interações entre os neutrófilos e as células endoteliais é uma consequência da inapropriada ativação dos neutrófilos. Neutrófilos da circulação de camundongos diabéticos submetidos à sepse não grave possuem altos níveis de GRK2 e CD11b e baixos níveis de CXCR2 e CD62L. Isso resulta na redução da resposta quimiotática dos neutrófilos e redução no rolamento e adesão dos leucócitos ao endotélio, e como consequência, leva a falência da migração de neutrófilos para o foco infeccioso, disseminação bacteriana e alta mortalidade. De maneira interessante, pelo menos em parte, nossos resultados seguramente sugerem que a imunossupressão encontrada nos camundongos diabéticos é mediada pela AGP.

Como já discutido neste trabalho, os neutrófilos são essenciais para a eliminação dos microorganismos durante um processo infeccioso. Na diabetes mellitus em humanos e nos modelos experimentais, muitos estudos têm demonstrado um defeito na migração/quimiotaxia dos neutrófilos (Mowat e Baum, 1971; Pereira *et al.*, 1987; Sannomiya *et al.*, 1990). De fato, confirmamos este fenômeno mostrando que camundongos diabéticos submetidos à sepse não grave exibem uma redução da migração dos neutrófilos para o foco infeccioso e, como consequência, altas quantidades de bactérias no lavado peritoneal e sangue e 100% de mortalidade 4 dias após a sepse. A falência da migração dos neutrófilos nos animais diabéticos não é uma consequência da falta de mediadores inflamatórios no local da infecção, uma vez que os níveis de TNF- α e MIP-2 no lavado peritoneal dos animais diabéticos foram maiores que nos camundongos não diabéticos submetidos ao mesmo estímulo séptico, os quais possuem uma eficiente migração de neutrófilos.

Em seguida, investigamos os mecanismos pelos quais os animais diabéticos possuem falência da migração de neutrófilos para o foco infeccioso. Primeiro, investigamos o rolamento e adesão dos leucócitos ao endotélio após a indução da sepse. Através da técnica de microscopia intravital, demonstramos que os animais diabéticos submetidos à sepse não grave possuem uma significativa inibição do rolamento e adesão dos leucócitos nas vênulas da circulação mesentérica. Nossos resultados estão de acordo com Fortes e colaboradores (Fortes *et al.*, 1991), que demonstraram redução do rolamento dos leucócitos no endotélio das vênulas da fascia espermática de ratos diabéticos. Até o presente momento, nosso estudo é o primeiro a demonstrar redução do rolamento e adesão dos leucócitos na microcirculação durante um processo infeccioso em animais diabéticos.

O rolamento e adesão dos leucócitos depende das interações das moléculas de adesão presentes nos leucócitos e nas células endoteliais (Smith, 1993). Dessa forma, investigamos a expressão de CD62L e CD11b nos neutrófilos. Os neutrófilos de camundongos diabéticos tiveram uma significativa redução na expressão de CD62L e aumento na expressão de CD11b, quando comparados com animais não diabéticos submetidos ao mesmo estímulo séptico. Em acordo, um significativo aumento na expressão de CD11b assim como diminuição na expressão de CD62L foi observada em pacientes com microangiopatia diabética (Mastej e Adamiec, 2008). Essas alterações nos neutrófilos contribuem para um ineficiente rolamento e adesão, levando a supressão da transmigração através do endotélio.

Mediadores quimiotáticos e seus receptores também desempenham um papel central em regular a ativação e os movimentos dos leucócitos através da matriz extracelular (Baggiolini, 1998). A importância das quimiocinas CXC-ELR⁺ e seus receptores para sistema imune inato contra infecções tem sido demonstrada em vários modelos (Zabel *et al.*, 2006). Neste contexto, CXCR2 é um receptor essencial para o combate contra infecções devido a *P. aeruginosa* (Tsai *et al.*, 2000),

N. asteroides (Moore *et al.*, 2000) *A. fumigatus* (Mehrad *et al.*, 1999) ou a sepse polimicrobiana (Rios-Santos *et al.*, 2007), uma vez que o bloqueio do CXCR2 induz um aumento na gravidade nessas infecções. Na sepse em humanos (Cummings *et al.*, 1999; Chishti *et al.*, 2004) e experimental (Rios-Santos *et al.*, 2007; Alves-Filho *et al.*, 2009), a redução da migração/quimiotaxia é associada com diminuição da expressão do CXCR2 na membrana dos neutrófilos. Neste estudo, verificamos que neutrófilos sanguíneos de animais diabéticos submetidos à sepse não grave por CLP tiveram uma significativa redução na expressão de CXCR2, quando comparados com neutrófilos de animais não diabéticos submetidos ao mesmo estímulo infeccioso. Os níveis da expressão do CXCR2 nos neutrófilos dos animais diabéticos com sepse não grave foram similares aos encontrados nos animais não diabéticos submetidos à sepse grave. Corroborando com esses resultados, neutrófilos de camundongos diabéticos submetidos à sepse tiveram diminuição na resposta quimiotáxica induzida pelo MIP-2. *In vivo*, administração de MIP-2 na cavidade peritoneal dos animais diabéticos induziu uma migração de neutrófilos reduzida em comparação com os animais não diabéticos.

Subsequente, investigamos se a redução na expressão de CXCR2 nos neutrófilos durante o desenvolvimento de sepse nos animais diabéticos era mediado pela ativação da GRK2. GRKs são uma família de serina/treonina quinases que regulam a internalização de quase todas as famílias de receptores acoplados a proteínas G, incluindo receptores de quimiocinas (Pitcher *et al.*, 1998). GRK2 tem sido descrita como um regulador de receptores de quimiocinas (ex. CCRs e CXCRs) e também outros receptores quimiotáxicos (ex. receptores para fMLP e C5a) (Prossnitz *et al.*, 1995; Langkabel *et al.*, 1999). Nosso grupo de pesquisa demonstrou um aumento nos níveis de GRK2 nos neutrófilos de pacientes com sepse (Arraes *et al.*, 2006), os quais estavam associados à diminuição da resposta a IL-8, LTB4 e ao fMLP (Tavares-Murta *et al.*, 2002; Arraes *et al.*, 2006). Além disso, neutrófilos de camundongos com sepse grave também possuem altos níveis de GRK2 comparados

com animais com sepse não grave (Alves-Filho *et al.*, 2009), resultados confirmados neste estudo (Figura 26). Notavelmente, neutrófilos de animais diabéticos submetidos à sepse não grave tiveram um aumento significativo na expressão de GRK2, quando comparados com camundongos não diabéticos submetidos ao mesmo estímulo séptico.

Além dos resultados apresentados até o momento, uma questão fundamental permanece não respondida. Qual é o principal fator que inicia as alterações nos animais diabéticos tornando-os susceptíveis a infecções? A proteína de fase aguda AGP tem sido descrita como uma proteína com atividade inibitória sobre as funções dos leucócitos (Fournier *et al.*, 2000). Nós demonstramos que esta proteína é um dos mediadores da falência da migração de neutrófilos em humanos e inibe o rolamento, adesão e migração dessas células (Mestriner *et al.*, 2007). As concentrações de AGP aumentam durante um processo inflamatório, infeccioso ou em algumas patologias como a diabetes (Baumann e Gauldie, 1990; 1994; Akbay *et al.*, 2004). Neste contexto, nós encontramos altos níveis séricos de AGP no soro de camundongos com diabetes. Os níveis de AGP após a indução de sepse não grave nos animais diabéticos foram similares aos níveis encontrados nos animais não diabéticos com sepse grave. Em contraste, níveis séricos de AGP permaneceram inalterados após a indução de sepse não grave nos animais não diabéticos. Além disso, os níveis séricos de AGP foram negativamente correlacionados com a migração dos neutrófilos para o foco infeccioso durante a sepse. Corroborando com esses resultados, os níveis hepáticos do RNAm para AGP foram significativamente maiores nos animais diabéticos submetidos a sepse não grave, quando comparados com camundongos não diabéticos submetidos ao mesmo estímulo séptico. Outro interessante experimento mostrou que a administração por via *i.v.* de AGP inibiu a migração dos neutrófilos para o foco infeccioso, aumentou a expressão de CD11b e GRK2 e diminuiu a expressão de CD62L nos neutrófilos. *In vitro*, a incubação de AGP com neutrófilos inibiu a resposta quimiotática e induziu a diminuição da expressão do CXCR2. A redução da quimiotaxia

induzida pela AGP foi parcialmente inibida pelo pré-tratamento dos neutrófilos com um inibidor de GRK2. Além disso, esse inibidor aboliu a redução da expressão do CXCR2 induzida pela AGP. Esses resultados sugerem que, pelo menos em parte, o efeito inibitório da AGP sobre a redução da quimiotaxia dos neutrófilos deve-se a redução da expressão do CXCR2 mediada pela GRK2. Em neutrófilos de humanos, demonstramos que a AGP inibe a quimiotaxia de neutrófilos por um mecanismo dependente da ativação da via iNOS/NO/GMPc (Mestriner *et al.*, 2007). Ainda que *in vitro* a AGP iniba a quimiotaxia dos neutrófilos através da ativação da enzima iNOS, o tratamento dos animais diabéticos com aminoguanidina (um inibidor da NOS, 50 mg/Kg, *s.c.*, administração única) não preveniu a falência da migração dos neutrófilos para o foco infeccioso nos animais diabéticos (resultados não mostrados). Esses resultados sugerem que AGP pode ter um importante papel imunomodulador durante a diabetes, principalmente por reduzir a migração dos neutrófilos, tornando assim, os camundongos diabéticos susceptíveis a infecções.

A AGP é uma glicoproteína composta por ~45% de carboidratos e, assim como discutido anteriormente, as porções de carboidratos dessa proteína também podem competir com os carboidratos presentes nas células endoteliais e/ou nos neutrófilos e impedir a quimiotaxia dos neutrófilos e as interações endotélio-leucócitos. Aumento no conteúdo de grupamentos de sLeX na AGP foi relatado em resposta a estímulos inflamatórios (De Graaf *et al.*, 1993; Higai *et al.*, 2003) e também em pacientes com sepse, sendo este aumento correlacionado com a gravidade dos pacientes sépticos (Brinkman-Van Der Linden *et al.*, 1996) e diabetes (Poland *et al.*, 2001). Na literatura existem algumas demonstrações sugerindo que a AGP circulante com um alto conteúdo de grupamentos sLeX pode funcionar como um inibidor da migração de neutrófilos: 1) *in vitro*, oligosacarídeos hiperfucosilados derivados da AGP isolada do sangue de pacientes com artrite reumatóide inibe a ligação de grupamentos sLeX a E-selectina (Jorgensen *et al.*, 1998). 2) como mencionado, o nosso grupo claramente demonstrou que AGP inibe o rolamento e adesão e a quimiotaxia dos leucócitos (Mestriner *et al.*, 2007). 3) Nos

neutrófilos, a AGP liga-se à imunoglobulina-tipo lectina 5 (*immunoglobulin-like lectin 5*, Siglec-5) e induz o aumento de cálcio intracelular. Siglec-5 é um dos integrantes de uma família de proteínas conhecida por serem receptores para grupamentos sLeX (Gunnarsson *et al.*, 2007). 4) AGP com hiperfucosilada impede a entrada de cálcio nos neutrófilos e, dessa forma, poderia atuar como um mecanismo inibitório autócrino e/ou parácrino da função dessas células (Levander *et al.*, 2009), uma vez que a AGP hiperfucosilada é armazenada e liberada pelo próprio neutrófilo (Poland *et al.*, 2005). 5) AGP de-glicosilada não possui atividade imunomoduladora sobre os leucócitos (Fournier *et al.*, 2000). 6) moléculas sintéticas que mimetizam a estrutura da porção de carboidratos da AGP exercem a mesma função que a proteína sobre os leucócitos (Shiyan e Bovin, 1997). 7) Análogos estruturalmente ao sLeX como o composto CY-1503 inibem a migração de neutrófilos em diferentes modelos inflamatórios (Rubio-Avilla *et al.*, 1997; Schmid *et al.*, 1997; Garcia-Criado *et al.*, 1999).

Além da redução da migração de neutrófilos observada nos camundongos diabéticos, outros estudos demonstram que ratos diabéticos possuem diminuição na migração de neutrófilos (Pereira *et al.*, 1987; Sannomiya *et al.*, 1990; Fortes *et al.*, 1991), capacidade fagocítica (Panneerselvam e Govindasamy, 2003) e redução na produção de peróxido de hidrogênio (Alba-Loureiro *et al.*, 2006). É importante também enfatizar que em pacientes com diabetes descompensada também observam-se anormalidades na quimiotaxia de neutrófilos (Mowat e Baum, 1971) e também na atividade microbicida (Tan *et al.*, 1975) e fagocítica dessas células (Bagdade *et al.*, 1972). Por outro lado, estudos com pacientes diabéticos com um controle adequado dos níveis glicêmicos não demonstram qualquer alteração que possa predispor os pacientes a infecções (Alba-Loureiro *et al.*, 2007). Ademais, a redução dos níveis de glicose pelo tratamento com insulina de pacientes (Jakelic *et al.*, 1995) ou ratos (Alba-Loureiro *et al.*, 2006) foram correlacionadas com aumento na capacidade fagocítica dos neutrófilos. Neste trabalho demonstramos que o tratamento com insulina preveniu a falência da migração dos neutrófilos para o foco infeccioso, melhorou o controle da

infecção e aumentou a taxa de sobrevivência dos animais diabéticos submetidos à sepse não grave para ~70% oito dias após a CLP. Além disso, o tratamento com insulina inibiu o aumento na expressão do RNAm hepático para AGP, impediu a diminuição na expressão de CXCR2 e CD62L e o aumentou a expressão de CD11b e GRK2 nos neutrófilos dos animais diabéticos submetidos a sepse não grave. Demonstrando um papel central da AGP na imunossupressão durante a diabetes, a administração de AGP reverteu os efeitos benéficos induzidos pelo tratamento com insulina.

Essa parte do estudo esclarece alguns mecanismos envolvidos na redução da migração dos neutrófilos e a consequente susceptibilidade dos animais diabéticos a infecções. Além disso, fornecemos algumas evidências de que o controle dos níveis de AGP durante a diabetes pode reduzir a incidência de sepse em pacientes com diabetes descompensada.

9. CONCLUSÃO

9. CONCLUSÃO

Nossos resultados reforçam as linhas de evidências que demonstram um papel antiinflamatório das APPs. Neste contexto, demonstrou-se que a proteína C reativa (Heuertz et al., 1999), amiloide séria A (Renckens et al., 2006), AGP (Mestriner et al., 2007) e agora a hemopexina inibem a migração/quimiotaxia dos neutrófilos. Além disso, algumas proteínas de fase aguda podem inibir a produção de mediadores pró-inflamatórios (Linke *et al.*, 1991; Logdberg e Wester, 2000; Matsumoto *et al.*, 2007). Liang e colaboradores (Liang *et al.*, 2009) demonstraram que Hx inibe a produção de citocinas induzidas pelo LPS em macrófagos. Dessa forma, as ações antiinflamatórias das APPs têm muitos benefícios por limitar o infiltrado de neutrófilos nos tecidos em situações de SIRS sem foco infeccioso. Entretanto, na sepse, a excessiva produção de mediadores antiinflamatórios já nas fases precoces da doença inibe a migração de neutrófilos e, como consequência, impede o controle do foco infeccioso. Sendo assim, a inibição terapêutica das APPs como a Hx e a AGP pode aumentar a migração dos neutrófilos para o foco infeccioso e promover um aumento na taxa de sobrevivência durante a sepse.

10. REFERÊNCIAS

10. REFERÊNCIAS

Adams, J. M., C. J. Hauser, D. H. Livingston, *et al.* Early trauma polymorphonuclear neutrophil responses to chemokines are associated with development of sepsis, pneumonia, and organ failure. **J Trauma**, v.51, n.3, Sep, p.452-6; discussion 456-7. 2001.

Ahluwalia, A., P. Foster, R. S. Scotland, *et al.* Antiinflammatory activity of soluble guanylate cyclase: cGMP-dependent down-regulation of P-selectin expression and leukocyte recruitment. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.101, n.5, Feb 3, p.1386-91. 2004.

Akbay, E., I. Yetkin, R. Ersoy, *et al.* The relationship between levels of alpha1-acid glycoprotein and metabolic parameters of diabetes mellitus. **Diabetes Nutr Metab**, v.17, n.6, Dec, p.331-5. 2004.

Alba-Loureiro, T. C., S. M. Hirabara, J. R. Mendonca, *et al.* Diabetes causes marked changes in function and metabolism of rat neutrophils. **J Endocrinol**, v.188, n.2, Feb, p.295-303. 2006.

Alba-Loureiro, T. C., C. D. Munhoz, J. O. Martins, *et al.* Neutrophil function and metabolism in individuals with diabetes mellitus. **Braz J Med Biol Res**, v.40, n.8, Aug, p.1037-44. 2007.

Alves-Filho, J. C., A. De Freitas, M. Russo, *et al.* Toll-like receptor 4 signaling leads to neutrophil migration impairment in polymicrobial sepsis. **Crit Care Med**, v.34, n.2, Feb, p.461-70. 2006.

Alves-Filho, J. C., A. De Freitas, F. Spiller, *et al.* The role of neutrophils in severe sepsis. **Shock**, v.30 Suppl 1, Oct, p.3-9. 2008.

Alves-Filho, J. C., A. Freitas, F. O. Souto, *et al.* Regulation of chemokine receptor by Toll-like receptor 2 is critical to neutrophil migration and resistance to polymicrobial sepsis. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.106, n.10, Mar 10, p.4018-23. 2009.

Angus, D. C., W. T. Linde-Zwirble, J. Lidicker, *et al.* Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. **Crit Care Med**, v.29, n.7, Jul, p.1303-10. 2001.

Angus, D. C. e R. S. Wax. Epidemiology of sepsis: an update. **Crit Care Med**, v.29, n.7 Suppl, Jul, p.S109-16. 2001.

Arraes, S. M., M. S. Freitas, S. V. Da Silva, *et al.* Impaired neutrophil chemotaxis in sepsis associates with GRK expression and inhibition of actin assembly and tyrosine phosphorylation. **Blood**, v.108, n.9, Nov 1, p.2906-13. 2006.

Bagdade, J. D., K. L. Nielson e R. J. Bulger. Reversible abnormalities in phagocytic function in poorly controlled diabetic patients. **Am J Med Sci**, v.263, n.6, Jun, p.451-6. 1972.

Baggiolini, M. Chemokines and leukocyte traffic. **Nature**, v.392, n.6676, Apr 9, p.565-8. 1998.

- Baumann, H. e J. Gauldie. Regulation of hepatic acute phase plasma protein genes by hepatocyte stimulating factors and other mediators of inflammation. **Mol Biol Med**, v.7, n.2, Apr, p.147-59. 1990.
- Baumann, H. e J. Gauldie. The acute phase response. **Immunol Today**, v.15, n.2, Feb, p.74-80. 1994.
- Benjamim, C. F., S. H. Ferreira e F. Q. Cunha. Role of nitric oxide in the failure of neutrophil migration in sepsis. **J Infect Dis**, v.182, n.1, Jul, p.214-23. 2000.
- Benjamim, C. F., J. S. Silva, Z. B. Fortes, *et al.* Inhibition of leukocyte rolling by nitric oxide during sepsis leads to reduced migration of active microbicidal neutrophils. **Infect Immun**, v.70, n.7, Jul, p.3602-10. 2002.
- Bone, R. C., R. A. Balk, F. B. Cerra, *et al.* Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. **Chest**, v.101, n.6, Jun, p.1644-55. 1992.
- Brinkman-Van Der Linden, E. C., E. C. Van Ommen e W. Van Dijk. Glycosylation of alpha 1-acid glycoprotein in septic shock: changes in degree of branching and in expression of sialyl Lewis(x) groups. **Glycoconj J**, v.13, n.1, Feb, p.27-31. 1996.
- Butler, S. O., I. F. Btaiche e C. Alaniz. Relationship between hyperglycemia and infection in critically ill patients. **Pharmacotherapy**, v.25, n.7, Jul, p.963-76. 2005.
- Carden, D. L. e D. N. Granger. Pathophysiology of ischaemia-reperfusion injury. **J Pathol**, v.190, n.3, Feb, p.255-66. 2000.
- Ceciliani, F., A. Giordano e V. Spagnolo. The systemic reaction during inflammation: the acute-phase proteins. **Protein Pept Lett**, v.9, n.3, Jun, p.211-23. 2002.
- Cheung, P. K., B. Stulp, S. Immenschuh, *et al.* Is 100KF an isoform of hemopexin? Immunochemical characterization of the vasoactive plasma factor 100KF. **J Am Soc Nephrol**, v.10, n.8, Aug, p.1700-8. 1999.
- Chishti, A. D., B. K. Shenton, J. A. Kirby, *et al.* Neutrophil chemotaxis and receptor expression in clinical septic shock. **Intensive Care Med**, v.30, n.4, Apr, p.605-11. 2004.
- Cinamon, G., V. Shinder, R. Shamri, *et al.* Chemoattractant signals and beta 2 integrin occupancy at apical endothelial contacts combine with shear stress signals to promote transendothelial neutrophil migration. **J Immunol**, v.173, n.12, Dec 15, p.7282-91. 2004.
- Clark, S. R., A. C. Ma, S. A. Tavener, *et al.* Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. **Nat Med**, v.13, n.4, Apr, p.463-9. 2007.

Coelho, A. L., M. S. De Freitas, A. Mariano-Oliveira, *et al.* RGD- and MLD-disintegrins, jarastatin and EC3, activate integrin-mediated signaling modulating the human neutrophils chemotaxis, apoptosis and IL-8 gene expression. **Exp Cell Res**, v.292, n.2, Jan 15, p.371-84. 2004.

Connelly, K. G. e J. E. Repine. Markers for predicting the development of acute respiratory distress syndrome. **Annu Rev Med**, v.48, p.429-45. 1997.

Crimi, E. e A. S. Slutsky. Inflammation and the acute respiratory distress syndrome. **Best Pract Res Clin Anaesthesiol**, v.18, n.3, Sep, p.477-92. 2004.

Crosara-Alberto, D. P., A. L. Darini, R. Y. Inoue, *et al.* Involvement of NO in the failure of neutrophil migration in sepsis induced by Staphylococcus aureus. **Br J Pharmacol**, v.136, n.5, Jul, p.645-58. 2002.

Cummings, C. J., T. R. Martin, C. W. Frevert, *et al.* Expression and function of the chemokine receptors CXCR1 and CXCR2 in sepsis. **J Immunol**, v.162, n.4, Feb 15, p.2341-6. 1999.

Cunliffe, R. N. Alpha-defensins in the gastrointestinal tract. **Mol Immunol**, v.40, n.7, Nov, p.463-7. 2003.

Dal Secco, D., A. P. Moreira, A. Freitas, *et al.* Nitric oxide inhibits neutrophil migration by a mechanism dependent on ICAM-1: role of soluble guanylate cyclase. **Nitric Oxide**, v.15, n.1, Aug, p.77-86. 2006.

Damas, P., A. Reuter, P. Gysen, *et al.* Tumor necrosis factor and interleukin-1 serum levels during severe sepsis in humans. **Crit Care Med**, v.17, n.10, Oct, p.975-8. 1989.

De Graaf, T. W., M. E. Van Der Stelt, M. G. Anbergen, *et al.* Inflammation-induced expression of sialyl Lewis X-containing glycan structures on alpha 1-acid glycoprotein (orosomucoid) in human sera. **J Exp Med**, v.177, n.3, Mar 1, p.657-66. 1993.

Delamaire, M., D. Maugendre, M. Moreno, *et al.* Impaired leucocyte functions in diabetic patients. **Diabet Med**, v.14, n.1, Jan, p.29-34. 1997.

Delanghe, J. R. e M. R. Langlois. Hemopexin: a review of biological aspects and the role in laboratory medicine. **Clin Chim Acta**, v.312, n.1-2, Oct, p.13-23. 2001.

Delmotte, P., S. Degroote, J. J. Lafitte, *et al.* Tumor necrosis factor alpha increases the expression of glycosyltransferases and sulfotransferases responsible for the biosynthesis of sialylated and/or sulfated Lewis x epitopes in the human bronchial mucosa. **J Biol Chem**, v.277, n.1, Jan 4, p.424-31. 2002.

Doerschuk, C. M. Mechanisms of leukocyte sequestration in inflamed lungs. **Microcirculation**, v.8, n.2, Apr, p.71-88. 2001.

- Duan, X., D. Yarmush, F. Berthiaume, *et al.* Immunodepletion of albumin for two-dimensional gel detection of new mouse acute-phase protein and other plasma proteins. **Proteomics**, v.5, n.15, Oct, p.3991-4000. 2005.
- Eddy, R. J., L. M. Pierini, F. Matsumura, *et al.* Ca²⁺-dependent myosin II activation is required for uropod retraction during neutrophil migration. **J Cell Sci**, v.113 (Pt 7), Apr, p.1287-98. 2000.
- Faurschou, M. e N. Borregaard. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. **Microbes Infect**, v.5, n.14, Nov, p.1317-27. 2003.
- Felty, A. e C. Keefer. Bacillus coli sepsis. **JAMA**, v.84, p.1430–1433. 1924.
- Fiuza, C., M. Salcedo, G. Clemente, *et al.* Granulocyte colony-stimulating factor improves deficient in vitro neutrophil transendothelial migration in patients with advanced liver disease. **Clin Diagn Lab Immunol**, v.9, n.2, Mar, p.433-9. 2002.
- Fortes, Z. B., S. P. Farsky, M. A. Oliveira, *et al.* Direct vital microscopic study of defective leukocyte-endothelial interaction in diabetes mellitus. **Diabetes**, v.40, n.10, Oct, p.1267-73. 1991.
- Fournier, T., N. N. Medjoubi e D. Porquet. Alpha-1-acid glycoprotein. **Biochim Biophys Acta**, v.1482, n.1-2, Oct 18, p.157-71. 2000.
- Freise, H., U. B. Bruckner e H. U. Spiegel. Animal models of sepsis. **J Invest Surg**, v.14, n.4, Jul-Aug, p.195-212. 2001.
- Garcia-Criado, F. J., J. J. Valdunciel-Garcia, J. Garcia-Garcia, *et al.* The sialyl Lewis X analogue, CY-1503, down-regulates leucocyte-endothelium interactions and the inflammatory response. **Eur J Surg**, v.165, n.7, Jul, p.690-7. 1999.
- Geerlings, S. E. e A. I. Hoepelman. Immune dysfunction in patients with diabetes mellitus (DM). **FEMS Immunol Med Microbiol**, v.26, n.3-4, Dec, p.259-65. 1999.
- Geerlings, S. E., R. P. Stolk, M. J. Camps, *et al.* Asymptomatic bacteriuria may be considered a complication in women with diabetes. Diabetes Mellitus Women Asymptomatic Bacteriuria Utrecht Study Group. **Diabetes Care**, v.23, n.6, Jun, p.744-9. 2000.
- Giagulli, C., L. Ottoboni, E. Cavegion, *et al.* The Src family kinases Hck and Fgr are dispensable for inside-out, chemoattractant-induced signaling regulating beta 2 integrin affinity and valency in neutrophils, but are required for beta 2 integrin-mediated outside-in signaling involved in sustained adhesion. **J Immunol**, v.177, n.1, Jul 1, p.604-11. 2006.
- Gimbrone, M. A., Jr., M. S. Obin, A. F. Brock, *et al.* Endothelial interleukin-8: a novel inhibitor of leukocyte-endothelial interactions. **Science**, v.246, n.4937, Dec 22, p.1601-3. 1989.
- Gomes, M. B., L. J. Piccirillo, V. G. Nogueira, *et al.* Acute-phase proteins among patients with type 1 diabetes. **Diabetes Metab**, v.29, n.4 Pt 1, Sep, p.405-11. 2003.

- Gornik, O. e G. Lauc. Glycosylation of serum proteins in inflammatory diseases. **Dis Markers**, v.25, n.4-5, p.267-78. 2008.
- Gornik, O., L. Royle, D. J. Harvey, *et al.* Changes of serum glycans during sepsis and acute pancreatitis. **Glycobiology**, v.17, n.12, Dec, p.1321-32. 2007.
- Gunnarsson, P., L. Levander, P. Pahlsson, *et al.* The acute-phase protein alpha 1-acid glycoprotein (AGP) induces rises in cytosolic Ca²⁺ in neutrophil granulocytes via sialic acid binding immunoglobulin-like lectins (siglecs). **Faseb J**, v.21, n.14, Dec, p.4059-69. 2007.
- Guo, R. F., N. C. Riedemann, I. J. Laudes, *et al.* Altered neutrophil trafficking during sepsis. **J Immunol**, v.169, n.1, Jul 1, p.307-14. 2002.
- Gupta, S., J. Koirala, R. Khardori, *et al.* Infections in diabetes mellitus and hyperglycemia. **Infect Dis Clin North Am**, v.21, n.3, Sep, p.617-38, vii. 2007.
- Heuertz, R. M., S. M. Tricomi, U. R. Ezekiel, *et al.* C-reactive protein inhibits chemotactic peptide-induced p38 mitogen-activated protein kinase activity and human neutrophil movement. **J Biol Chem**, v.274, n.25, Jun 18, p.17968-74. 1999.
- Higai, K., Y. Aoki, Y. Azuma, *et al.* Glycosylation of site-specific glycans of alpha1-acid glycoprotein and alterations in acute and chronic inflammation. **Biochim Biophys Acta**, v.1725, n.1, Aug 30, p.128-35. 2005.
- Higai, K., Y. Azuma, Y. Aoki, *et al.* Altered glycosylation of alpha1-acid glycoprotein in patients with inflammation and diabetes mellitus. **Clin Chim Acta**, v.329, n.1-2, Mar, p.117-25. 2003.
- Huttenlocher, A., R. R. Sandborg e A. F. Horwitz. Adhesion in cell migration. **Curr Opin Cell Biol**, v.7, n.5, Oct, p.697-706. 1995.
- Hvidberg, V., M. B. Maniecki, C. Jacobsen, *et al.* Identification of the receptor scavenging hemopexin-heme complexes. **Blood**, v.106, n.7, Oct 1, p.2572-9. 2005.
- Ikejima, S., S. Sasaki, H. Sashinami, *et al.* Impairment of host resistance to *Listeria monocytogenes* infection in liver of db/db and ob/ob mice. **Diabetes**, v.54, n.1, Jan, p.182-9. 2005.
- Im Walde, S. S., C. Dohle, P. Schott-Ohly, *et al.* Molecular target structures in alloxan-induced diabetes in mice. **Life Sci**, v.71, n.14, Aug 23, p.1681-94. 2002.
- Itou, T., L. V. Collins, F. B. Thoren, *et al.* Changes in activation states of murine polymorphonuclear leukocytes (PMN) during inflammation: a comparison of bone marrow and peritoneal exudate PMN. **Clin Vaccine Immunol**, v.13, n.5, May, p.575-83. 2006.
- Jakelic, J., S. Kokic, I. Hozo, *et al.* Nonspecific immunity in diabetes: hyperglycemia decreases phagocytic activity of leukocytes in diabetic patients. **Med Arh**, v.49, n.1-2, p.9-12. 1995.

Janeway, C. A., Jr. How the immune system protects the host from infection. **Microbes Infect**, v.3, n.13, Nov, p.1167-71. 2001.

Janeway, C. A., Jr. e R. Medzhitov. Innate immune recognition. **Annu Rev Immunol**, v.20, p.197-216. 2002.

Jorgensen, H. G., M. A. Elliott, R. Priest, *et al.* Modulation of sialyl Lewis X dependent binding to E-selectin by glycoforms of alpha-1-acid glycoprotein expressed in rheumatoid arthritis. **Biomed Chromatogr**, v.12, n.6, Nov-Dec, p.343-9. 1998.

Joshi, N., G. M. Caputo, M. R. Weitekamp, *et al.* Infections in patients with diabetes mellitus. **N Engl J Med**, v.341, n.25, Dec 16, p.1906-12. 1999.

Kapojos, J. J., K. Poelstra, T. Borghuis, *et al.* Regulation of plasma hemopexin activity by stimulated endothelial or mesangial cells. **Nephron Physiol**, v.96, n.1, p.P1-10. 2004.

Kastrup, W., G. Lindstedt, P. A. Lundberg, *et al.* Serum hemopexin in patients with dermatitis herpetiformis on dapsone (di(4-aminophenyl)sulphone). **Arch Dermatol Res**, v.254, n.3, Dec 31, p.225-32. 1975.

Kittel, A. Lipopolysaccharide treatment modifies pH- and cation-dependent ecto-ATPase activity of endothelial cells. **J Histochem Cytochem**, v.47, n.3, Mar, p.393-400. 1999.

Kong, X., G. R. Hellermann, G. Patton, *et al.* An immunocompromised BALB/c mouse model for respiratory syncytial virus infection. **Virology**, v.2, n.1, Feb 8, p.3. 2005.

Kubes, P. The complexities of leukocyte recruitment. **Semin Immunol**, v.14, n.2, Apr, p.65-72. 2002.

Kubes, P., M. Suzuki e D. N. Granger. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.88, n.11, Jun 1, p.4651-5. 1991.

Langkabel, P., J. Zwirner e M. Oppermann. Ligand-induced phosphorylation of anaphylatoxin receptors C3aR and C5aR is mediated by "G protein-coupled receptor kinases. **Eur J Immunol**, v.29, n.9, Sep, p.3035-46. 1999.

Levander, L., P. Gunnarsson, M. Grenegard, *et al.* Effects of alpha1-acid glycoprotein fucosylation on its Ca²⁺ mobilizing capacity in neutrophils. **Scand J Immunol**, v.69, n.5, May, p.412-20. 2009.

Ley, K. Integration of inflammatory signals by rolling neutrophils. **Immunol Rev**, v.186, Aug, p.8-18. 2002.

Ley, K. The role of selectins in inflammation and disease. **Trends Mol Med**, v.9, n.6, Jun, p.263-8. 2003.

Ley, K., C. Laudanna, M. I. Cybulsky, *et al.* Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. **Nat Rev Immunol**, v.7, n.9, Sep, p.678-89. 2007.

- Liang, X., T. Lin, G. Sun, *et al.* Hemopexin down-regulates LPS-induced proinflammatory cytokines from macrophages. **J Leukoc Biol**, Apr 24. 2009.
- Linke, R. P., V. Bock, G. Valet, *et al.* Inhibition of the oxidative burst response of N-formyl peptide-stimulated neutrophils by serum amyloid-A protein. **Biochem Biophys Res Commun**, v.176, n.3, May 15, p.1100-5. 1991.
- Logdberg, L. e L. Wester. Immunocalins: a lipocalin subfamily that modulates immune and inflammatory responses. **Biochim Biophys Acta**, v.1482, n.1-2, Oct 18, p.284-97. 2000.
- Martens, G. W., M. C. Arkan, J. Lee, *et al.* Tuberculosis susceptibility of diabetic mice. **Am J Respir Cell Mol Biol**, v.37, n.5, Nov, p.518-24. 2007.
- Martin, G. S., D. M. Mannino, S. Eaton, *et al.* The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. **N Engl J Med**, v.348, n.16, Apr 17, p.1546-54. 2003.
- Mastej, K. e R. Adamiec. Neutrophil surface expression of CD11b and CD62L in diabetic microangiopathy. **Acta Diabetol**, v.45, n.3, Sep, p.183-90. 2008.
- Mastroianni, C. M., M. Lichtner, F. Mengoni, *et al.* Improvement in neutrophil and monocyte function during highly active antiretroviral treatment of HIV-1-infected patients. **Aids**, v.13, n.8, May 28, p.883-90. 1999.
- Matsumoto, K., Y. Maeda, S. Kato, *et al.* Alteration of asparagine-linked glycosylation in serum transferrin of patients with hepatocellular carcinoma. **Clin Chim Acta**, v.224, n.1, Jan 14, p.1-8. 1994.
- Matsumoto, K., K. Nishi, M. Kikuchi, *et al.* Alpha1-acid glycoprotein suppresses rat acute inflammatory paw edema through the inhibition of neutrophils activation and prostaglandin E2 generation. **Biol Pharm Bull**, v.30, n.7, Jul, p.1226-30. 2007.
- Mcmillan, D. E. Increased levels of acute-phase serum proteins in diabetes. **Metabolism**, v.38, n.11, Nov, p.1042-6. 1989.
- Mehrad, B., R. M. Strieter, T. A. Moore, *et al.* CXC chemokine receptor-2 ligands are necessary components of neutrophil-mediated host defense in invasive pulmonary aspergillosis. **J Immunol**, v.163, n.11, Dec 1, p.6086-94. 1999.
- Meng, G., M. Rutz, M. Schiemann, *et al.* Antagonistic antibody prevents toll-like receptor 2-driven lethal shock-like syndromes. **J Clin Invest**, v.113, n.10, May, p.1473-81. 2004.
- Mestriner, F. L., F. Spiller, H. J. Laure, *et al.* Acute-phase protein alpha-1-acid glycoprotein mediates neutrophil migration failure in sepsis by a nitric oxide-dependent mechanism. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.104, n.49, Dec 4, p.19595-600. 2007.

- Millan, J., L. Hewlett, M. Glyn, *et al.* Lymphocyte transcellular migration occurs through recruitment of endothelial ICAM-1 to caveola- and F-actin-rich domains. **Nat Cell Biol**, v.8, n.2, Feb, p.113-23. 2006.
- Moore, T. A., M. W. Newstead, R. M. Strieter, *et al.* Bacterial clearance and survival are dependent on CXC chemokine receptor-2 ligands in a murine model of pulmonary *Nocardia asteroides* infection. **J Immunol**, v.164, n.2, Jan 15, p.908-15. 2000.
- Morley, J. J. e I. Kushner. Serum C-reactive protein levels in disease. **Ann N Y Acad Sci**, v.389, p.406-18. 1982.
- Mowat, A. e J. Baum. Chemotaxis of polymorphonuclear leukocytes from patients with diabetes mellitus. **N Engl J Med**, v.284, n.12, Mar 25, p.621-7. 1971.
- Nieminen, M., T. Henttinen, M. Merinen, *et al.* Vimentin function in lymphocyte adhesion and transcellular migration. **Nat Cell Biol**, v.8, n.2, Feb, p.156-62. 2006.
- Notkins, A. L. Immunologic and genetic factors in type 1 diabetes. **J Biol Chem**, v.277, n.46, Nov 15, p.43545-8. 2002.
- Olson, T. S. e K. Ley. Chemokines and chemokine receptors in leukocyte trafficking. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v.283, n.1, Jul, p.R7-28. 2002.
- Panes, J., M. Perry e D. N. Granger. Leukocyte-endothelial cell adhesion: avenues for therapeutic intervention. **Br J Pharmacol**, v.126, n.3, Feb, p.537-50. 1999.
- Panneerselvam, S. e S. Govindasamy. Sodium molybdate improves the phagocytic function in alloxan-induced diabetic rats. **Chem Biol Interact**, v.145, n.2, May 6, p.159-63. 2003.
- Parker, S. J. e P. E. Watkins. Experimental models of gram-negative sepsis. **Br J Surg**, v.88, n.1, Jan, p.22-30. 2001.
- Pereira, M. A., P. Sannomiya e J. G. Leme. Inhibition of leukocyte chemotaxis by factor in alloxan-induced diabetic rat plasma. **Diabetes**, v.36, n.11, Nov, p.1307-14. 1987.
- Petri, B., M. Phillipson e P. Kubes. The physiology of leukocyte recruitment: an in vivo perspective. **J Immunol**, v.180, n.10, May 15, p.6439-46. 2008.
- Phillipson, M., B. Heit, P. Colarusso, *et al.* Intraluminal crawling of neutrophils to emigration sites: a molecularly distinct process from adhesion in the recruitment cascade. **J Exp Med**, v.203, n.12, Nov 27, p.2569-75. 2006.
- Piper, R. D., D. J. Cook, R. C. Bone, *et al.* Introducing Critical Appraisal to studies of animal models investigating novel therapies in sepsis. **Crit Care Med**, v.24, n.12, Dec, p.2059-70. 1996.
- Pitcher, J. A., N. J. Freedman e R. J. Lefkowitz. G protein-coupled receptor kinases. **Annu Rev Biochem**, v.67, p.653-92. 1998.

- Poland, D. C., J. J. Garcia Vallejo, H. W. Niessen, *et al.* Activated human PMN synthesize and release a strongly fucosylated glycoform of alpha1-acid glycoprotein, which is transiently deposited in human myocardial infarction. **J Leukoc Biol**, v.78, n.2, Aug, p.453-61. 2005.
- Poland, D. C., C. G. Schalkwijk, C. D. Stehouwer, *et al.* Increased alpha3-fucosylation of alpha1-acid glycoprotein in Type I diabetic patients is related to vascular function. **Glycoconj J**, v.18, n.3, Mar, p.261-8. 2001.
- Poli-De-Figueiredo, L. F., A. G. Garrido, N. Nakagawa, *et al.* Experimental models of sepsis and their clinical relevance. **Shock**, v.30 Suppl 1, Oct, p.53-9. 2008.
- Pollard, T. D. e G. G. Borisy. Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. **Cell**, v.112, n.4, Feb 21, p.453-65. 2003.
- Prossnitz, E. R., C. M. Kim, J. L. Benovic, *et al.* Phosphorylation of the N-formyl peptide receptor carboxyl terminus by the G protein-coupled receptor kinase, GRK2. **J Biol Chem**, v.270, n.3, Jan 20, p.1130-7. 1995.
- Puliti, M., F. Bistoni, G. Orefici, *et al.* Exacerbation of group B streptococcal sepsis and arthritis in diabetic mice. **Microbes Infect**, v.8, n.9-10, Aug, p.2376-83. 2006.
- Rajagopalan, S. Serious infections in elderly patients with diabetes mellitus. **Clin Infect Dis**, v.40, n.7, Apr 1, p.990-6. 2005.
- Rasmussen, S. B., L. S. Reinert e S. R. Paludan. Innate recognition of intracellular pathogens: detection and activation of the first line of defense. **Apmis**, v.117, n.5-6, May, p.323-37. 2009.
- Renckens, R., J. J. Roelofs, S. Knapp, *et al.* The acute-phase response and serum amyloid A inhibit the inflammatory response to *Acinetobacter baumannii* Pneumonia. **J Infect Dis**, v.193, n.2, Jan 15, p.187-95. 2006.
- Rewers, M., R. E. Laporte, H. King, *et al.* Trends in the prevalence and incidence of diabetes: insulin-dependent diabetes mellitus in childhood. **World Health Stat Q**, v.41, n.3-4, p.179-89. 1988.
- Rios-Santos, F., J. C. Alves-Filho, F. O. Souto, *et al.* Down-regulation of CXCR2 on neutrophils in severe sepsis is mediated by inducible nitric oxide synthase-derived nitric oxide. **Am J Respir Crit Care Med**, v.175, n.5, Mar 1, p.490-7. 2007.
- Rittirsch, D., M. A. Flierl e P. A. Ward. Harmful molecular mechanisms in sepsis. **Nat Rev Immunol**, v.8, n.10, Oct, p.776-87. 2008.
- Rivers, E., B. Nguyen, S. Havstad, *et al.* Early goal-directed therapy in the treatment of severe sepsis and septic shock. **N Engl J Med**, v.345, n.19, Nov 8, p.1368-77. 2001.

- Rubio-Avilla, J., J. M. Palma-Vargas, J. T. Collins, *et al.* Sialyl Lewis(x) analog improves liver function by decreasing neutrophil migration after hemorrhagic shock. **J Trauma**, v.43, n.2, Aug, p.313-8. 1997.
- Sannomiya, P., M. A. Oliveira e Z. B. Fortes. Aminoguanidine and the prevention of leukocyte dysfunction in diabetes mellitus: a direct vital microscopic study. **Br J Pharmacol**, v.122, n.5, Nov, p.894-8. 1997.
- Sannomiya, P., M. A. Pereira e J. Garcia-Leme. Inhibition of leukocyte chemotaxis by serum factor in diabetes mellitus: selective depression of cell responses mediated by complement-derived chemoattractants. **Agents Actions**, v.30, n.3-4, Jun, p.369-76. 1990.
- Saso, L., B. Silvestrini, I. Zwain, *et al.* Abnormal glycosylation of hemopexin in arthritic rats can be blocked by bindarit. **J Rheumatol**, v.19, n.12, Dec, p.1859-67. 1992.
- Schenkel, A. R., Z. Mamdouh e W. A. Muller. Locomotion of monocytes on endothelium is a critical step during extravasation. **Nat Immunol**, v.5, n.4, Apr, p.393-400. 2004.
- Schmid, R. A., M. Yamashita, C. H. Boasquevisque, *et al.* Carbohydrate selectin inhibitor CY-1503 reduces neutrophil migration and reperfusion injury in canine pulmonary allografts. **J Heart Lung Transplant**, v.16, n.10, Oct, p.1054-61. 1997.
- Secco, D. D., J. A. Paron, S. H. De Oliveira, *et al.* Neutrophil migration in inflammation: nitric oxide inhibits rolling, adhesion and induces apoptosis. **Nitric Oxide**, v.9, n.3, Nov, p.153-64. 2003.
- Secher, T., V. Vasseur, D. M. Poisson, *et al.* Crucial role of TNF receptors 1 and 2 in the control of polymicrobial sepsis. **J Immunol**, v.182, n.12, Jun 15, p.7855-64. 2009.
- Seidelin, J. B., O. H. Nielsen e J. Strom. Soluble L-selectin levels predict survival in sepsis. **Intensive Care Med**, v.28, n.11, Nov, p.1613-8. 2002.
- Shattil, S. J. Integrins and Src: dynamic duo of adhesion signaling. **Trends Cell Biol**, v.15, n.8, Aug, p.399-403. 2005.
- Shirai, T., A. Nakamura, S. Wada, *et al.* Pancreatic acinar cell tumors in rats induced by 3,2'-dimethyl-4-aminobiphenyl. **Carcinogenesis**, v.10, n.6, Jun, p.1127-30. 1989.
- Shiyan, S. D. e N. V. Bovin. Carbohydrate composition and immunomodulatory activity of different glycoforms of alpha1-acid glycoprotein. **Glycoconj J**, v.14, n.5, Aug, p.631-8. 1997.
- Silva, E., A. Pedro Mde, A. C. Sogayar, *et al.* Brazilian Sepsis Epidemiological Study (BASES study). **Crit Care**, v.8, n.4, Aug, p.R251-60. 2004.
- Simon, S. I. e C. E. Green. Molecular mechanics and dynamics of leukocyte recruitment during inflammation. **Annu Rev Biomed Eng**, v.7, p.151-85. 2005.

Smith, C. W. Endothelial adhesion molecules and their role in inflammation. **Can J Physiol Pharmacol**, v.71, n.1, Jan, p.76-87. 1993.

Smitherman, K. O. e J. E. Peacock, Jr. Infectious emergencies in patients with diabetes mellitus. **Med Clin North Am**, v.79, n.1, Jan, p.53-77. 1995.

Sogayar, A. M., F. R. Machado, A. Rea-Neto, *et al.* A multicentre, prospective study to evaluate costs of septic patients in Brazilian intensive care units. **Pharmacoeconomics**, v.26, n.5, p.425-34. 2008.

Souza, D. G., D. C. Cara, G. D. Cassali, *et al.* Effects of the PAF receptor antagonist UK74505 on local and remote reperfusion injuries following ischaemia of the superior mesenteric artery in the rat. **Br J Pharmacol**, v.131, n.8, Dec, p.1800-8. 2000.

Spiecker, M., H. Darius, K. Kaboth, *et al.* Differential regulation of endothelial cell adhesion molecule expression by nitric oxide donors and antioxidants. **J Leukoc Biol**, v.63, n.6, Jun, p.732-9. 1998.

Suzuki, K., N. Kobayashi, T. Doi, *et al.* Inhibition of Mg²⁺-dependent adhesion of polymorphonuclear leukocytes by serum hemopexin: differences in divalent-cation dependency of cell adhesion in the presence and absence of serum. **Cell Struct Funct**, v.28, n.4, Aug, p.243-53. 2003.

Takeda, K., T. Kaisho e S. Akira. Toll-like receptors. **Annu Rev Immunol**, v.21, p.335-76. 2003.

Talbot, T. R. Diabetes mellitus and cardiothoracic surgical site infections. **Am J Infect Control**, v.33, n.6, Aug, p.353-9. 2005.

Tan, J. S., J. L. Anderson, C. Watanakunakorn, *et al.* Neutrophil dysfunction in diabetes mellitus. **J Lab Clin Med**, v.85, n.1, Jan, p.26-33. 1975.

Tavares-Murta, B. M., F. Q. Cunha e S. H. Ferreira. The intravenous administration of tumor necrosis factor alpha, interleukin 8 and macrophage-derived neutrophil chemotactic factor inhibits neutrophil migration by stimulating nitric oxide production. **Br J Pharmacol**, v.124, n.7, Aug, p.1369-74. 1998.

Tavares-Murta, B. M., J. S. Machado, S. H. Ferreira, *et al.* Nitric oxide mediates the inhibition of neutrophil migration induced by systemic administration of LPS. **Inflammation**, v.25, n.4, Aug, p.247-53. 2001.

Tavares-Murta, B. M., M. Zapparoli, R. B. Ferreira, *et al.* Failure of neutrophil chemotactic function in septic patients. **Crit Care Med**, v.30, n.5, May, p.1056-61. 2002.

Tolosano, E. e F. Altruda. Hemopexin: structure, function, and regulation. **DNA Cell Biol**, v.21, n.4, Apr, p.297-306. 2002.

- Tolosano, E., S. Fagoonee, E. Hirsch, *et al.* Enhanced splenomegaly and severe liver inflammation in haptoglobin/hemopexin double-null mice after acute hemolysis. **Blood**, v.100, n.12, Dec 1, p.4201-8. 2002.
- Tolosano, E., E. Hirsch, E. Patrucco, *et al.* Defective recovery and severe renal damage after acute hemolysis in hemopexin-deficient mice. **Blood**, v.94, n.11, Dec 1, p.3906-14. 1999.
- Tracey, K. J., B. Beutler, S. F. Lowry, *et al.* Shock and tissue injury induced by recombinant human cachectin. **Science**, v.234, n.4775, Oct 24, p.470-4. 1986.
- Tsai, W. C., R. M. Strieter, B. Mehrad, *et al.* CXC chemokine receptor CXCR2 is essential for protective innate host response in murine *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. **Infect Immun**, v.68, n.7, Jul, p.4289-96. 2000.
- Turunen, R., S. Andersson, I. Nupponen, *et al.* Increased CD11b-density on circulating phagocytes as an early sign of late-onset sepsis in extremely low-birth-weight infants. **Pediatr Res**, v.57, n.2, Feb, p.270-5. 2005.
- Van Haastert, P. J. e P. N. Devreotes. Chemotaxis: signalling the way forward. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v.5, n.8, Aug, p.626-34. 2004.
- Verdrengh, M. e A. Tarkowski. Role of neutrophils in experimental septicemia and septic arthritis induced by *Staphylococcus aureus*. **Infect Immun**, v.65, n.7, Jul, p.2517-21. 1997.
- Vinchi, F., S. Gastaldi, L. Silengo, *et al.* Hemopexin prevents endothelial damage and liver congestion in a mouse model of heme overload. **Am J Pathol**, v.173, n.1, Jul, p.289-99. 2008.
- Wait, R., G. Chiesa, C. Parolini, *et al.* Reference maps of mouse serum acute-phase proteins: changes with LPS-induced inflammation and apolipoprotein A-I and A-II transgenes. **Proteomics**, v.5, n.16, Nov, p.4245-53. 2005.
- Wang, J. S., M. Tsutsumi, Y. Ueshima, *et al.* Analysis of the characteristics of microheterogeneity of various serum glycoproteins in chronic alcoholics. **Alcohol Alcohol Suppl**, v.1A, p.21-8. 1993.
- Wichterman, K. A., A. E. Baue e I. H. Chaudry. Sepsis and septic shock--a review of laboratory models and a proposal. **J Surg Res**, v.29, n.2, Aug, p.189-201. 1980.
- Wu, J. H. e C. G. Tsai. Infectivity of hepatic strain *Klebsiella pneumoniae* in diabetic mice. **Exp Biol Med (Maywood)**, v.230, n.10, Nov, p.757-61. 2005.
- Xu, J., F. Wang, A. Van Keymeulen, *et al.* Divergent signals and cytoskeletal assemblies regulate self-organizing polarity in neutrophils. **Cell**, v.114, n.2, Jul 25, p.201-14. 2003.
- Zabel, B. A., L. Zuniga, T. Ohyama, *et al.* Chemoattractants, extracellular proteases, and the integrated host defense response. **Exp Hematol**, v.34, n.8, Aug, p.1021-32. 2006.

Zgonis, T. e T. S. Roukis. A systematic approach to diabetic foot infections. **Adv Ther**, v.22, n.3, May-Jun, p.244-62. 2005.

Zhang, X., W. Liang, Y. Mao, *et al.* Hepatic glucokinase activity is the primary defect in alloxan-induced diabetes of mice. **Biomed Pharmacother**, Aug 15. 2007.

Zhao, J., T. H. Patwa, W. Qiu, *et al.* Glycoprotein microarrays with multi-lectin detection: unique lectin binding patterns as a tool for classifying normal, chronic pancreatitis and pancreatic cancer sera. **J Proteome Res**, v.6, n.5, May, p.1864-74. 2007.

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](#)