

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

Heitor Affonso de Paula Neto

MECANISMOS MOLECULARES ENVOLVIDOS NA INIBIÇÃO DA  
MIGRAÇÃO DE NEUTRÓFILOS NA SEPSE

Rio de Janeiro  
2010

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

Heitor Affonso de Paula Neto

MECANISMOS MOLECULARES ENVOLVIDOS NA INIBIÇÃO DA MIGRAÇÃO  
DE NEUTRÓFILOS NA SEPSE

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química Biológica, Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Doutor em Química Biológica.

Orientadora: Thereza Christina Barja Fidalgo

Co-orientador: Fernando de Queiróz Cunha

Rio de Janeiro  
2010

Paula Neto, Heitor Affonso.

Mecanismos moleculares envolvidos na inibição da migração de neutrófilos na sepse./Heitor Affonso de Paula Neto. Rio de Janeiro, 2010.

No fls (xi, 260 fl.: II.)

Tese (Doutorado em Química Biológica) –  
Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de  
Bioquímica Médica, 2010.

Orientador: Thereza Christina Barja Fidalgo

1. sepse. 2. neutrófilo. 3. óxido nítrico. – Teses. I. Barja Fidalgo, Thereza Christina (orient.). II. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Instituto de Bioquímica Médica. III. Título.

Heitor Affonso de Paula Neto

MECANISMOS MOLECULARES ENVOLVIDOS NA INIBIÇÃO DA  
MIGRAÇÃO DE NEUTRÓFILOS NA SEPSE

Rio de Janeiro, 09 de abril de 2010.

Thereza Christina Barja Fidalgo  
Doutora, Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Jamil Assreuy  
Doutor, Universidade Federal de Santa Catarina

Fernando Augusto Bozza  
Doutor, Fundação Oswaldo Cruz

Wilson Savino  
Doutor, Fundação Oswaldo Cruz

Rio de Janeiro  
2010

**À minha família.** Tudo que faço é por vocês. Sem vocês nada disso existiria e, mesmo que existisse não teria o mesmo sentido.

"Muito do que lhe foi ensinado já foi, um dia, a visão radical de indivíduos que tiveram a coragem de acreditar que o que sua mente e coração diziam era verdadeiro, ao invés de aceitar as crenças comuns de sua época."

*Ching Ning Chu*

## AGRADECIMENTOS

À família que está em construção. Minha esposa Roberta e nosso tesouro, Arthur. Por serem uma fonte de alegrias e energia. Por nutrirem meu desejo de seguir em frente. Peço também desculpas pelas ausências, pelos momentos que não voltam, mas que tento recuperar quando estou presente. Estaremos sempre andando de mãos dadas, atravessando as dificuldades juntos para sorrirmos também juntos no final.

Aos meus pais, Josias e Rose, e meu irmão Rafael por toda a convivência, confiança, torcida, apoio e por me darem todas as condições necessárias para eu seguir em busca dos meus sonhos.

Às minhas tias, Rozilda e Rosangela, e minha avó Ruth, por estarem sempre perto mesmo de longe. Por torcerem e rezarem por mim esses anos todos.

Para a minha segunda família, Roberto, Lila, Rogério, Rodrigo, Andréia, Lufe e Dona Ivolina, por me adotarem com tanto carinho e terem sempre me tratado como seu eu fosse membro da família mesmo antes de eu me tornar oficialmente um.

À minha orientadora, Profa. Christina Barja Fidalgo, que me estendeu a mão e me abraçou quando precisei. Por todo o apoio, incentivo, alguns puxões de orelha (de leve), e principalmente pela amizade, da qual sempre lembrarei e sempre serei grato. Não sei ao certo se correspondi às suas expectativas (temo que não, na verdade), mas tenho certeza que tentei. Espero que o nosso convívio tenha sido tão proveitoso para ela quanto foi para mim.

Ao meu co-orientador, Prof. Fernando Cunha, pela amizade, pelo incentivo, pelas discussões e principalmente pela fraternidade, por sempre me receber de braços abertos em seu laboratório.

À Profa. Iolanda Fierro, pelo exemplo de organização (preciso me espelhar mais) e critério. Pelas conversas, conselhos e pelos papers que eu não tinha acesso, mas ela sim.

Aos companheiros de bancada (no Rio e em Ribeirão Preto) que me ajudaram na execução deste projeto, que me ajudaram nos experimentos e, sem os quais, muito pouco teria sido feito: Amêndola (meu fiel escudeiro), Fabrício, Spiller, Zeca e Andressinha.

Aos amigos que me deram suporte quando tive dificuldades na bancada: Simone e Roberta (por 18 meses de extrato de neutrófilos), Chuxu (confocal), Walter (por toda a ajuda no FACS em Ribeirão) e a Cynthia (por toda a disposição em ficar me esperando acabar o experimento para ler as amostras no FACS da UFRJ).



Aos amigos do Laboratório de Farmacologia Bioquímica e Celular da UERJ, por gerarem um ambiente descontraído de trabalho, pelas conversas, pelo café e pelas piadas: Simone, Roberta, Edward, Rafael, João, Pedro, Genilson, Renata, Mariana, Carol, Amendola, Vany, Augusta, Cris, Andreza, Gabi (não é do lab, mas é como se fosse), Fabio (idem), Renata, Yann, Yan, Amanda, Isabela; e os que não são mais: Andrea, Erica, Aninha.

Boa parte deste trabalho foi desenvolvida em Ribeirão Preto, o que implicou no meu deslocamento para outra cidade, na minha ausência de casa e, principalmente no meu afastamento da família por alguns meses. Tudo isso foi bastante sacrificante para mim, principalmente depois que meu filho nasceu. Gostaria, portanto de agradecer a todas aquelas pessoas que tornaram minha estada em Ribeirão Preto menos saudosa e que sempre me fizeram sentir em família, mesmo estando longe da minha: Fabrício, Rafa, Spiller, Thiago Cunha, Thiago Garlet, Sirvão, Andressinha, Daninha, Dani Nascimento, Fabi, Flavia, Silvia, Paula, Larissa, Guilherme, Waldiceu, Serginho, Yeda, Giu, Fabíola, Kátia, Diva, Fer, Jhimmy, Zeca, Sandra e Walter.

Aos amigos de longa data, pelas cervejas, sinucas, pokeres, conversas e risadas: Beto, João, Dalto, Lós, Marcinho e João Paulo.

Ao auxílio técnico do Marcos Braga, do Genilson e da Renata (no laboratório), da Marcela e da Simone (no FACS da UERJ), e da Diva, Giu, Yeda, Serginho, Fabíola e Katia (em Ribeirão Preto).

Ao Prof. Mario Alberto Cardoso, pelo pronto aceite em me acompanhar academicamente ao longo do Doutorado e por se dispor a revisar minha tese.

Aos Profs. Jamil Assreuy, Fernando Bozza e Wilson Savino, e à Profa. Claudia Benjamim, por tão gentilmente aceitarem compor a banca examinadora desta tese.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa.

Ao CNPq, FAPERJ, FAPESP e CAPES, pelo suporte financeiro dos projetos onde este projeto está inserido.

## RESUMO

PAULA NETO, Heitor Affonso. **Mecanismos moleculares envolvidos na inibição da migração de neutrófilos na sepse.** Rio de Janeiro, 2010. Tese (Doutorado em Química Biológica) – Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

Durante a sepse, neutrófilos apresentam um estado de hiporresponsividade a estímulos quimiotáticos. Este processo se correlaciona com a gravidade do quadro clínico e o prognóstico do paciente. Dados experimentais implicam o óxido nítrico (NO) neste fenômeno, pois a inibição farmacológica da síntese de NO restaura a migração de neutrófilos em modelos animais de sepse. No entanto, os mecanismos moleculares envolvidos neste processo ainda não foram bem estudados. No presente estudo, procuramos descrever os mecanismos envolvidos neste importante fenômeno e as vias de sinalização disparadas pelo NO em neutrófilos. Observamos que produtos bacterianos são capazes de inibir a resposta de neutrófilos a estímulos quimiotáticos. Este efeito mostrou-se dependente da síntese de NO e posterior ativação da enzima guanilato ciclase (GC), com produção de GMP cíclico (cGMP) e ativação da proteína quinase dependente de cGMP (PKG). A inibição da resposta quimiotática de neutrófilos parece envolver a internalização de receptores acoplados a proteína G (GPCRs) através do aumento da expressão de GPCR quinase (GRK) 2, um processo também dependente da ativação da via NO-GC-PKG. Usando um modelo animal de sepse, observamos que a inibição da atividade da GC é capaz de restabelecer a resposta quimiotática de neutrófilos, sugerindo que a ativação da via NO-GC-PKG ocorre *in vivo* durante a sepse. Além disso, a restauração da migração de neutrófilos foi acompanhada de um eficiente controle do foco infeccioso e um aumento na sobrevivência dos animais. Nossos dados descrevem os mecanismos moleculares envolvidos no estabelecimento de um estado de hiporresponsividade dos neutrófilos a estímulos quimiotáticos e apontam para a inibição da atividade da GC como um alvo promissor para a terapia da sepse.

## ABSTRACT

PAULA NETO, Heitor Affonso. **Mecanismos moleculares envolvidos na inibição da migração de neutrófilos na sepse.** Rio de Janeiro, 2010. Tese (Doutorado em Química Biológica) – Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

In sepsis neutrophils present a state of unresponsiveness to chemotactic stimulation. This process correlates with sepsis severity and prognosis. Experimental data have implicated nitric oxide (NO) in this phenomenon, since pharmacological inhibition of NO synthesis restores neutrophil migration in animal models of sepsis. However the molecular mechanism involved remains understudied. In the present study, we sought to determine the mechanisms involved in this important phenomenon and the signaling pathways triggered by NO in neutrophils. We show that bacterial products are able to inhibit neutrophil responses to chemotactic stimuli. This effect seems to depend on NO synthesis and guanylate cyclase (GC) activation, with consequent production of cyclic GMP (cGMP) and activation of cGMP-dependent protein kinases (PKG). Inhibition of neutrophil chemotaxis seems to involve G protein-coupled receptor (GPCR) internalization through increased expression of GPCR kinase (GRK) 2, which were both dependent on the activation of the NO-GC-PKG axis. Using an experimental model of sepsis, we show that GC inhibition is able to restore neutrophil migratory function, suggesting that the activation of the NO-GC-PKG axis is operative in vivo during sepsis. Moreover restored neutrophil migration was paralleled by efficient control of infection and increased survival. Our data describe the molecular mechanisms involved in the establishment of neutrophil unresponsiveness to chemotactic stimulation and point to GC inhibition as a promising target for sepsis therapy.

**LISTA DE FIGURAS**

Figura 1. Vias de sinalização disparadas por receptores do tipo Toll (TLRs) .....	21
Figura 2. Processo de migração de neutrófilos e eliminação de agentes infecciosos ....	23
Figura 3. Cascata de eventos envolvida na inibição da migração de neutrófilos na sepse .....	30
Figura 4. Regulação da atividade das diferentes isoformas da NO sintase .....	33
Figura 5. Mecanismos de sinalização celular disparados pelo NO .....	35
Figura 6. Curvas concentração-efeito para os diferentes inibidores farmacológicos utilizados .....	40
Figura 7. Efeito do LPS sobre a resposta quimiotática de neutrófilos humanos in vitro .....	53
Figura 8. Participação da via NO-GC-PKG nos efeitos do LPS sobre a quimiotaxia de neutrófilos humanos .....	55
Figura 9. Efeito do LTA sobre a resposta quimiotática de neutrófilos humanos e a participação da via NO-GC-PKG .....	56
Figura 10. Efeito do LPS sobre os níveis intracelulares de GMP cíclico em neutrófilos humanos .....	57
Figura 11. Efeito da ativação direta da GC sobre a resposta quimiotática de neutrófilos humanos .....	58
Figura 12. . Efeito do LPS sobre a expressão de CXCR2 em neutrófilos humanos .....	61
Figura 13. Efeito do LPS sobre a expressão de BLT1 em neutrófilos humanos .....	62
Figura 14. Efeito do LPS sobre a expressão de FPRL-1 em neutrófilos humanos .....	63
Figura 15. Efeito do LPS sobre a expressão de GRK2 em neutrófilos humanos .....	64
Figura 16. Efeito da inibição da atividade de GC sobre a função migratória de neutrófilos em um modelo experimental de sepse .....	66
Figura 17. Efeito da inibição da atividade de GC sobre o controle da infecção em um modelo experimental de sepse .....	68
Figura 18. Efeito da inibição da atividade de GC sobre o seqüestro pulmonar de neutrófilos em um modelo experimental de sepse .....	69

Figura 19. Efeito do pré-tratamento com inibidor da atividade de GC na sobrevivência de animais submetidos a um modelo experimental de sepse .....	70
Figura 20. Efeito do pós-tratamento com inibidor da atividade de GC na sobrevivência de animais submetidos a um modelo experimental de sepse .....	71
Figura 21. Modelo proposto .....	78

**LISTA DE ABREVIATURAS**

b.p.m.: batimentos por minuto

BSA: albumina de soro bovino, *bovine serum albumin*

C3R: receptor do fator 3 do complemento

CD: *cluster of differentiation*

cGMP: guanosina monofosfato cíclica

CLP: ligação e perfuração do ceco, *cecal ligation and puncture*

DMSO: dimetil sulfóxido

ECL: *enhanced chemoluminescence*

EDRF: fator relaxante derivado do endotélio, *endothelium-derived relaxing factor*

EDTA: ácido etilenodiaminotetraacético

ELISA: ensaio de imunoadsorção ligado a enzima, *enzyme-linked immunosorbent assay*

E.P.M.: erro padrão da média

eNOS: NOS endotelial

ERN: espécie reativa de nitrogênio

ERO: espécie reativa de oxigênio

FACS: citometria de fluxo, *fluorescence-activated cell sorting*

FcγRIII: receptor III de imunoglobulina G

FITC: isotiocianato de fluoresceína

fMLP: N-formil-metionil-leucil-fenilalanina

GC: guanilato ciclase

GPCR: receptor acoplado a proteína G, *G protein-coupled receptor*

GRK: quinase de GPCR

H-TAB: brometo de hexadeciltrimetilamonio

IL: interleucina

iNOS: NOS induzida

IRAK-M: quinase M associada ao receptor de IL-1, *interleukin-1 receptor-associated kinase M*

LAD: deficiência de adesão leucocitária, *leukocyte adhesion deficiency*

LPS: lipopolissacarídeo

LTA: ácido lipoteicóico

LTB<sub>4</sub>: leucotrieno B<sub>4</sub>

MAL: proteína adaptadora tipo MyD88, *MyD88 adapter-like protein*

MCP: proteína quimiotática de monócito, *monocyte chemotactic protein*

MIP: proteína inflamatória do macrófago, *macrophage inflammatory protein*

MPO: mieloperoxidase

MyD88: fator 88 de diferenciação mielóide, *myeloid differentiation factor 88*

NADPH: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

NF-κB: fator nuclear κB, *nuclear factor- κB*

NO: óxido nítrico

NOD: domínio de ligação de nucleotídeo e oligomerização, *nucleotide-binding oligomerization domain*

NOS: NO sintase

nNOS: NOS neuronal

PaCO<sub>2</sub>: pressão parcial de CO<sub>2</sub> no sangue arterial

PAF: fator ativador de plaqueta, *platelet activating factor*

PAMP: padrões moleculares associados a patógenos, *pathogen-associated molecular patterns*

PBS: salina tampão fosfato, *phosphate buffered saline*

PI3K: quinase de fosfatidil inositol, *phosphatidylinositol-3-kinase*

PKG: proteína quinase dependente de cGMP

RIG-1: gene 1 induzido por ácido retinóico, *retinoic acid-induced gene 1*

r.p.m.: rotações por minuto

SDS: dodecil sulfato de sódio

SFB: soro fetal bovino

SIRS: síndrome da resposta inflamatória sistêmica, *systemic inflammatory response syndrome*

SPF: livre de patógenos específicos, *specific pathogen free*

Th: T auxiliar, T helper

TLR: receptor tipo Toll, *Toll-like receptor*

TMB: 3,3',3,3-tetrametilbenzidina

TNF: fator de necrose tumoral, *tumor necrosis factor*

TRAM: proteína de membrana associada a cadeia translocada, *translocating-associated membrane protein*

TRIF: adaptadora indutora de interferon- $\beta$  contendo domínio TIR, *TIR domain-containing adapter inducing interferon- $\beta$*

UFC: unidades formadoras de colônia



**SUMÁRIO**

AGRADECIMENTOS .....	vii
RESUMO .....	ix
ABSTRACT .....	x
LISTA DE FIGURAS .....	xi
LISTA DE ABREVIATURAS .....	xiii
SUMÁRIO .....	xvi
1. INTRODUÇÃO .....	19
1.1. Inflamação e migração celular .....	19
1.2. Sepses .....	25
1.3. Neutrófilos na sepses .....	28
1.4. Neutrófilos, sepses e óxido nítrico .....	29
2. OBJETIVOS .....	37
2.1. Objetivo geral .....	37
2.2. Objetivos específicos .....	37
3. MATERIAIS E MÉTODOS .....	38
3.1. Isolamento de neutrófilos humanos .....	38
3.2. Tratamento in vitro dos neutrófilos isolados .....	39
3.3. Ensaio de quimiotaxia em câmara de Boyden .....	41
3.4. Dosagem de GMP cíclico .....	41
3.5. Citometria de fluxo .....	42
3.6. Citoquímica .....	43
3.6.1. Mobilização do citoesqueleto de actina .....	43
3.6.2. Produção de óxido nítrico .....	43
3.7. Imunofluorescência .....	44

3.7.1. Conteúdo total de fosfotirosina .....	44
3.7.2. Expressão de GRK2 .....	45
3.8. Eletroforese e westernblotting .....	45
3.9. Animais e procedimentos in vivo .....	46
3.9.1. Modelo experimental de sepse .....	47
3.9.2. Protocolo de pré-tratamento .....	47
3.9.3. Protocolo de pós-tratamento I .....	48
3.9.4. Protocolo de pós-tratamento II .....	48
3.10. Avaliação da migração in vivo .....	48
3.11. Cultura de bactérias e enumeração de unidades formadoras de colônia (UFC) .....	48
3.12. Ensaio de mieloperoxidase (MPO) .....	49
3.13. Reagentes .....	50
3.14. Análise estatística .....	51
4. RESULTADOS .....	52
4.1. Efeito do LPS sobre a resposta quimiotática de neutrófilos humanos in vitro ...	52
4.2. Participação da via NO-GC-PKG nos efeitos do LPS sobre a quimiotaxia de neutrófilos humanos .....	54
4.3. Efeito do LTA sobre a resposta quimiotática de neutrófilos humanos e a participação da via NO-GC-PKG .....	54
4.4. Efeito do LPS sobre os níveis intracelulares de GMP cíclico em neutrófilos humanos .....	57
4.5. Efeito da ativação direta da GC sobre a resposta quimiotática de neutrófilos humanos .....	57
4.6. Efeito do LPS sobre a expressão de CXCR2 em neutrófilos humanos .....	59
4.7. Efeito do LPS sobre a expressão de BLT1 em neutrófilos humanos .....	59
4.8. Efeito do LPS sobre a expressão de FPRL-1 em neutrófilos humanos .....	59

4.9. Efeito do LPS sobre a expressão de GRK2 em neutrófilos humanos .....	60
4.10. Efeito da inibição da atividade de GC sobre a função migratória de neutrófilos em um modelo experimental de sepse .....	65
4.11. Efeito da inibição da atividade de GC sobre o controle da infecção em um modelo experimental de sepse .....	65
4.12. Efeito da inibição da atividade de GC sobre o seqüestro pulmonar de neutrófilos em um modelo experimental de sepse .....	67
4.13. Efeito do pré-tratamento com inibidor da atividade de GC na sobrevida de animais submetidos a um modelo experimental de sepse .....	68
4.14. Efeito do pós-tratamento com inibidor da atividade de GC na sobrevida de animais submetidos a um modelo experimental de sepse .....	70
5. DISCUSSÃO .....	72
5.1. Resultados in vitro .....	72
5.2. Modelo .....	77
5.3. Resultados in vivo .....	79
5.4. Potencial terapêutico .....	82
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	84
ANEXO I .....	97
ANEXO II .....	134

## **1. INTRODUÇÃO**

### **1.1. Inflamação e migração celular**

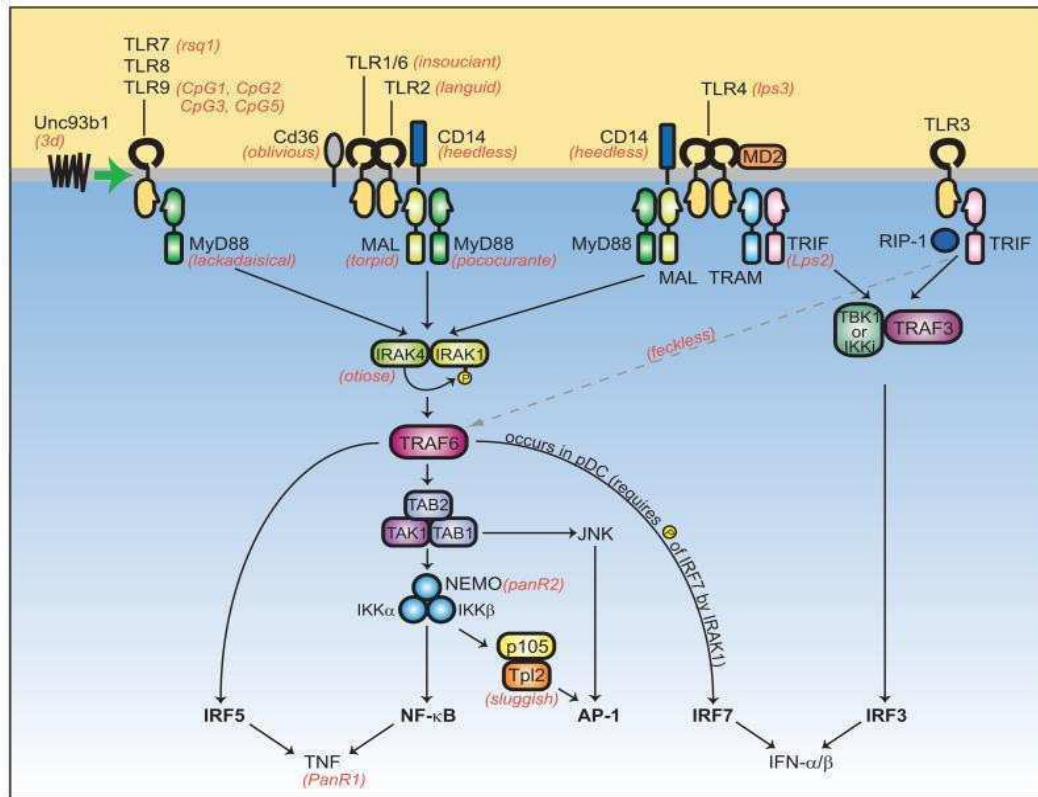
Inflamação é definida como a resposta de tecidos vascularizados à injúria (MEDZHITOV, 2008). A resposta inflamatória é um processo biológico complexo desencadeado em tecidos vascularizados por estímulos físicos, químicos ou infecciosos, e visa em última análise eliminar o agente causador da lesão e restaurar a homeostase tecidual (MEDZHITOV, 2008).

Os cinco sinais clássicos da inflamação, calor, rubor, edema e dor, resultam dos efeitos biológicos dos mediadores inflamatórios produzidos localmente em resposta à injúria. Estes mediadores promovem aumento do fluxo sanguíneo local (rubor e calor), aumento da permeabilidade vascular (edema), infiltração de leucócitos e liberação de mediadores hiperalgésicos (dor) (MARSHALL, 2008).

Na vigência de uma infecção local, o agente infeccioso é reconhecido por células residentes que, em resposta, iniciam a produção de mediadores inflamatórios (MEDZHITOV, 2008). O reconhecimento de microorganismos por células do hospedeiro depende da expressão de receptores altamente conservados capazes de reconhecer estruturas associadas microorganismos. Esta família de receptores reconhece estruturas conservadas essenciais à biologia dos microorganismos, como por exemplo, componentes de parede celular bacteriana e ácido nucléico de vírus (BEUTLER, 2009). Estes componentes microbianos são amplamente referidos como padrões associados à patógenos (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs). Os primeiros receptores de PAMPs descritos foram os receptores do tipo Toll (Toll-like receptors, TLRs). Estes receptores foram inicialmente descritos como importantes para o desenvolvimento

dorso-ventral em *Drosophila* (ANDERSON *et al.*, 1985). Interessantemente, as *Drosophila* possuindo mutações inativadoras em Toll apresentavam importante susceptibilidade a infecções, sugerindo uma participação destes receptores na resposta do hospedeiro a agentes infecciosos (LEMAITRE *et al.*, 1996). Mais tarde, o homólogo de Toll em mamíferos foi identificado, clonado e caracterizado como o receptor que reconhece o lipopolissacarídeo (LPS) bacteriano (MEDZHITOV *et al.*, 1997).

Seguindo estes estudos seminais, estudos aprofundaram em muito o conhecimento a cerca da expressão e das vias de sinalização de receptores do tipo Toll. Atualmente, 13 isoformas de TLR são descritas em mamíferos, sendo 10 em humanos. Além disso, outros receptores para PAMPs foram descritos, como os receptores com domínio de ligação de nucleotídeo e oligomerização (nucleotide-binding oligomerization domain, NOD), e o gene 1 induzido por ácido retinóico (retinoic acid-induced gene 1, RIG-1) (BEUTLER, 2009). O estudo das vias de sinalização de TLRs levou à descrição de quatro proteínas adaptadoras essenciais para a transdução de sinal: o fator 88 de diferenciação mielóide (myeloid differentiation factor 88, MyD88), a proteína adaptadora tipo MyD88 (MyD88 adapter-like protein, MAL), a adaptadora indutora de interferon- $\beta$  contendo domínio TIR (TIR domain-containing adapter inducing interferon- $\beta$ , TRIF), e a proteína de membrana associada a cadeia translocada (translocating-associated membrane protein, TRAM) (BEUTLER, 2009; MONIE, 2009). A sinalização via estas proteínas adaptadoras, culmina com a ativação de uma série de fatores de transcrição, entre eles o fator nuclear  $\kappa$ B (nuclear factor- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B), levando a expressão e supressão de um grande número de genes (BEUTLER, 2009). Entre os genes expressos em resposta a ativação de TLR-NF- $\kappa$ B, estão uma série de genes que codificam citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral  $\alpha$  (tumor necrosis factor  $\alpha$ , TNF $\alpha$ ) (Figura 1).

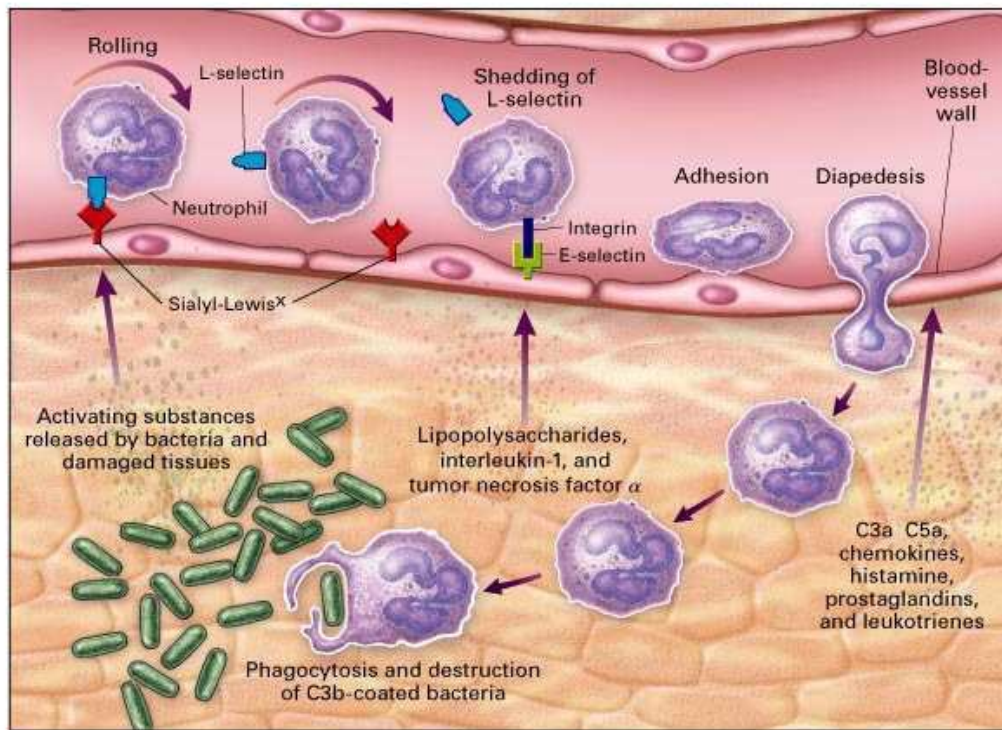


**Figura 1.** Vias de sinalização disparadas por receptores do tipo Toll (TLRs). Representação esquemática das vias de sinalização envolvidas na ativação de fatores de transcrição em resposta a ligação de moléculas microbianas a seus respectivos receptores (BEUTLER, 2009).

A produção destes mediadores inflamatórios por células residentes leva a ativação do endotélio, aumento da permeabilidade vascular e inicia o processo de influxo de leucócitos circulantes para o tecido. A ativação de células endoteliais pelo TNF $\alpha$ , por exemplo, causa alterações na morfologia celular e na expressão de moléculas de adesão, que culminam com a adesão e o extravasamento de leucócitos para o tecido (VANDENBROUCKE *et al.*, 2008). Dentre os leucócitos que migram para o tecido em resposta a infecção, o neutrófilo é o primeiro e seu número aumenta significativamente dentro das primeiras horas após a infecção. Por isso, esta célula é por muitos considerada a primeira linha de defesa do organismo contra infecções (COWBURN *et al.*, 2008).

A migração de neutrófilos para os tecidos é um processo altamente coordenado e finamente regulado. Este processo se inicia com a marginação dos neutrófilos que se deslocam da porção central da luz do vaso para a periferia. Este processo parece resultar das alterações hemodinâmicas locais e aumenta o contato entre os neutrófilos e células endoteliais. Este contato célula-célula leva a uma diminuição da velocidade de deslocamento do neutrófilo como resultado de interações fracas entre moléculas de adesão do tipo selectinas, expressas pelo neutrófilo, e seus ligantes na membrana das células endoteliais. A ligação das selectinas expressas pelos neutrófilos ativa vias de sinalização intracelulares que resultam na ativação de integrinas, expressas em um estado inativo pelos neutrófilos. A ativação de integrinas resulta em uma ligação firme com moléculas de adesão expressas pelo endotélio e finalmente a adesão firme e o extravasamento dos neutrófilos (LEY *et al.*, 2007; THELEN & STEIN, 2008; WOODFIN *et al.*, 2010) (Figura 2).

Uma vez no tecido, os neutrófilos são capazes de reconhecer gradientes químicos de concentração, formados por mediadores endógenos ou produtos bacterianos, que servem para direcionar o neutrófilo para o foco da infecção (THELEN & STEIN, 2008). Estes mediadores diferem grandemente em sua natureza química - podem ser protéicos, como as quimiocinas interleucina (IL)-8 e fragmentos do complemento, ou lipídicos, como o leucotrieno B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>) e o fator ativador de plaquetas (platelet activating factor, PAF) - e no seu modo de produção - podem ser endógenos, como os fatores descritos anteriormente, ou podem ser derivados do próprio microorganismo, como o peptídeo N-formil-metionil-leucil-fenilalanina (fMLP) (HAASERT & DEVREOTES, 2004). O reconhecimento destes diferentes agentes quimiotáticos depende da sinalização via receptores acoplados a proteína G (G protein-coupled receptor, GPCR) (HAASERT & DEVREOTES, 2004; THELEN & STEIN, 2008). A sinalização via GPCR envolve a



**Figura 2. Processo de migração de neutrófilos e eliminação de agentes infecciosos.** Esquema representa as fases do processo de migração celular e os mediadores envolvidos. Extraído de [www.chronicprostatitis.com/images/f3.jpg](http://www.chronicprostatitis.com/images/f3.jpg)

ativação de vias intracelulares como a via da quinase de fosfatidil inositol (phosphatidylinositol-3-kinase, PI3K) (RITTER & HALL, 2009). De fato, animais geneticamente deficientes na subunidade catalítica p110 $\gamma$  da PI3K, apresentam um profundo comprometimento da migração de neutrófilos (HIRSCH *et al.*, 2000).

Assim como grande parte dos GPCRs, os receptores envolvidos no reconhecimento de mediadores quimiotáticos sofrem fina regulação da sua atividade. Uma das principais vias de regulação da atividade de GPCRs é através da ativação de quinases de GPCR (GPCR kinases, GRKs) (VROON *et al.*, 2006; RITTER & HALL, 2009). Estas proteínas fosforilam a porção citoplasmática do receptor, gerando um sítio



de reconhecimento para  $\beta$ -arrestinas, que se ligam ao receptor, mediando sua internalização e o término da resposta (VROON *et al.*, 2006; PREMONT & GAINETDINOV, 2007). Este mecanismo de regulação negativa da atividade de GPCRs é conhecido como “dessensibilização” e pode resultar da ligação do próprio agonista (dessensibilização homóloga), ou da ativação de um receptor não relacionado (dessensibilização heteróloga) (PREMONT & GAINETDINOV, 2007). A importância deste mecanismo regulador no processo de quimiotaxia dos neutrófilos foi claramente demonstrada em estudos recentes com animais geneticamente deficientes para GRK6 (KAVELAARS *et al.*, 2003; VROON *et al.*, 2004). Nestes estudos foi descrito um aumento apreciável na resposta quimiotática de neutrófilos aos ligantes de CXCR4 e ao LTB<sub>4</sub>, além de um incremento da resposta inflamatória aguda induzida por ácido aracdônico (KAAVELARS *et al.*, 2003; VROON *et al.*, 2004).

Uma vez alcançado o foco infeccioso, os neutrófilos são capazes de fagocitar e eliminar os microorganismos invasores. A expressão de receptores para a porção Fc de imunoglobulina (Ig) G (Fc $\gamma$ RIII) e para proteínas da cascata do complemento (C3R) pelos neutrófilos permite o reconhecimento e fagocitose de microorganismos opsonizados (DALE *et al.*, 2008). Estes microorganismos são eliminados pela ação de espécies reativas de oxigênio (EROs) e nitrogênio (ERNs), e enzimas citotóxicas armazenadas nos grânulos citoplasmáticos dos neutrófilos (NAUSEEF, 2007; DALE *et al.*, 2008). A produção de EROs depende da atividade da enzima nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidase. A atividade de NADPH oxidase gera peróxido de hidrogênio e outras EROs (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) e, em conjunto com a enzima mieloperoxidase, transforma íons cloreto em ácido hipocloroso, um potente composto antimicrobiano (DALE *et al.*, 2008). Embora a participação de outros mecanismos microbicidas seja reconhecida, como peptídeos antimicrobianos (defensinas), proteases e ERNs, a

produção de EROs e ácido hipocloroso é considerado o mais importante mecanismo antimicrobiano de neutrófilos (DALE et al., 2008). Em concordância, pacientes portadores de doença granulomatosa crônica são incapazes de produzir EROs derivadas da NADPH oxidase e apresentam episódios de infecção recorrente (GEISZT et al., 2001).

## **1.2. Sepsis**

A eliminação eficiente de patógenos e a restauração da homeostase tecidual dependem do reconhecimento da infecção, da montagem de uma resposta inflamatória adequada e da migração de leucócitos (neutrófilos e macrófagos) da corrente sanguínea para o foco infeccioso. O processo inflamatório é, portanto, essencial para a sobrevivência dos seres vivos. No entanto, seus efeitos benéficos dependem de uma fina regulação da amplitude de resposta e da correta resolução do processo (MEDZHITOV, 2008).

A desregulação da resposta inflamatória é a base para uma série de doenças humanas entre elas a sepsis, que se caracteriza por uma resposta inflamatória sistêmica a uma infecção (MEDZHITOV, 2008). A sepsis está hoje entre as dez maiores causas de morte no mundo e é a principal causa em unidades de terapia intensiva não-coronariana (SHIMAOKA & PARK, 2008). Estimativas do ano de 2004 sugerem o diagnóstico de 77 a 240 novos casos por 100.000 habitantes, com uma expectativa de aumento de 1,5% dos casos ao ano, podendo resultar em 1 milhão de novos casos anuais em 2020, só nos Estados Unidos da América (WHEELER *et al.*, 2009). Além do crescente número de casos e a mortalidade associada, a sepsis gera gastos públicos anuais da ordem de 17

bilhões de dólares nos Estados Unidos e cerca de 7 bilhões de euros na Europa (ANGUS *et al.*, 2001; MARTIN *et al.*, 2003).

O prognóstico e a mortalidade na sepse claramente dependem de um diagnóstico preciso e início rápido de tratamento. Por isso, é necessária uma clara definição com base em parâmetros clínicos e laboratoriais. Baseado nesta necessidade estabeleceu-se em 1991, durante um encontro organizado pela American College of Chest Physicians e a Society of Critical Care Medicine, definições clínicas para os quadros de sepse, síndrome da resposta inflamatória sistêmica (systemic inflammatory response syndrome, SIRS), sepse grave e choque séptico (VINCENT & ABRAHAM, 2006).

Neste consenso, sepse foi definida como uma manifestação de resposta inflamatória sistêmica na presença suspeita ou confirmada de infecção. A síndrome da resposta inflamatória sistêmica foi definida como a presença de pelo menos dois sinais de resposta inflamatória sistêmica, sinais estes caracterizados por desregulações em sistemas fisiológicos, como por exemplo, temperatura corporal aberrante (maior que 38°C ou menor que 36°C), frequência cardíaca maior que 90 b.p.m., frequência respiratória maior que 20 (ou PaCO<sub>2</sub> menor que 32 mmHg) ou alterações na contagem de leucócitos (leucometria maior que 12 x 10<sup>3</sup>/mm<sup>3</sup>, menor que 4 x 10<sup>3</sup>/mm<sup>3</sup>, ou contagem de segmentados maior que 10%). Sepse severa foi definida como sepse agravada por falência de órgãos e choque séptico como sepse severa em vigência de colapso cardiovascular (VINCENT & ABRAHAM, 2006). Estes conceitos, embora amplamente utilizados e bem validados, ainda são alvo de intensos debates e a necessidade de conceitos mais específicos ainda persiste.

A resposta inflamatória sistêmica resultante da infecção na sepse é caracterizada por uma resposta inflamatória exacerbada com produção sistêmica de mediadores inflamatórios e o estabelecimento de um estado de falência em diversos sistemas

fisiológicos (COHEN, 2002; RUSSEL, 2006; MARSHALL, 2008). Diminuição acentuada da pressão sanguínea, interrupção do fluxo microvascular e irresponsividade a drogas vasopressoras, por exemplo, caracterizam a falência do sistema cardiovascular observado na sepse (SPRONK *et al.*, 2004; JONES & PUSKARICH, 2009). Encefalopatia, disfunções neuroendócrinas e do sistema nervoso autônomo (que parece contribuir para o agravamento da desregulação do sistema cardiovascular) caracterizam o comprometimento do sistema nervoso central (SHARSHAR *et al.*, 2009). Outros sistemas fisiológicos comprometidos são o sistema renal, hepático e respiratório e nervoso (NEMZEK *et al.*, 2008; VENTETUOLO & LEVY, 2008; MAGDER, 2009). Este estado de disfunção dos sistemas orgânicos contribui de forma significativa para o agravamento do quadro clínico e, portanto, é alvo de intensos estudos.

Apenas mais recentemente passou-se a reconhecer o sistema imunológico como um sistema fisiológico suscetível a falência na sepse. Desde então uma série de disfunções imunológicas foram descritas e parecem contribuir para o comprometimento da capacidade de defesa do paciente a curto e longo prazo (LYN-KEW & STANDIFORD, 2008; WANG & DENG, 2008). Geralmente estas disfunções se manifestam como um estado de imunossupressão que parece contribuir para a maior susceptibilidade de pacientes e animais a infecções oportunistas, pneumonia e câncer (BENJAMIM *et al.*, 2004). Linfopenia de células B e células T CD4<sup>+</sup> em decorrência de extensiva apoptose (HOTCHKISS *et al.*, 2001), comprometimento das funções efetoras de células dendríticas (FLOHÉ *et al.*, 2006; WILSON *et al.*, 2006; WEN *et al.*, 2008), desvio de resposta para um perfil Th2 ou T regulador (com elevada produção de citocinas antiinflamatórias como a IL-10) (BENJAMIM *et al.*, 2004; WISNOSKI *et al.*, 2007; DELANO *et al.*, 2007; CAVASSANI *et al.*, 2010) são descritos como disfunções do sistema imune adaptativo e são associados à imunossupressão a longo prazo

(BENJAMIM *et al.*, 2004). Além disso, um estado de hiporresponsividade a ligantes de TLR foi descrito em macrófagos de animais e pacientes com sepse (DENG *et al.*, 2006; WIERSINGA *et al.*, 2009). O estabelecimento deste estado depende do aumento na expressão da quinase M associada ao receptor de IL-1 (interleukin-1 receptor-associated kinase M, IRAK-M) (DENG *et al.*, 2006), e a expressão de IRAK-M se correlaciona com a mortalidade em pacientes (WIERSINGA *et al.*, 2009).

### **1.3. Neutrófilos na sepse**

Dentre as disfunções imunológicas descritas na sepse, a inibição da capacidade migratória de neutrófilos parece ter uma importante contribuição para a evolução clínica do paciente (REDDY & STANDIFORD, 2010; ALVES-FILHO *et al.*, 2008). As graves consequências de uma desregulação do processo de migração de neutrófilos para a defesa do hospedeiro pode ser observada nos casos de susceptibilidade aumentada e infecções recorrentes apresentadas por pacientes com deficiência na função migratória destas células, como na síndrome da deficiência de adesão leucocitária (leukocyte adhesion deficiency, LAD) (MALECH & HICKSTEIN, 2007). Desta forma, a falência da migração de neutrófilos na sepse parece contribuir para o agravamento do quadro clínico por impedir o influxo de neutrófilos para o tecido e uma eficiente eliminação do foco primário de infecção.

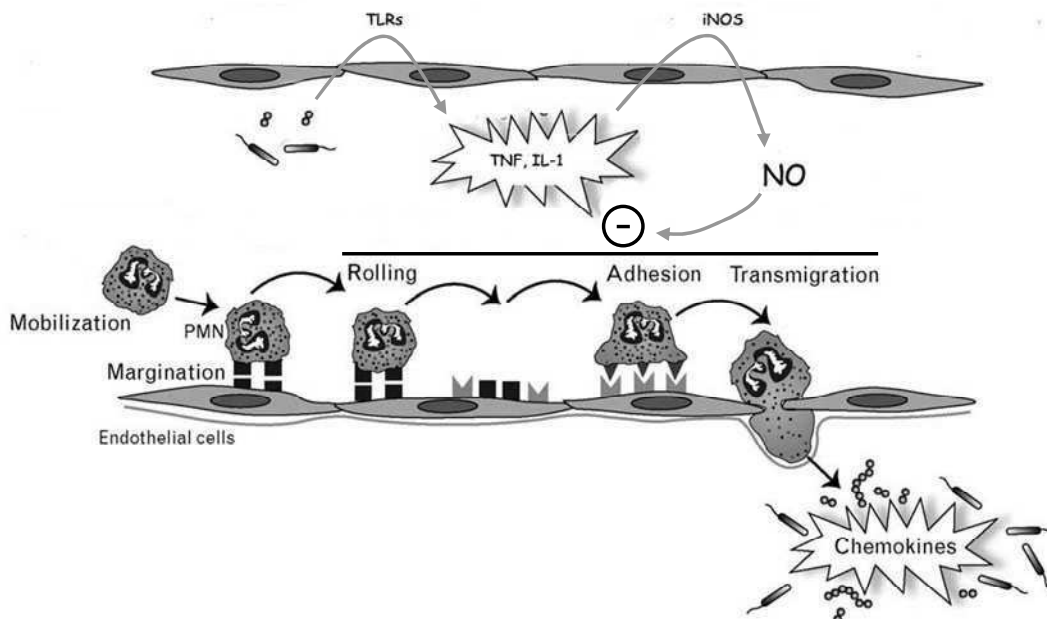
Estudos demonstram claramente que a falência de migração de neutrófilos pode ser estabelecida em modelos animais de sepse. A injeção intravenosa de bactérias ou produtos bacterianos (TAVARES-MURTA *et al.*, 2001; CROSARA-ALBERTO *et al.*, 2002; ALVES-FILHO *et al.*, 2004) em camundongos é capaz de inibir a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal. Da mesma forma, animais submetidos ao

protocolo de ligação e perfuração do ceco (cecal ligation and puncture, CLP) letal, correspondente a uma sepse grave, mas não animais submetidos ao CLP subletal, correspondente a uma sepse moderada ou branda, apresentam diminuição importante da migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal (BENJAMIM *et al.*, 2000; BENJAMIM *et al.*, 2002). Efeitos similares podem ser observados em ratos submetidos ao CLP (TORRES-DUEÑAS *et al.*, 2006). Além disso, neutrófilos isolados de pacientes com sepse apresentam diminuída capacidade migratória *in vitro* em resposta a agentes quimiotáticos clássicos como o fMLP e a IL-8. Este processo se correlaciona com a gravidade do paciente e o seu prognóstico (TAVARES-MURTA *et al.*, 2002). Alves-Filho e colaboradores demonstraram uma importante participação da sinalização via TLR4 (ALVES-FILHO *et al.*, 2004) e, mais recentemente do TLR2 (ALVES-FILHO *et al.*, 2009) no estabelecimento da falência de migração de neutrófilos. Este fenômeno pode ainda ser atribuído a produção sistêmica de mediadores inflamatórios como o TNF $\alpha$  (TAVARES-MURTA *et al.*, 1998), a IL-2 (MORENO *et al.*, 2006a) e o PAF (MORENO *et al.*, 2006b). Tomados em conjunto, estes estudos sugerem que o reconhecimento de bactérias ou produtos bacterianos na circulação por TLRs, levaria à produção sistêmica de mediadores inflamatórios que atuariam promovendo a falência de migração de neutrófilos (Figura 3).

#### **1.4. Neutrófilos, sepse e óxido nítrico**

Comum a todos os estudos sobre a falência da migração de neutrófilos, é a demonstração do envolvimento do óxido nítrico (NO), derivado da NO sintase induzida (iNOS) neste processo. Nestes estudos, o tratamento dos animais com inibidores

farmacológicos de iNOS foi capaz de restabelecer a migração de neutrófilos nos animais submetidos a sepse grave (TAVARES-MURTA *et al.*, 1998; BENJAMIM *et al.*, 2002;



**Figura 3. Cascata de eventos envolvida na inibição da migração de neutrófilos na sepse.** O esquema representa o modelo proposto com base em dados da literatura, para descrever os eventos celulares e moleculares envolvidos na inibição da migração de neutrófilos na sepse. Neste modelo, bactérias (ou produtos bacterianos) na circulação levariam à ativação sistêmica de TLR, com exacerbada produção de mediadores inflamatórios, aumento na expressão da NO sintase induzida e produção sistêmica de grandes quantidades de NO. Estes eventos culminariam na inibição da migração de neutrófilos e prejudicariam o controle da infecção. IL-1: interleucina-1; iNOS: NO sintase induzida; NO: óxido nítrico; TNF: fator de necrose tumoral; TLR: receptores tipo Toll. Modificado de REDDY & STANDIFORD, 2010.

CROSARA-ALBERTO *et al.*, 2002; TORRES-DUEÑAS *et al.*, 2006; MORENO *et al.*, 2006; RIOS-SANTOS *et al.*, 2007; MESTRINER *et al.*, 2007; NAPIMOGA *et al.*, 2008). Além disso, camundongos geneticamente deficientes na enzima iNOS (iNOS<sup>-/-</sup>) são refratários aos efeitos da sepse sobre a migração de neutrófilos, corroborando os dados farmacológicos (BENJAMIM *et al.*, 2002). Em pacientes com sepse, a função migratória de neutrófilos se correlaciona negativamente com a expressão de iNOS em neutrófilos e com os níveis plasmáticos de nitrito e nitrato. Pacientes com elevados

níveis de nitrito e nitrato, indicativos de elevada síntese de NO, e elevada expressão de iNOS, apresentaram neutrófilos com menor capacidade migratória (TAVARES-MURTA et al., 2002; ARRAES et al., 2006). Além disso, neutrófilos de pacientes com sepse ou neutrófilos estimulados *in vitro* com LPS e citocinas, apresentaram um aumento da expressão de GRK2 e GRK5. Esta expressão aumentada pode contribuir para a dessensibilização do neutrófilo a estímulos quimiotáticos através da internalização de receptores. No entanto, a interação entre a produção de NO e a expressão de GRK em neutrófilos, bem como as vias de sinalização envolvidas não foram descritas e permanecem desconhecidas.

O NO é uma molécula simples, capaz de ser produzida por virtualmente todas as células do organismo (MONCADA & HIGGS, 2006). Foi primeiramente descrito como um fator derivado do endotélio capaz de causar relaxamento da musculatura lisa vascular em resposta a acetilcolina, sendo designado fator relaxante derivado do endotélio (endothelial-derived relaxing factor, EDRF) (MONCADA & HIGGS, 2006). Anos mais tarde, Palmer e colaboradores conseguiram medir diretamente a presença de NO em preparações de células endoteliais tratadas com bradicinina (PALMER *et al.*, 1987), levando a proposição de que o EDRF e o NO fossem a mesma molécula (MONCADA & HIGGS, 2006). Uma série de estudos se seguiu e as vias de síntese de NO por células endoteliais (e outras células), assim como as enzimas envolvidas no processo foram descritas.

O NO é um produto da conversão do aminoácido arginina em citrulina pela ação de óxido nítrico sintases. A primeira descrição desta via de síntese, conhecida como a via da L-arginina:NO foi feita em ensaios com células endoteliais cultivadas em meio sem arginina. Nestes ensaios, a adição de arginina ao meio restaurava a produção de NO, gerando níveis detectáveis desta molécula (PALMER *et al.*, 1988). Em seqüência a

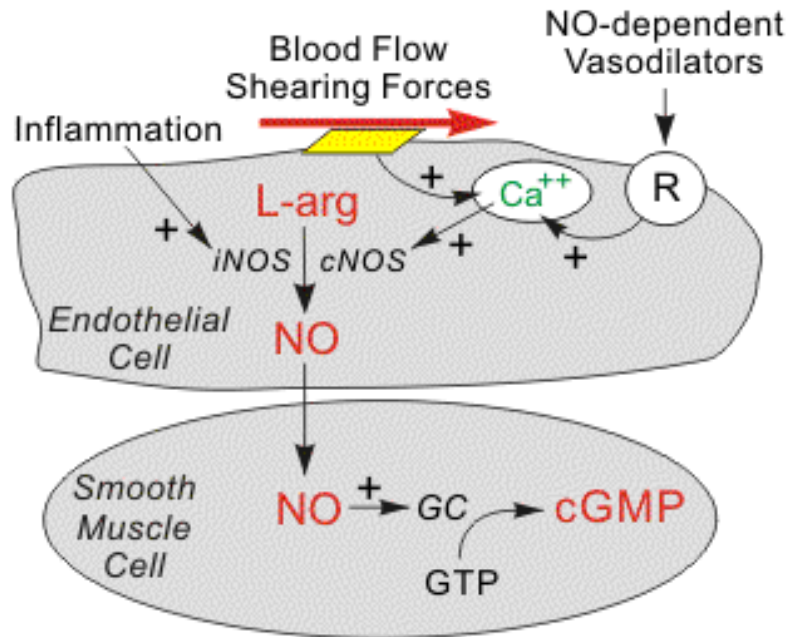


este trabalho, Moncada e colaboradores identificaram pela primeira vez a enzima responsável pela conversão de arginina em citrulina e NO, denominando-a de NO sintase (NOS) (MONCADA *et al.*, 1989).

Atualmente, três isoformas da NOS são descritas (Figura 4). Duas isoformas são constitutivamente expressas, produzem pequenas quantidades de NO (na faixa de nM), e estão envolvidas em processos fisiológicos como o controle do tônus vascular e neurotransmissão (MURAD, 2006). Estas isoformas foram primeiramente descritas no endotélio (NOS I ou NOS endotelial, eNOS) e em neurônios (NOS III ou NOS neuronal, nNOS). Como são constitutivamente expressas, suas atividades são reguladas pelos níveis intracelulares de cálcio, através de sistema cálcio:calmodulina (CARY *et al.*, 2006; MURAD, 2006). A terceira isoforma da NOS (NOS II), por outro lado, é virtualmente indetectável em células quiescentes. Sua expressão é induzida por estímulos inflamatórios como o LPS e citocinas. Desta forma, esta enzima é descrita como a isoforma induzida de NOS ou iNOS. Sua atividade é regulada exclusivamente pela expressão e não sofre influência dos níveis intracelulares de cálcio (MURAD, 2006). Esta enzima tem capacidade de produção de NO cerca de 1000 vezes maior que as isoformas constitutivas (na ordem de  $\mu\text{M}$ ). Por produzir níveis elevados de NO e ter sua atividade regulada por estímulos inflamatórios, a iNOS é considerada como a isoforma envolvida em processos fisiopatológicos como a sepse (MURAD, 2006).

Baseado na regulação da expressão e atividade da iNOS por mediadores inflamatórios, e no envolvimento do NO derivado da iNOS no estabelecimento da falência da migração de neutrófilos, podemos sugerir um quadro teórico para este processo. Neste quadro, o extravasamento de produtos bacterianos para a corrente circulatória em decorrência da infecção sistêmica levaria ao reconhecimento destes ligantes por TLRs e a produção sistêmica de mediadores inflamatórios. Estes

mediadores aumentariam a expressão de iNOS e a produção sistêmica de NO em grandes quantidades. Este NO poderia então atuar sobre os neutrófilos circulantes, inibindo sua capacidade de resposta a estímulos quimiotáticos (Figura 3).



**Figura 4. Regulação da atividade das diferentes isoformas da NO sintase.** Esquema representa as vias de regulação da síntese de NO em células endoteliais. A isoforma constitutiva (cNOS), neste caso a NOS endotelial, responde a aumentos nos níveis intracelulares de cálcio (Ca<sup>++</sup>), regulados por vasodilatadores ou forças de cisalhamento. Um mecanismo similar regula a atividade da isoforma constitutiva neuronal (nNOS) em resposta a neurotransmissores. A isoforma induzida (iNOS) é regulada por aumento de expressão em resposta a estímulos inflamatórios. Neste esquema, a via de sinalização envolvendo a ativação de GC é representada. Extraído de [www.cvphysiology.com](http://www.cvphysiology.com).

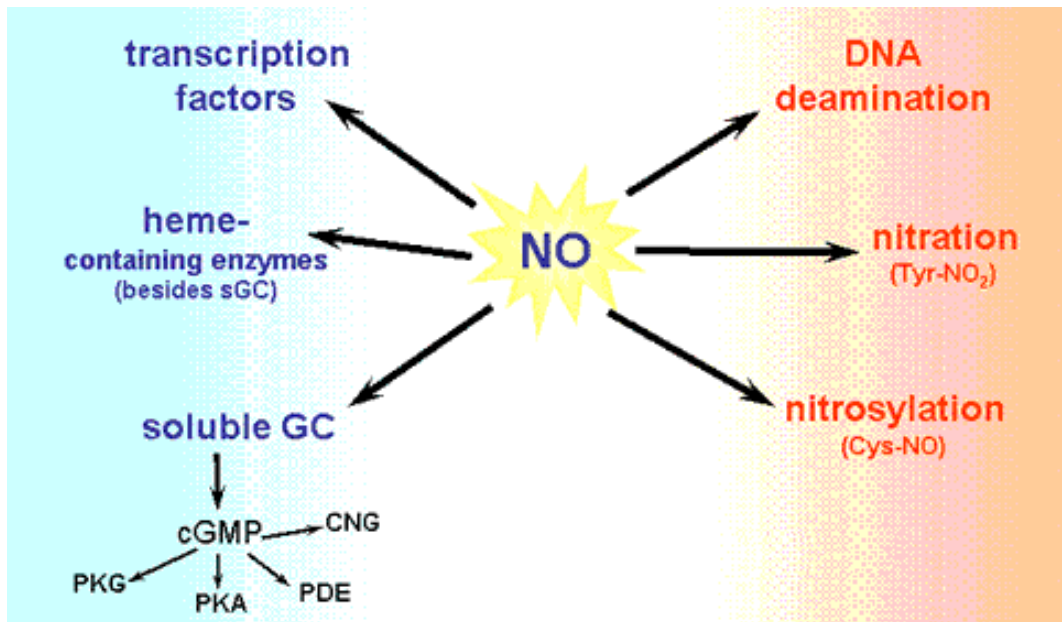
Com base nestes dados e nas evidências do envolvimento do NO na disfunção do sistema cardiovascular na sepse, é bastante tentador sugerir a utilização de inibidores da síntese de NO no tratamento da sepse. A princípio, a inibição da síntese de NO poderia reverter o quadro de disfunção vascular e restaurar a capacidade migratória dos neutrófilos, contribuindo para a melhora do quadro geral do paciente. No entanto, a

utilização de inibidores da síntese de NO em modelos animais de sepse levou, inesperadamente, a um aumento na mortalidade (BENJAMIM *et al.*, 2002; PULITI *et al.*, 2004). Este efeito foi observado a despeito da recuperação da função hemodinâmica destes animais e da restauração da migração de neutrófilos para o foco infeccioso. Uma possível explicação para este achado foi sugerido pela observação de números similares de bactérias no lavado peritoneal e no sangue dos animais tratados e não tratados (BENJAMIM *et al.*, 2002). Possivelmente, a inibição da síntese de NO interfere com a capacidade de eliminação das bactérias pelos neutrófilos, uma vez que espécies reativas de nitrogênio são reconhecidamente importantes para a capacidade bactericida destas células (MALAWISTA *et al.*, 1992; KAPLAN *et al.*, 1996; FIERRO *et al.*, 1999, BROVKOVYCH *et al.*, 2008).

Em adição a estes achados experimentais, uma recente triagem clínica de fase III utilizando um inibidor farmacológico da síntese de NO foi suspenso por resultar em aumento da mortalidade nos pacientes tratados (LÓPEZ *et al.*, 2004). Embora este estudo não tenha comparado a contagem de bactérias entre os pacientes tratados e não tratados, é possível que a interferência com mecanismos de eliminação dos agentes infecciosos tenha contribuído para o resultado desfavorável destes testes. De toda forma, a conclusão que se pode extrair dos resultados obtidos em humanos e animais é a de que a modulação da síntese de NO na sepse não é uma estratégia terapêutica segura, e o uso de inibidores da síntese de NO possui importantes limitações que impedem sua aplicação clínica. Neste sentido, estudos visando um melhor entendimento dos mecanismos moleculares disparados pelo NO na sepse são de grande importância.

O NO é capaz de regular eventos celulares por diversas vias (CARY *et al.*, 2006; MURAD, 2006) (Figura 5). A via mais bem descrita depende da ativação da enzima guanilato ciclase (GC). Esta enzima possui um grupamento heme onde o NO se liga,

ativando a síntese de monofosfato de guanosina cíclico (cyclic guanosine monophosphate, cGMP) a partir do trifosfato de guanosina (guanosine triphosphate, GTP). O cGMP é capaz de ativar proteínas quinase dependentes de cGMP (cGMP-dependent protein kinase, PKG), que são os mediadores finais de grande parte dos efeitos celulares do NO (MURAD, 2006). Além desta via clássica, o NO pode regular processos biológicos através do ataque a aminoácidos de proteínas e lipídeos (ISCHIROPOULOS, 2003; CARY *et al.*, 2006; HESS *et al.*, 2005). Esta propriedade do NO era até recentemente considerada como um mecanismo citotóxico, capaz de causar danos a estruturas celulares como proteínas, lipídeos de membrana e DNA. No entanto, estudos recentes mostram que este processo pode estar envolvido na regulação pós-



**Figura 5. Mecanismos de sinalização celular disparados pelo NO.** Esquema representando as vias de sinalização disparadas pelo NO. À esquerda estão representadas as vias consideradas envolvidas nos efeitos fisiológicos do NO, como a ativação da via GC-cGMP-PKG. À esquerda estão representadas as vias envolvidas nos efeitos fisiopatológicos do NO, como o ataque de estruturas celulares. Extraído de [cgmp.blauplanet.com/adv/nomol.html](http://cgmp.blauplanet.com/adv/nomol.html)

transcricional de proteínas, assim como eventos de fosforilação, sugerindo um importante papel fisiológico para estas modificações (CARY *et al.*, 2006; FOSTER *et al.*, 2009). O ataque de componentes celulares pelo NO pode ser direto, resultando na modificação de aminoácidos sulfurados como a nitrosilação de resíduos de serina e treonina (HESS *et al.*, 2005). Alternativamente, o NO pode se combinar com EROs, como ânions superóxido ( $O_2^-$ ), formando peroxinitrito ( $ONOO^-$ ), capaz de atacar resíduos de tirosina, causando nitração de proteínas (ISCHIROPOULOS, 2003).

A despeito da necessidade de um melhor entendimento dos eventos moleculares disparados pelo NO na sepse, nenhum estudo foi realizado para descrever as vias de sinalização envolvidas na inibição da migração de neutrófilos pelo NO. Além disso, as relações entre NO, expressão de GRK e receptores quimiotáticos, e a modulação da resposta migratória em neutrófilos humanos permanecem desconhecidas.

## 2. OBJETIVOS

**2.1. *Objetivo geral.*** O presente estudo teve como objetivo principal investigar os mecanismos moleculares envolvidos no estabelecimento da inibição da migração de neutrófilos na sepse.

**2.2. *Objetivos específicos.*** Dentro do objetivo geral proposto neste estudo, nossos objetivos específicos foram:

- Estabelecer um modelo in vitro para o estudo das vias de sinalização envolvidas na inibição da migração de neutrófilos humanos na sepse;
- Investigar a participação da via NO-GC-PKG no estabelecimento da falência de migração de neutrófilos;
- Investigar a modulação da expressão de receptores (CXCR2, BLT1 e FPRL1) no fenômeno;
- Investigar a participação de GRK2 neste processo e a relação entre NO e a expressão de GRK2 em neutrófilos;
- Analisar os efeitos de um inibidor seletivo da atividade de GC sobre a migração de neutrófilos in vivo em um modelo de sepse;
- Analisar os efeitos de um inibidor seletivo da atividade de GC sobre a sobrevivência de animais submetidos a sepse.

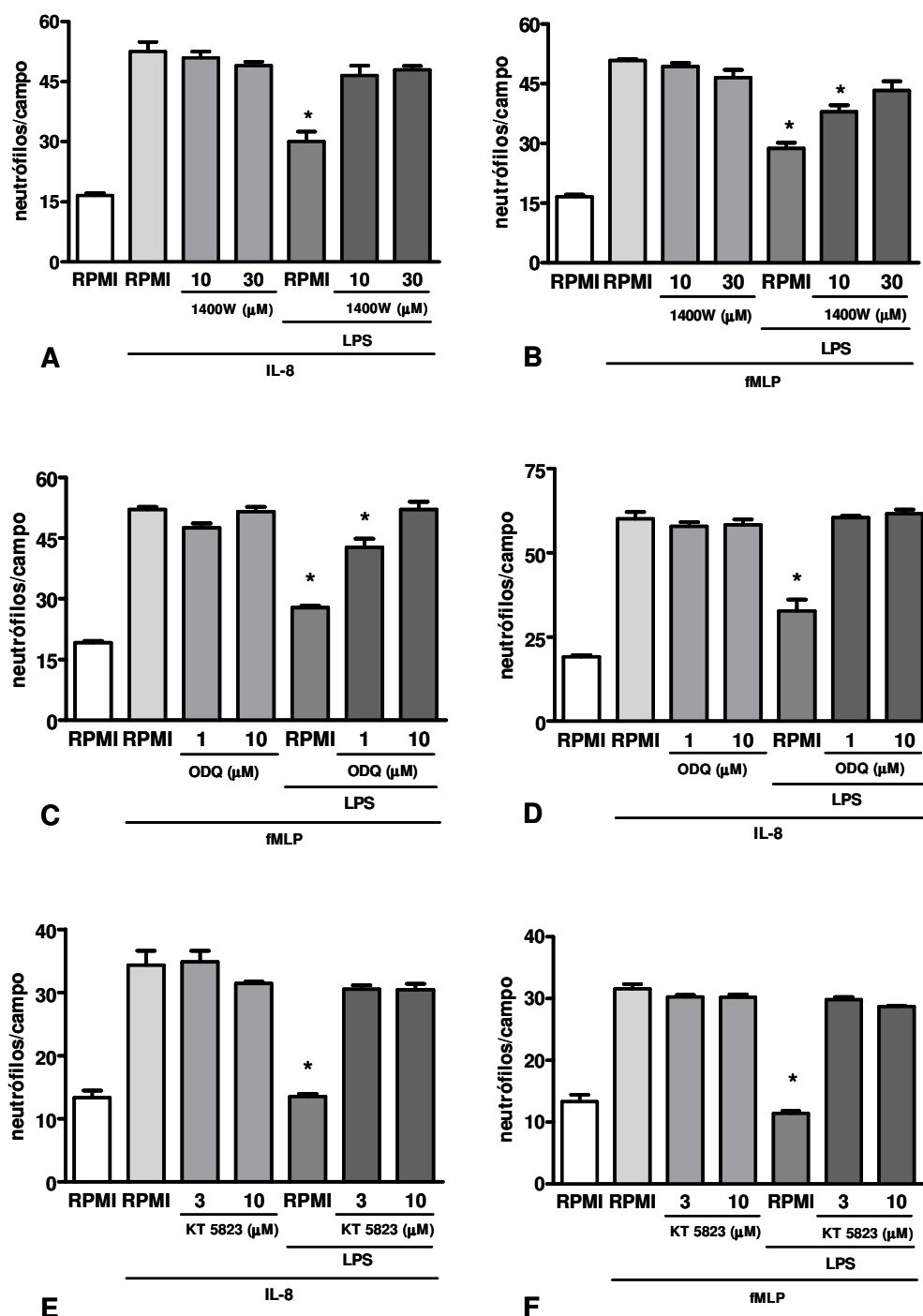
### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

**3.1. Isolamento de neutrófilos humanos.** Neutrófilos humanos foram isolados de sangue periférico de doadores voluntários saudáveis seguindo protocolo estabelecido no laboratório (COELHO *et al.*, 2001). O isolamento foi realizado por centrifugação em gradiente descontínuo de Percoll. Para isso, foram preparadas quatro soluções de diferentes concentrações de Percoll diluído em solução balanceada de Hanks, a 72%, 63%, 54% e 45%. Um volume de 2 mL de cada uma das soluções foi cuidadosamente transferido para tubo de ensaio de 15 mL de forma que as soluções ficassem dispostas em ordem crescente de concentração, com a solução mais concentrada (72%) no fundo e a menor (45%) no alto do tubo. Em seguida, sangue venoso foi coletado por punção e transferido para tubo de ensaio contendo solução de EDTA 5% em PBS, na proporção de 20 mL de sangue para cada 1 mL de solução de EDTA. O sangue (2 mL) foi então transferido para os tubos com os gradientes e centrifugado a 500 x g, por 30 minutos, a temperatura ambiente, e com baixa aceleração e desaceleração. Ao final da centrifugação, os neutrófilos formam um anel na interface entre as soluções de 63% e 72%. Este anel foi cuidadosamente coletado e transferido para um tubo de 15 mL. A este tubo foi adicionada solução de cloreto de amônio (tampão de lise de hemácias) para a eliminação de hemácias contaminantes. O tubo foi centrifugado a 450 x g por 10 minutos, o sobrenadante descartado e o pellet (neutrófilos) ressuspensão em solução balanceada de Hanks. O tubo foi então novamente centrifugado (450 x g, 10 minutos), o sobrenadante descartado e o pellet contendo os neutrófilos finalmente ressuspensão em meio de cultura RPMI-1640. O número de células recuperadas foi determinado por contagem em câmara de Neubauer. A pureza da preparação foi avaliada por contagem diferencial em lâminas de citocentrífuga coradas com Panótico. A viabilidade das

células foi determinada por contagem em câmara de Neubauer utilizando solução de azul de trypan. Nos experimentos descritos, a viabilidade celular foi sempre superior a 99% e a pureza maior que 95%.

**3.2. Tratamento *in vitro* dos neutrófilos isolados.** Os neutrófilos, isolados como descrito acima, foram incubados em meio RPMI-1640 a uma densidade de  $10^6$  células por mL, na presença de LPS (10  $\mu\text{g/mL}$ ), por 1 hora a  $37^\circ\text{C}$ . Para os experimentos utilizando os inibidores farmacológicos, as células foram pré-incubadas com o inibidor seletivo da iNOS, 1400W (30  $\mu\text{M}$ , diluído em meio de cultura), o inibidor seletivo da guanilato ciclase, ODQ (10  $\mu\text{M}$ , diluído em DMSO), ou o inibidor seletivo da proteína quinase G, KT 5823 (3  $\mu\text{M}$ , diluído em DMSO), ou seus respectivos veículos, por 30 minutos a  $37^\circ\text{C}$  antes da adição de LPS. As concentrações dos inibidores foram determinadas em experimentos preliminares de quimiotaxia *in vitro* (Figura 6). Nestes experimentos também observamos que os inibidores sozinhos não possuem influência sobre a quimiotaxia de neutrófilos *in vitro* (Figura 6). Em outra série de experimentos, as células foram tratadas como descrito acima, sendo estimuladas com LTA (10  $\mu\text{g/mL}$ ) ao invés de LPS. Em um grupo determinado de experimentos, as células foram incubadas com o ativador de guanilato ciclase, BAY 41-2272 (30  $\mu\text{M}$ , diluído em DMSO), por 1 hora a  $37^\circ\text{C}$ . Para todos os tratamentos, após o período de incubação com os estímulos, as células foram lavadas e ressuspensas em meio RPMI-1640 para serem usadas nos ensaios descritos abaixo.





**Figura 6.** Curvas concentração-efeito para os diferentes inibidores farmacológicos utilizados. Neutrófilos humanos isolados foram incubados por 30 minutos com o inibidor seletivo de iNOS, 1400W (10 ou 30  $\mu$ M, painéis A e B), o inibidor seletivo de GC, ODQ (3 ou 10  $\mu$ M, painéis C e D), ou o inibidor seletivo de PKG, KT 5823 (3 ou 10  $\mu$ M, painéis E e F). Em seguida, as células foram incubadas por 1 hora com LPS (10  $\mu$ g/mL) ou mantidas em meio (RPMI). As células foram então utilizadas em ensaio de quimiotaxia em câmara de Boyden para avaliação da resposta quimiotática a IL-8 (30 nM, painéis A, C e E) ou ao fMLP (10<sup>-6</sup> M, painéis B, D e F). Células não tratadas com inibidores e não estimuladas com LPS foram utilizadas como controle. Os dados representam média  $\pm$  E.P.M. do número de neutrófilos por campo em microscopia ótica com aumento de 1000X. \* indica diferença significativa em relação à resposta quimiotática do controle não tratado e não estimulado (RPMI, segunda barra de cada gráfico).

**3.3. Ensaio de quimiotaxia em câmara de Boyden.** Para avaliação da resposta quimiotática de neutrófilos, foi utilizado o ensaio de quimiotaxia em câmara de Boyden de 48 poços (Neuroprobe Inc.). Nesta metodologia, 27,5 µL do estímulo quimotático são adicionados aos poços inferiores da câmara. Os neutrófilos tratados como descrito ( $5 \times 10^4$  células em 50 µL) foram adicionados nos poços superiores da câmara. Os poços inferiores, contendo os estímulos quimiotáticos e os poços superiores com as células foram separados por um filtro de policarbonato com poros de 5 µm de diâmetro (Neuroprobe Inc.). A câmara foi incubada por 1 hora a 37°C. Após a incubação, o filtro foi retirado cuidadosamente da câmara e lavado em solução salina para retirada das células que não migraram (que ficam na parte superior do filtro). O filtro foi então fixado e corado utilizando o kit “Diff-Quick” (Baxter Travenol Laboratories). Os estímulos quimiotáticos utilizados foram IL-8 (30 nM), fMLP ( $10^{-6}$  M) e LTB<sub>4</sub> ( $10^{-7}$  M). As concentrações dos estímulos foram escolhidas com base em experimentos anteriores do laboratório e concentrações utilizadas em ensaios similares reportados na literatura. O número de neutrófilos que migraram em resposta aos estímulos foi determinado por contagem, em microscópio ótico sob aumento de 1000X, de pelo menos cinco campos escolhidos aleatoriamente. Cada um dos pontos experimentais foi feito em triplicata e cada experimento foi repetido pelo menos três vezes. Os resultados são apresentados como média ± erro padrão da média (E.P.M.) do número de neutrófilos por poço.

**3.4. Dosagem de GMP cíclico.** Para a determinação dos níveis intracelulares de GMP cíclico, foi utilizado um kit comercial de dosagem por ELISA competitivo (Amersham Biosciences). As células tratadas como descrito acima ( $10^6$  células) foram centrifugadas, ressuspensas em 180 µL de meio de cultura e imediatamente congeladas. As amostras congeladas foram mantidas a -20°C até o momento da dosagem. No momento da

dosagem, as amostras foram descongeladas e 20  $\mu\text{L}$  do tampão de lise do kit foram adicionados. As amostras foram dosadas em quadruplicata e o conteúdo de GMP cíclico determinado seguindo exatamente o protocolo recomendado pelo fabricante. Os resultados obtidos estão expressos como média  $\pm$  E.P.M. do conteúdo de GMPc (fmol por  $10^6$  células).

**3.5. Citometria de fluxo.** Para determinação da expressão de receptores na membrana dos neutrófilos, foi utilizada a metodologia de citometria de fluxo. Para isso, imediatamente após a incubação com LPS, os neutrófilos ( $10^6$  células) foram fixados com solução de paraformaldeído a 1% em PBS, por 20 minutos no gelo. Após a fixação, as células foram lavadas em tampão de FACS (BSA 2%, SFB 5%, azida sódica 0.1% em PBS) e ressuspendidas em 50  $\mu\text{L}$  do mesmo tampão. Os anticorpos específicos marcados com fluorescência ou seus respectivos controles de isotipo foram adicionados na diluição de 1:100. As amostras foram incubadas no gelo por 40 minutos, lavadas extensivamente em tampão de FACS e ressuspendidas em 400  $\mu\text{L}$  do mesmo tampão. Para a determinação da expressão do receptor de baixa afinidade para fMLP (FPRL1) foi necessário um passo a mais, pois o anticorpo utilizado não está acoplado a fluoróforo. Neste caso, após a fixação e lavagem das células, o anticorpo primário foi incubado overnight a 4°C, na diluição de 1:50. Após lavagem em tampão de FACS, o anticorpo secundário marcado com FITC foi incubado por 2 horas a 4°C, na diluição de 1:50. Após extensiva lavagem em tampão de FACS, as células foram ressuspendidas em 400  $\mu\text{L}$  do mesmo tampão. As amostras foram adquiridas utilizando FACScalibur (BD Biosciences) e analisadas com auxílio do programa FCS Express V3 para Windows (Denovo Software). Os anticorpos utilizados foram: IgG murino anti-CXCR2 humano marcado com PE (BD Biosciences), IgG murino anti-BLT1 humano marcado com PE

(BD Biosciences), IgG murino marcado com PE (isotipo controle, BD Biosciences), IgG murino anti-FPRL1 (gentilmente cedido pela Profa. Iolanda M. Fierro, DFP – UERJ) e IgG anti-IgG murino marcado com FITC (Sigma).

**3.6. Citoquímica.** A técnica de citoquímica foi utilizada para determinar (a) a resposta dos neutrófilos aos estímulos quimiotáticos com relação à mobilização do citoesqueleto de actina; e (b) a produção de óxido nítrico pelos neutrófilos em resposta a estimulação com LPS.

**3.6.1. Mobilização do citoesqueleto de actina.** A mobilização do citoesqueleto de actina em resposta aos estímulos quimiotáticos foi determinada por reação com faloidina marcada com TRITC. Para isso, os neutrófilos ( $10^5$  células) incubados como descrito acima, foram incubados por 5 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$ , na ausência ou presença dos estímulos (IL-8 ou fMLP ) e imediatamente citocentrifugados. As lâminas foram em seguida fixadas em solução de paraformaldeído a 4% em PBS, por 20 minutos a temperatura ambiente. Após a fixação, as lâminas foram lavadas com PBS e permeabilizadas pela incubação com solução de Triton X-100 0,1% em PBS por 5 minutos a temperatura ambiente. As lâminas foram imediatamente lavadas com PBS seguindo-se do bloqueio dos sítios inespecíficos por incubação com BSA 2% por 30 minutos a temperatura ambiente. Em seguida as lâminas foram incubadas com faloidina-TRITC (1:1000 em PBS) por 90 minutos a temperatura ambiente. Após lavagem extensiva em PBS, as lâminas foram montadas com solução de N-propil-galacto (20mM em PBS contendo 20% glicerol) e lamínula. As imagens foram adquiridas em microscopia de fluorescência (Olympus BX40).

**3.6.2. Produção de óxido nítrico.** A produção de óxido nítrico por neutrófilos em resposta ao estímulo com LPS foi determinada por reação com a sonda DAF-FM

(Invitrogen), uma sonda específica que fluoresce em verde quando na presença de óxido nítrico. Para isso, os neutrófilos foram isolados de sangue periférico humano e ressuspendidos em solução balanceada de Hanks sem arginina. Às amostras foi adicionada a sonda DAF-FM na concentração final de 5mM e incubadas por 40 minutos a 37°C. Após a incubação, as células foram lavadas, ressuspendidas em meio de cultura com arginina e estimuladas com LPS por 1 hora. Após este período, as células foram citocentrifugadas e imediatamente fixadas com paraformaldeído 1% em PBS por 20 minutos. Após a fixação, as células foram lavadas e marcadas com DAPI para a visualização do núcleo celular. As lâminas foram montadas com lamínula e as imagens adquiridas em microscopia de fluorescência.

**3.7. Imunofluorescência.** A técnica de imunofluorescência foi utilizada para determinar (a) a resposta dos neutrófilos aos estímulos quimiotáticos com relação à ativação de proteínas tirosina quinases; e (b) o nível de expressão da quinase tipo 2 de receptores acoplados a proteína G (GRK2).

**3.7.1. Conteúdo total de fosfotirosina.** A ativação de proteínas tirosina quinase em resposta a estímulos quimiotáticos foi determinada indiretamente pela avaliação do conteúdo celular total de proteínas fosforiladas em resíduos de tirosina. Para isso, as células foram citocentrifugadas, fixadas e permeabilizadas exatamente como descrito acima. Após o bloqueio dos sítios inespecíficos com solução de BSA, as lâminas foram incubadas com anticorpo anti-fosfotirosina (IgG murina anti-fosfotirosina, 1:50 em PBS, Santa Cruz Biotechnology) por 18 horas a 4°C em câmara úmida. Após esta incubação, as lâminas foram lavadas com PBS e incubadas por 2 horas com anticorpo secundário marcado com FITC. Após este período, as lâminas foram lavadas com PBS e

montadas com N-propil-galacto e lamínula como descrito acima. As imagens foram adquiridas em microscopia de fluorescência (Olympus BX40).

**3.7.2. Expressão de GRK2.** A expressão de GRK2 em neutrófilos estimulados com LPS foi determinada por imunofluorescência. Para isso, as células foram citocentrifugadas, fixadas e permeabilizadas exatamente como descrito acima. Após o bloqueio dos sítios inespecíficos com solução de BSA, as lâminas foram incubadas com anticorpo anti-GRK2 humano (IgG de coelho anti-GRK2 humano, 1:200 em PBS, Santa Cruz Biotechnology) por 18 horas a 4°C em câmara úmida. Após esta incubação, as lâminas foram lavadas com PBS e incubadas por 2 horas com anticorpo secundário marcado com AlexaFluor 594 (Invitrogen). Após este período, as lâminas foram lavadas com PBS, marcadas com DAPI (para a visualização do núcleo celular) e montadas com N-propil-galacto e lamínula como descrito acima. As imagens foram adquiridas em microscopia de fluorescência (Olympus BX40) e analisadas utilizando o programa Image J (Wayne Rasband, NIH).

**3.8. Eletroforese e westernblotting.** Para determinação da expressão de GRK2 em neutrófilos estimulados com LPS, também foi utilizada a técnica de westernblotting. Após a estimulação dos neutrófilos ( $4 \times 10^6$  células), estas foram centrifugadas e imediatamente lisadas em tampão de lise fervendo (1% SDS, 1mM ortovanadato, 10mM Tris, pH 7.4). As amostras foram fervidas por 3 minutos, sonicadas por 30 segundos e novamente fervidas por mais 2 minutos. As amostras foram então armazenadas a -20°C até sua utilização. A quantidade de proteína nas amostras foi determinada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976), a partir de uma alíquota de 5 µL, diluída 1:10 em PBS. Às amostras descongeladas foi adicionado tampão de amostra (Tris-HCl 50 mM, pH 6,8, SDS 1%, β-mercaptoetanol 5%, glicerol 10%, azul

de bromofenol 0,001%) e fervidas novamente por 3 minutos. As amostras (30 µg de proteína) foram separadas por eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida a 10% (150 V, 25 mA por 90 minutos) e em seguida transferidas para membrana de difluoreto de polivinilideno (PVDF, Hybond-P, Amersham Biosciences) por eletrotransferência (15 V, 328 mA por 1 hora). A eficiência da transferência foi avaliada pela coloração da membrana com vermelho de Ponceau. Após lavagem em água para retirada do corante, a membrana foi então incubada por 1 hora a temperatura ambiente em solução de bloqueio (BSA 5%, Tween-20 0,5% em PBS). Em seguida, a membrana foi incubada por 18 horas a 4°C com anticorpo primário diluído 1:1000 em PBS contendo BSA 2% e Tween-20 0,5%. Após a incubação com o anticorpo primário, a membrana foi lavada 3 vezes (10 minutos cada lavagem) em PBS contendo Tween-20 0,5% (T-PBS). A membrana foi em seguida incubada por 2 horas com anticorpo secundário acoplado a peroxidase, diluído 1:10000 em T-PBS. As membranas foram então lavadas com T-PBS (3 lavagens de 10 minutos), secas e incubadas com solução de quimioluminescência (Super Signal® West Pico ECL Substrate, Pierce). A visualização das bandas reativas foi feita por exposição da membrana a filme radiográfico e revelação em máquina reveladora. As imagens foram captadas e analisadas usando o programa ImageJ.

**3.9. Animais e procedimentos *in vivo*.** Os animais utilizados neste projeto foram camundongos isogênicos da linhagem C57/BL6, machos ou fêmeas com 6 a 8 semanas de idade, pesando entre 18 e 22 g. Os animais foram criados em condição livre de patógenos específicos (specific pathogen free, SPF), mantidos em ciclo claro-escuro de 12 horas, com livre acesso a ração industrializada para roedores (Nuvital) e água. Todos os procedimentos utilizados foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP-USP).

*3.9.1. Modelo experimental de sepse.* O modelo de sepse utilizado foi o de ligação e perfuração do ceco (cecal ligation and puncture, CLP). Este procedimento é considerado um dos melhores modelos experimentais de sepse (HUBBARD *et al.*, 2005; BURAS *et al.*, 2005; NEMZEK *et al.*, 2008) e causa uma peritonite aguda, cuja gravidade pode ser controlada pelo número de perfurações feitas no ceco do animal e/ou pelo diâmetro da agulha utilizada para realizar as perfurações (BENJAMIM *et al.*, 2000). No presente estudo, foram utilizados dois diferentes procedimentos de CLP, um CLP letal (L-CLP), onde todos os animais morrem da infecção dentro das primeiras 48 horas, e um CLP subletal (SL-CLP), onde os animais desenvolvem uma peritonite aguda controlada, cuja sobrevida é de 100%. Em ambos os procedimentos, os animais foram pesados e anestesiados com tribromoetanol (250 mg/Kg). Após a tricotomia e antissepsia da região abdominal, foi feita uma incisão de aproximadamente 1 cm por onde o ceco foi exposto. Com uma linha, a junção entre o cólon e o ceco foi parcialmente ocluída e foram feitas no ceco duas perfurações com agulha 16G (L-CLP) ou quatro perfurações com agulha 21G (SL-CLP). Em seguida o ceco foi recolocado na cavidade abdominal, a incisão suturada com fio de nylon 5-0 e a ferida foi limpa com álcool iodado. Os animais receberam então injeção s.c. de 1 mL de salina para reposição hídrica e foram mantidos aquecidos até a completa recuperação da anestesia. Animais que tinham o ceco exposto, mas não ligado nem perfurado foram utilizados como controle do procedimento cirúrgico (SHAM).

*3.9.2. Protocolo de pré-tratamento.* Para a avaliação do efeito da inibição da síntese de NO ou da inibição da ativação de GC no modelo de CLP, os animais foram pré-tratados com 1400W (3 mg/Kg, s.c.) ou ODQ (5  $\mu$ mol/Kg, s.c.), 30 minutos antes do procedimento de CLP. O 1400W foi diluído em salina estéril e o ODQ em salina



contendo DMSO 1%. Animais que receberam apenas veículo foram utilizados como controle.

*3.9.3. Protocolo de pós-tratamento I.* Para a avaliação do efeito da inibição da ativação de GC em animais com sepse, os animais foram tratados com duas injeções s.c. de ODQ (5  $\mu\text{mol/Kg}$ ), 3 e 12 horas após o procedimento de CLP. O ODQ foi diluído em salina contendo DMSO 1%. Animais que receberam apenas veículo foram utilizados como controle.

*3.9.4. Protocolo de pós-tratamento II.* Um segundo protocolo de pós-tratamento também foi utilizado para a avaliação do efeito da inibição da ativação de GC em animais com sepse. Neste protocolo, os animais foram tratados com três injeções s.c. de ODQ (5  $\mu\text{mol/Kg}$ ), 3, 12 e 24 horas após o procedimento de CLP. O ODQ foi diluído em salina contendo DMSO 1% e animais que receberam apenas veículo foram utilizados como controle.

**3.10. Avaliação da migração *in vivo*.** Para avaliar a migração de neutrófilos *in vivo*, foi feita a lavagem da cavidade peritoneal com 3 mL de PBS-EDTA estéril (1mM EDTA em PBS), 6 horas após o procedimento cirúrgico. O número total de células recuperadas da cavidade foi determinado em câmara de Neubauer. A contagem diferencial para determinação da proporção de neutrófilos no lavado foi feita em preparações de citocentrífuga coradas com panótico. A partir da contagem diferencial e o número total de células, o número total de neutrófilos na cavidade foi determinado.

**3.11. Cultura de bactérias e enumeração de unidades formadoras de colônia (UFC).** O grau de infecção foi determinado através da enumeração do número de UFCs presentes no lavado peritoneal e sangue dos animais submetidos ao CLP, 6 horas após a

cirurgia. Para isso, alíquotas de 10  $\mu\text{L}$  do lavado peritoneal (coletado como descrito acima) ou de sangue venoso anti-coagulado com heparina, foram diluídas seriadamente em salina estéril. Em seguida, 10  $\mu\text{L}$  da diluição de  $10^{-6}$ , para amostras de lavado, e  $10^{-2}$ , para amostras de sangue, foram dispersos em placas contendo Agar Müller-Hinton. As placas foram incubadas por 18 horas em estufa a  $37^{\circ}\text{C}$  e, em seguida, o número de colônias formadas foi determinado. Para culturas onde não houve crescimento bacteriano, novas culturas foram feitas a partir das mesmas amostras mantidas a  $4^{\circ}\text{C}$ , utilizando uma diluição 100 vezes menor. O número de UFCs foi calculado e os resultados são expressos como o logaritmo do número de UFCs por cavidade (para o lavado peritoneal) ou por mL (para sangue).

**3.12. Ensaio de mieloperoxidase (MPO).** A quantificação do acúmulo de neutrófilos no pulmão dos animais submetidos ao CLP foi determinado pelo ensaio da atividade da mieloperoxidase em homogeneizados de pulmão obtidos 6 horas após indução da sepse (ALVES-FILHO *et al.*, 2004). Para isso, após perfusão com salina, o pulmão de cada animal foi coletado e transferido para tubos de microcentrífuga de 2 mL com fundo chato, contendo 200  $\mu\text{L}$  de tampão 1 gelado (NaCl 0,1 M, EDTA 0,012 M, em tampão fosfato pH 4.7). Estas amostras foram mantidas congeladas até a preparação da amostra. Após descongelamento, o tecido foi homogeneizado com o auxílio de triturador (Pollytron). O material homogeneizado foi em seguida centrifugado a 3.000 r.p.m. por 15 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . O sobrenadante foi descartado e um choque hipotônico foi realizado no sedimento celular através da adição de 600  $\mu\text{L}$  de NaCl 0,2%, seguido da adição de 600  $\mu\text{L}$  de uma solução de NaCl 1,6% e glicose 5%. Depois de nova centrifugação a 3000 r.p.m. por 15 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ , o sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuspenso em 500  $\mu\text{L}$  de tampão 2 (tampão fosfato pH 5.4, contendo 0,5% de brometo

de hexadeciltrimetilamonio, H-TAB) e novamente homogeneizado. Em seguida, as amostras sofreram três ciclos de congelamento e descongelamento em nitrogênio líquido com posterior centrifugação a 13.000 r.p.m. por 15 minutos a 4°C. Após a centrifugação, alíquotas de 3 µL do sobrenadante das amostras foram colocadas em placa de 96 poços para o ensaio. Em cada poço foram então adicionados 25 µL de solução de TMB (3, 3',3,3-tetrametilbenzidina, 3,84 mg/mL em DMSO, concentração final no poço de 1,6 mM) e a placa foi incubada por 5 minutos a 37°C. Após este período, 100 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (concentração final de 0,05 mM) foram adicionados nos poços e a placa foi incubada por mais 5 min a 37 °C. A seguir a reação foi interrompida pela adição de 75 µL de uma solução de ácido sulfúrico 4 M. A placa foi levada para o leitor de placas e a intensidade da reação foi determinada pela absorbância a 450 nm. A estimativa do número de neutrófilos em cada amostra foi feita comparando o resultado das amostras com uma curva padrão de neutrófilos obtidos da cavidade peritoneal de camundongos 6 horas após a injeção de carragenina. A estimativa final do número de neutrófilos por mg de tecido foi feita a partir dos resultados da reação e o peso das amostras de pulmão (determinado no momento da coleta das amostras). Os resultados são expressos como média ± E.P.M. do número de neutrófilos por mg de tecido.

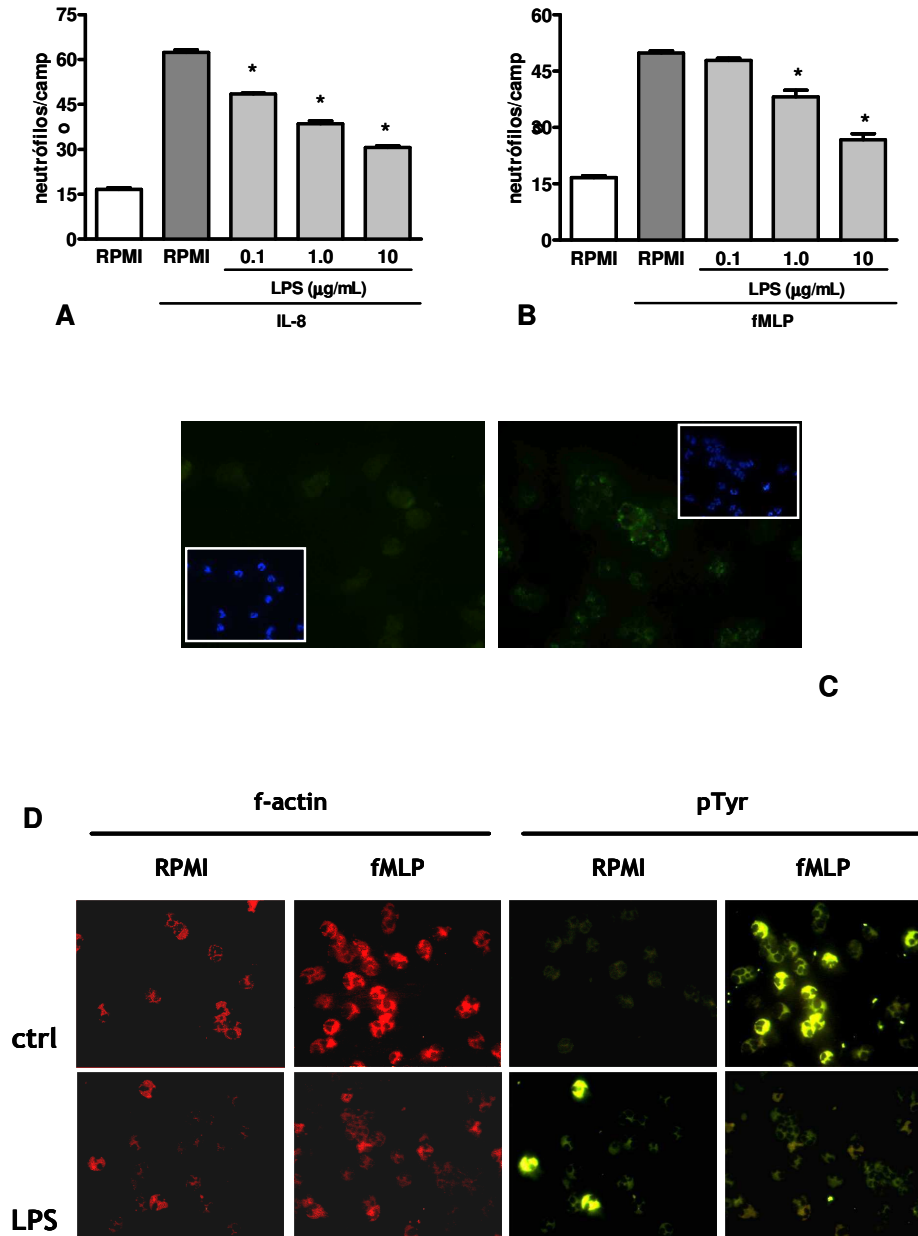
**3.13. Reagentes.** Percoll e todos os reagentes para eletroforese foram obtidos da Amersham Biosciences. Dimetilsulfóxido (DMSO), ácido lipoteicoico (LTA) de *Staphylococcus aureus*, lipopolissacarídeo (LPS) de *Escherichia coli* (sorotipo 0111:B4), faloidina conjugada a rodamina, IL-8, *N*-formil-metionil-leucil-fenilalanina (fMLP), albumina sérica bovina (BSA), brometo de hexadeciltrimetilamonio (H-TAB) e 3,3',3,3-tetrametilbenzidina (TMB) foram obtidos da Sigma. 5-ciclopropil-2-[1-(2-fluoro-benzil)-1*H*-pirazolo[3,4-*b*]piridina-3-yl]pirimidina-4-ilamine (BAY 41-2272) foi

obtido da Calbiochem. Dihidrocloreto de *N*-[[3-(aminometil)fenil]metil]-etanimidamida (1400W), 1H-(1,2,4)oxadiazolo(4,3-a)quinoxalin-1-one (ODQ), ester metílico do ácido (9S,10R,12R)-2,3,9,10,11,12-hexahidro-10-metoxi-2,9-dimetil-1-oxo-9,12-epoxi-1H-diindolo[1,2,3-fg:3',2',1'-kl]pirrolo[3,4-i] [1,6]benzodiazocine-10-carboxílico (KT5823) e leucotrieno B4 foram obtidos da Tocris Biosciences. DAF-FM e DAPI foram obtidos da Molecular Probes. Meios de cultura RPMI-1640 e Müller-Hinton foram obtidos da Gibco. Todos os demais sais e soluções foram obtidos da VETEC ou outras empresas de fornecimento de produtos químicos de qualidade laboratorial.

**3.14. Análise estatística.** Todos os tratamentos estatísticos dos dados e plotagem dos gráficos foram feitos com auxílio do programa GraphPad Prism 4 para Windows. Para análise estatística entre mais de dois grupos foi utilizado análise de variância (ANOVA) com pós-teste de Bonferroni, exceto para os dados de quantificação do número de UFCs, onde foi utilizado o teste de Mann-Whitney. Para comparação entre dois grupos foi utilizado o teste t. As diferenças de sobrevivência entre grupos foram avaliadas utilizando o teste de Fisher. Foram consideradas estatisticamente significativas as diferenças onde  $P < 0,05$ .

## 4. RESULTADOS

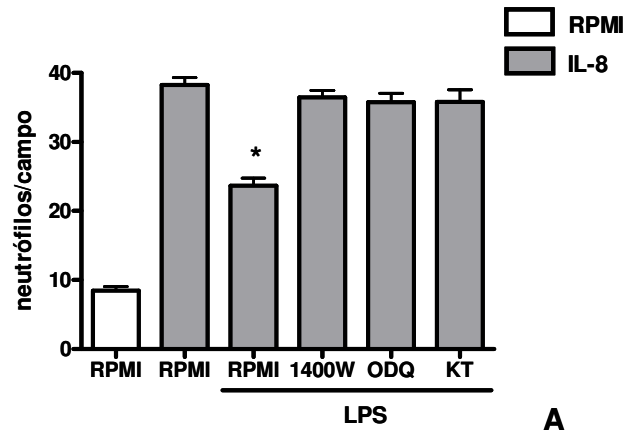
**4.1. Efeito do LPS sobre a resposta quimiotática de neutrófilos humanos *in vitro*.** Para melhor entender os mecanismos moleculares envolvidos no estabelecimento da falência de migração de neutrófilos na sepse, utilizamos um modelo de estimulação *in vitro* de neutrófilos isolados. Neste modelo, neutrófilos isolados de doadores saudáveis foram estimulados com concentrações crescentes de LPS e, em seguida, utilizados em ensaios de quimiotaxia em câmara de Boyden. Como mostrado na Figura 7, a estimulação com LPS levou a uma diminuição da resposta quimiotática dos neutrófilos de maneira concentração-dependente, tendo efeito máximo na concentração de 10 µg/mL. Esta inibição de resposta foi observada quando utilizamos fMLP ou IL-8 como estímulo quimiotático (Figura 7, painéis A e B, respectivamente). Ainda para caracterizar o estado de hiporresponsividade destas células, avaliamos sua capacidade de mobilização do citoesqueleto de actina em resposta ao fMLP após a estimulação com LPS. Como mostrado na Figura 7 (painel C), a estimulação com LPS inibiu a mobilização do citoesqueleto de actina em resposta ao estímulo. Além disso, avaliamos a ativação de cascatas de sinalização envolvendo proteínas tirosina quinases em resposta ao fMLP. Como mostrado na figura, o LPS foi capaz de inibir a ativação de proteínas tirosina quinases em resposta a este estímulo, diminuindo o conteúdo total de tirosina fosforilada nestas células. Tomados em conjunto, estes dados mostram que, no nosso modelo, a ativação de neutrófilos humanos pelo LPS induz um estado de hiporresponsividade a estímulos quimiotáticos clássicos como a IL-8 e o fMLP, sendo portanto um modelo adequado para o estudo das vias envolvidas no estabelecimento da falência de migração de neutrófilos observada na sepse.



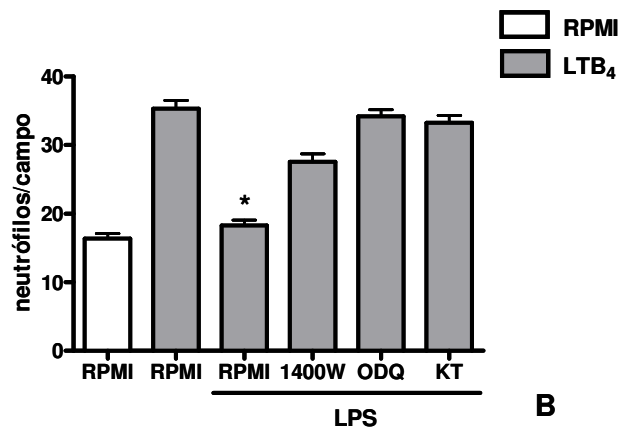
**Figura 7. Efeito do LPS sobre a resposta quimiotática de neutrófilos humanos *in vitro*.** Neutrófilos humanos isolados foram incubados por 1 hora com concentrações crescentes de LPS (0,1 – 10 µg/mL) ou mantidas em meio (RPMI). Em seguida, as células foram utilizadas em ensaio de quimiotaxia em câmara de Boyden para avaliação da resposta quimiotática a IL-8 (30 nM, painel A) ou ao fMLP ( $10^{-6}$  M, painel B). Os dados representam média  $\pm$  E.P.M. do número de neutrófilos por campo em microscopia ótica com aumento de 1000X. \* indica diferença significativa em relação à resposta quimiotática do controle não estimulado com LPS (RPMI). A mobilização do citoesqueleto de actina foi avaliada por citoquímica utilizando faloidina conjugada a rodamina (painel C). Neutrófilos humanos isolados foram incubados com LPS (10 µg/mL) por 1 hora e, em seguida estimulados com fMLP ( $10^{-6}$  M) por 5 minutos ou mantidas em meio (RPMI). O conteúdo de actina polimerizada é identificado pela marcação com faloidina (vermelho). A ativação de proteínas tirosina quinase foi avaliada por imunofluorescência utilizando anticorpos anti-fosfotirosina (painel C). Neutrófilos humanos isolados foram incubados com LPS (10 µg/mL) por 1 hora e, em seguida estimulados com fMLP ( $10^{-6}$  M) por 5 minutos ou mantidas em meio (RPMI). O conteúdo total de fosfotirosina é identificado pela marcação em verde.

**4.2. Participação da via NO-GC-PKG nos efeitos do LPS sobre a quimiotaxia de neutrófilos humanos.** Estudos prévios demonstram uma importante participação do NO derivado da iNOS no estabelecimento da falência de migração de neutrófilos. Utilizando o modelo de estimulação *in vitro* com LPS, avaliamos a participação da via NO-GC-PKG neste processo. Para isso, neutrófilos isolados foram pré-tratados com inibidores farmacológicos para cada um dos componentes da via, antes da estimulação com LPS. Como mostrado na Figura 8, a estimulação com LPS inibiu a resposta quimiotática dos neutrófilos humanos para a IL-8, o LTB<sub>4</sub> e o fMLP (Figura 8, painéis A, B e C, respectivamente). Como esperado, o pré-tratamento dos neutrófilos com 1400W, um inibidor seletivo da iNOS, foi capaz de reverter o efeito do LPS sobre a migração dos neutrófilos (Figura 8). O pré-tratamento das células com o inibidor seletivo da GC, ODQ, foi igualmente capaz de reverter o efeito do LPS, bem como o pré-tratamento com o inibidor seletivo de PKG, KT 5823 (Figura 8). Estes efeitos foram observados para todos os agentes quimiotáticos utilizados.

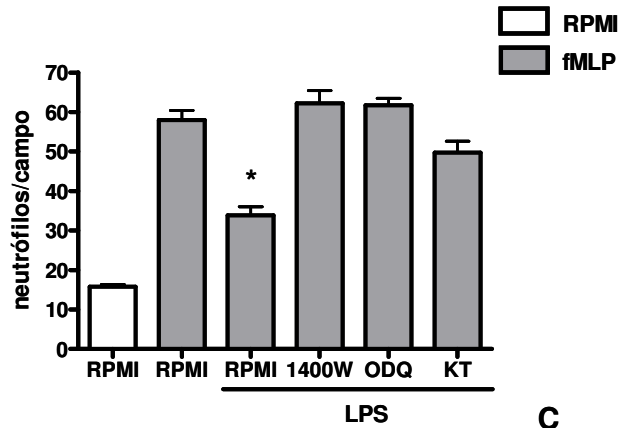
**4.3. Efeito do LTA sobre a resposta quimiotática de neutrófilos humanos e a participação da via NO-GC-PKG.** Recentemente Alves-Filho e colaboradores demonstraram que a ativação de TLR2 por LTA é capaz de inibir a resposta quimiotática de neutrófilos (ALVES-FILHO *et al.*, 2009). No entanto, os mecanismos moleculares envolvidos não foram descritos neste estudo. Desta forma, avaliamos se a inibição da quimiotaxia pela ativação de TLR2 por LTA também envolve a via NO-GC-PKG. Como mostrado na Figura 9, a estimulação de neutrófilos humanos com LTA foi capaz de inibir a resposta quimiotática a LTB<sub>4</sub> e ao fMLP (Figura 9, painéis A e B, respectivamente). O pré-tratamento das células com os inibidores da via NO-GC-PKG



A



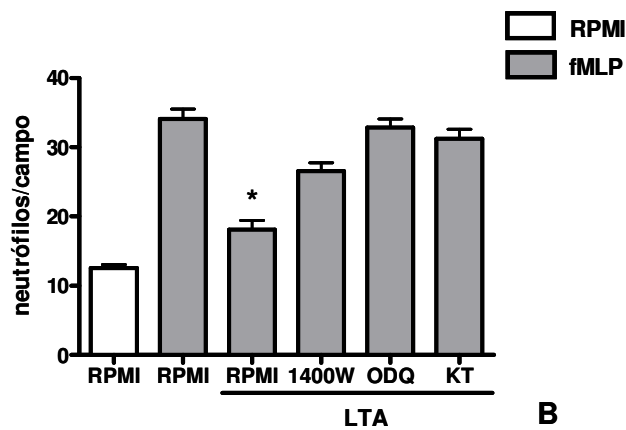
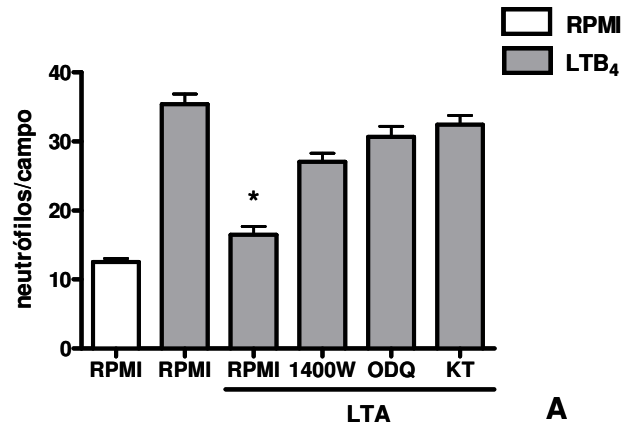
B



C

**Figura 8. Participação da via NO-GC-PKG nos efeitos do LPS sobre a quimiotaxia de neutrófilos humanos.** Neutrófilos humanos isolados foram incubados por 30 minutos com o inibidor seletivo de iNOS, 1400W (30  $\mu$ M), o inibidor seletivo de GC, ODQ (10  $\mu$ M), ou o inibidor seletivo de PKG, KT 5823 (3  $\mu$ M), ou o respectivo veículo (DMSO 0,1%). Em seguida, as células foram incubadas por 1 hora com LPS (10  $\mu$ g/mL) ou mantidas em meio (ctrl). As células foram então utilizadas em ensaio de quimiotaxia em câmara de Boyden para avaliação da resposta quimiotática a IL-8 (30 nM, painel A), ao LTB<sub>4</sub> (10<sup>-7</sup> M, painel B) ou ao fMLP (10<sup>-6</sup> M, painel C). Os dados representam média  $\pm$  E.P.M. do número de neutrófilos por campo em microscopia ótica com aumento de 1000X. \* indica diferença significativa em relação à resposta quimiotática do controle não estimulado com LPS (RPMI).

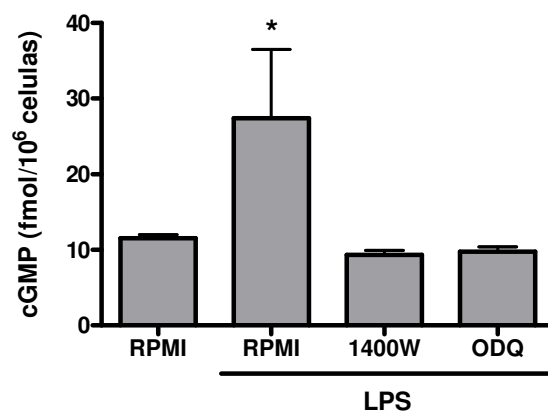




**Figura 9. Efeito do LTA sobre a resposta quimiotática de neutrófilos humanos e a participação da via NO-GC-PKG.** Neutrófilos humanos isolados foram incubados por 30 minutos com o inibidor seletivo de iNOS, 1400W (30  $\mu$ M), o inibidor seletivo de GC, ODQ (10  $\mu$ M), ou o inibidor seletivo de PKG, KT 5823 (3  $\mu$ M), ou o respectivo veículo (DMSO 0,1%). Em seguida, as células foram incubadas por 1 hora com LTA (10  $\mu$ g/mL) ou mantidas em meio (RPMI). As células foram então utilizadas em ensaio de quimiotaxia em câmara de Boyden para avaliação da resposta quimiotática ao LTB<sub>4</sub> (10<sup>-7</sup> M, painel A) ou ao fMLP (10<sup>-6</sup> M, painel B). Os dados representam média  $\pm$  E.P.M. do número de neutrófilos por campo em microscopia ótica com aumento de 1000X. \* indica diferença significativa em relação à resposta quimiotática do controle não estimulado com LPS (RPMI).

foi capaz de reverter os efeitos do LTA sobre a resposta de neutrófilos a ambos os estímulos quimiotáticos.

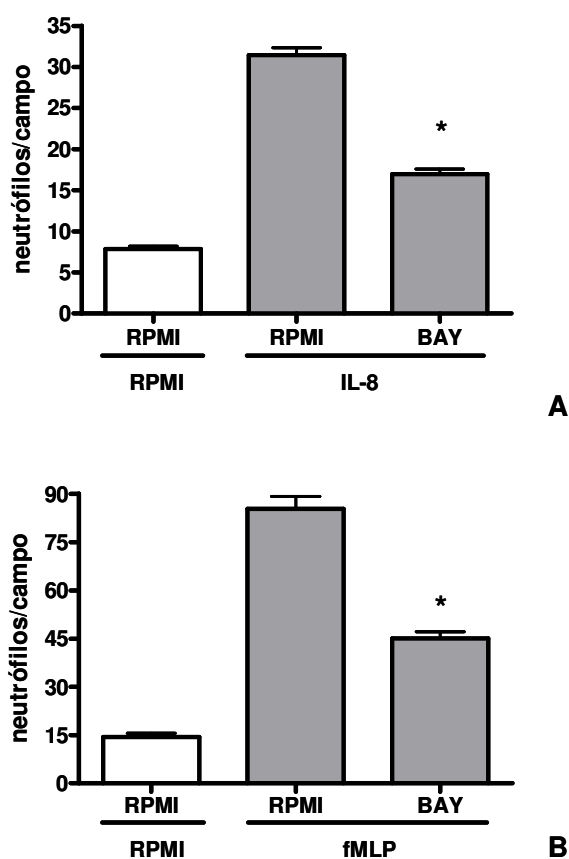
**4.4. Efeito do LPS sobre os níveis intracelulares de GMP cíclico em neutrófilos humanos.** Tendo observado que a estimulação de neutrófilos humanos com LPS inibe a resposta a estímulos quimiotáticos através da ativação da via NO-GC-PKG, avaliamos o impacto da estimulação com LPS sobre os níveis intracelulares de cGMP. Como mostrado na Figura 10, a estimulação de neutrófilos humanos com LPS aumenta o conteúdo intracelular de cGMP. Como esperado, este efeito foi revertido pelo pré-tratamento das células com inibidores seletivos da iNOS (1400W) e da GC (ODQ).



**Figura 10. Efeito do LPS sobre os níveis intracelulares de GMP cíclico em neutrófilos humanos.** Neutrófilos humanos isolados foram incubados por 30 minutos com o inibidor seletivo de iNOS, 1400W (30  $\mu$ M), ou o inibidor seletivo de GC, ODQ (10  $\mu$ M). Em seguida, as células foram incubadas por 1 hora com LPS (10  $\mu$ g/mL) ou mantidas em meio (RPMI). Os níveis intracelulares de cGMP foram determinados por ELISA competitivo a partir do extrato de  $10^6$  células. Os dados representam média  $\pm$  E.P.M. da quantidade de cGMP (em fmol) por  $10^6$  células. \* indica diferença significativa em relação aos controles não estimulados com LPS (RPMI).

**4.5. Efeito da ativação direta da GC sobre a resposta quimiotática de neutrófilos humanos.** Para confirmar o envolvimento da ativação de GC na inibição da migração de

neutrófilos, utilizamos um ativador direto desta enzima, o BAY 41-2272. Assim como o observado para a estimulação com LPS, o BAY foi capaz de inibir a resposta dos neutrófilos a IL-8 e ao fMLP (Figura 11, painéis A e B, respectivamente). Este efeito parece resultar de uma inibição da resposta quimiotática das células e não de um efeito tóxico da molécula, pois não observamos alterações de morfologia nas células incubadas com BAY quando comparadas com as células incubadas apenas com meio ou veículo.



**Figura 11. Efeito da ativação direta da GC sobre a resposta quimiotática de neutrófilos humanos.** Neutrófilos humanos isolados foram incubados por 1 hora com BAY 41-2272 (30  $\mu$ M) ou mantidas em meio (RPMI). As células foram então utilizadas em ensaio de quimiotaxia em câmara de Boyden para avaliação da resposta quimiotática a IL-8 (30 nM, painel A) ou ao fMLP ( $10^{-6}$  M, painel B). Os dados representam média  $\pm$  E.P.M. do número de neutrófilos por campo em microscopia ótica com aumento de 1000X. \* indica diferença significativa em relação à resposta quimiotática do controle não tratado com BAY (RPMI).

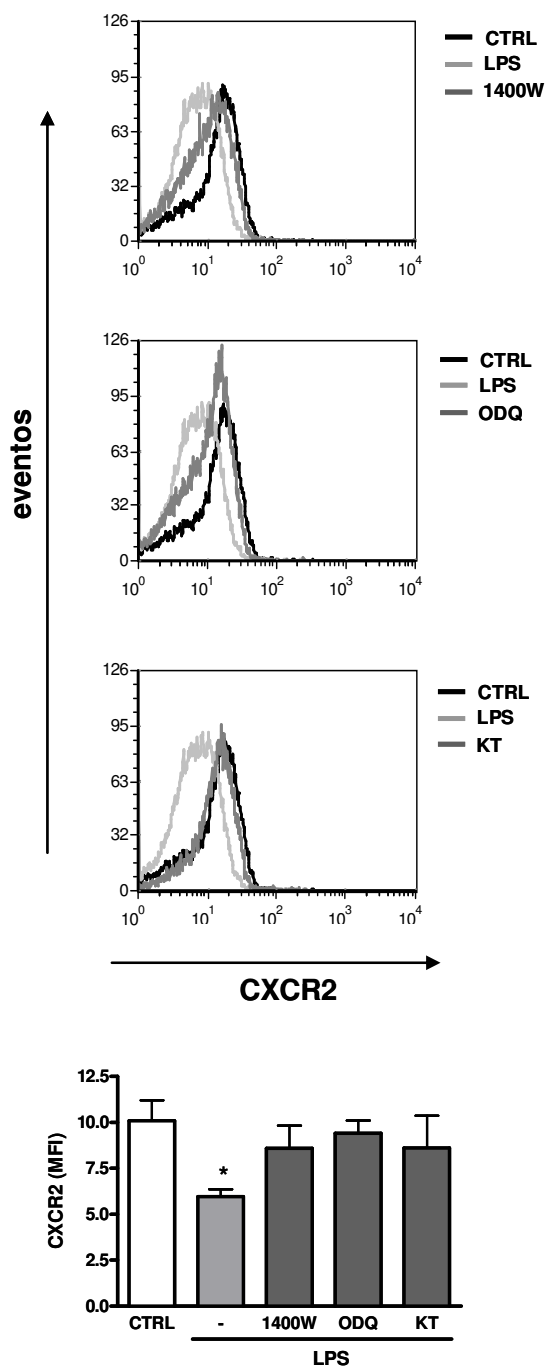
**4.6. Efeito do LPS sobre a expressão de CXCR2 em neutrófilos humanos.** A inibição da resposta quimiotática de neutrófilos pelo estímulo com LPS pode ser resultado da internalização dos receptores. De fato, estudos anteriores documentam a internalização do receptor de IL-8, CXCR2, em neutrófilos após o tratamento com LPS (KHANDAKER *et al.*, 1998; FAN & MALIK, 2003; VAN DEN BLINK *et al.*, 2004). No entanto, o envolvimento da via NO-GC-PKG neste processo não foi estudado. Avaliamos, portanto, o efeito do LPS sobre a expressão do CXCR2 em neutrófilos. Através de ensaio de citometria de fluxo, observamos uma significativa inibição da expressão de CXCR2 em neutrófilos estimulados com LPS (Figura 12). Este efeito foi revertido pelo pré-tratamento das células com os inibidores da via NO-GC-PKG (Figura 12).

**4.7. Efeito do LPS sobre a expressão de BLT1 em neutrófilos humanos.** Como também observamos uma inibição da resposta dos neutrófilos ao LTB<sub>4</sub>, avaliamos se a estimulação com LPS também seria capaz de levar a uma diminuição da expressão do receptor de LTB<sub>4</sub>, o BLT1. Como observado para o CXCR2, a estimulação de neutrófilos com LPS levou a uma diminuição na expressão de BLT1 (Figura 13). Este efeito, mais uma vez, foi revertido pelo pré-tratamento das células com os inibidores da via NO-GC-PKG.

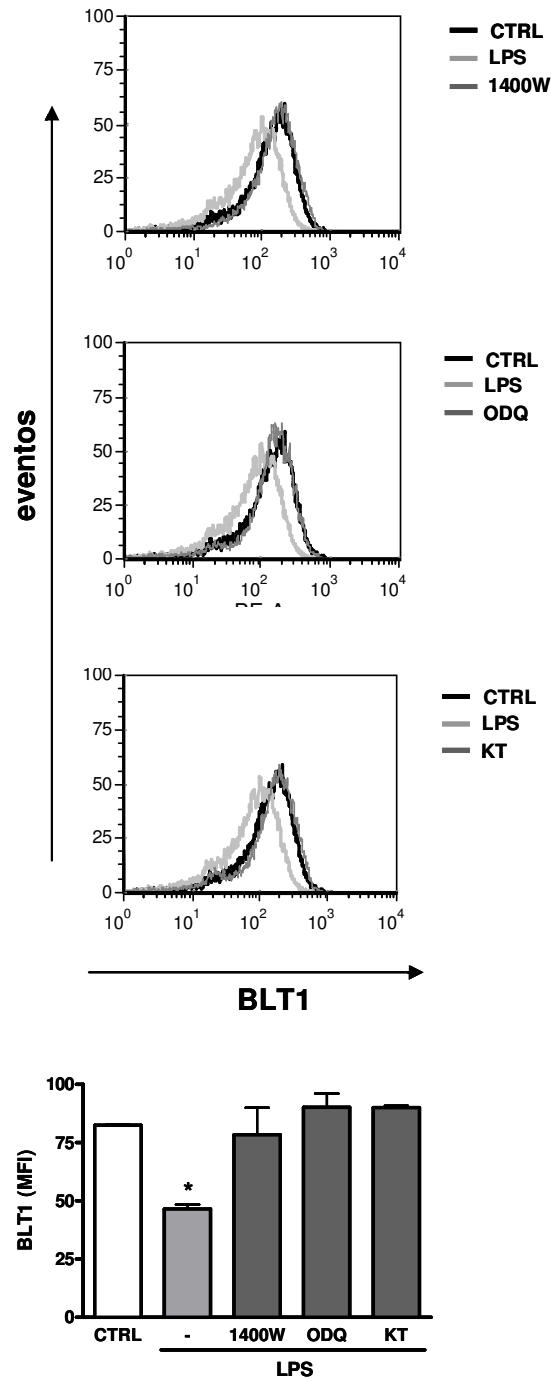
**4.8. Efeito do LPS sobre a expressão de FPRL-1 em neutrófilos humanos.** Tendo em vista os efeitos do LPS sobre a expressão de CXCR2 e BLT1, e tendo observado a inibição da resposta de neutrófilos ao fMLP após a estimulação com LPS, avaliamos a expressão do receptor de fMLP, FPRL-1, nestas células. Como mostrado na Figura 14, a estimulação com LPS não alterou a expressão deste receptor, sendo observados níveis

similares do receptor nas células estimuladas com LPS e nas células controle. Ensaios paralelos foram realizados para avaliar a expressão de CXCR2 nestas mesmas células e descartar a possibilidade de baixa atividade na preparação de LPS. Como pode ser observado no insert da Figura 14, o LPS foi capaz de internalizar o CXCR2 (como descrito anteriormente), embora não afetasse a expressão do FPRL-1.

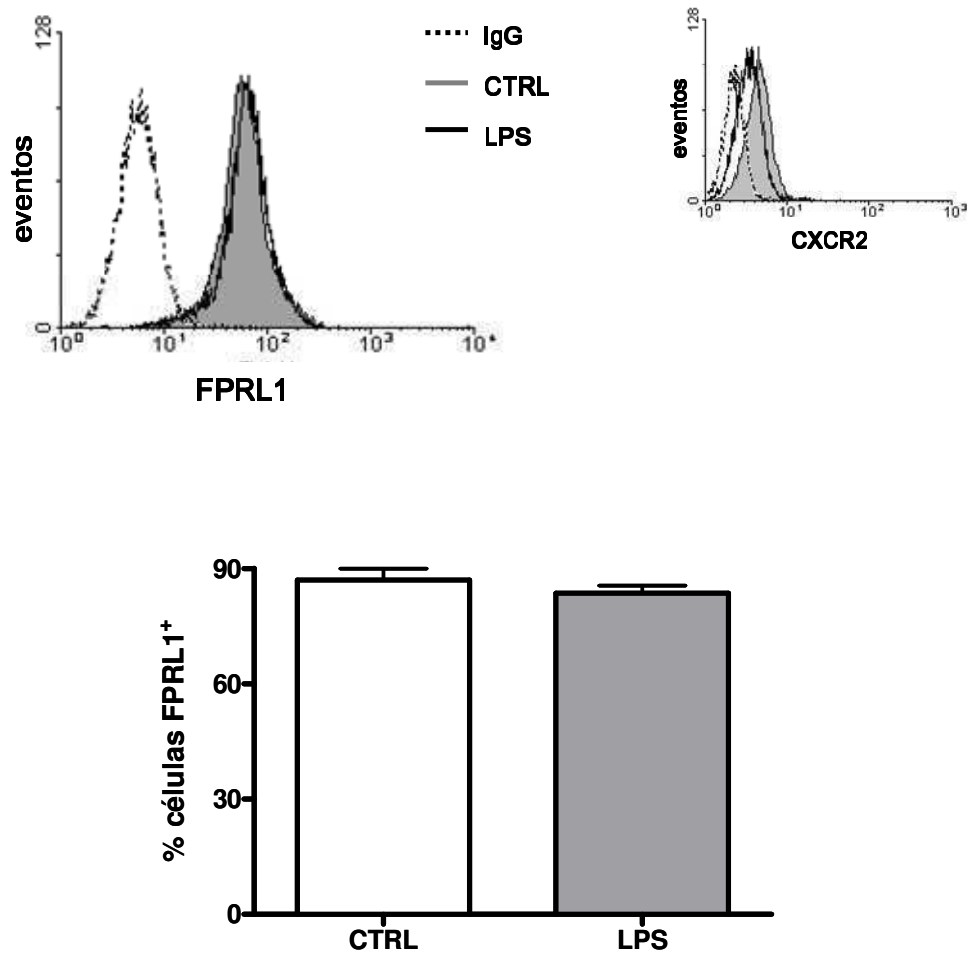
**4.9. Efeito do LPS sobre a expressão de GRK2 em neutrófilos humanos.** A internalização de CXCR2 e BLT1 observada em neutrófilos estimulados com LPS pode resultar de um aumento na expressão de GRK nestas células. De fato, estudos anteriores do nosso grupo e de outros mostram que a estimulação de neutrófilos com LPS é capaz de aumentar a expressão de GRK2 em neutrófilos (ALVES-FILHO *et al.*, 2009; FAN & MALIK, 2003). Além disso, recentemente demonstramos que neutrófilos isolados de pacientes com sepse apresentavam maior expressão de GRK2 e GRK5 em relação a neutrófilos isolados de doadores saudáveis (ARRAES *et al.*, 2006). Neste sentido, avaliamos a expressão de GRK2 em neutrófilos humanos estimulados com LPS. Utilizando duas diferentes técnicas, imunofluorescência e westernblotting, observamos um significativo aumento da expressão de GRK2 em neutrófilos estimulados com LPS (Figura 15). Este efeito do LPS foi revertido pelo pré-tratamento das células com os inibidores da via NO-GC-PKG.



**Figura 12.** Efeito do LPS sobre a expressão de CXCR2 em neutrófilos humanos. Neutrófilos humanos isolados foram incubados por 30 minutos com o inibidor seletivo de iNOS, 1400W (30  $\mu$ M), o inibidor seletivo de GC, ODQ (10  $\mu$ M), ou o inibidor seletivo de PKG, KT 5823 (3  $\mu$ M), ou o respectivo veículo (DMSO 0,1%). Em seguida, as células foram incubadas por 1 hora com LPS (10  $\mu$ g/mL) ou mantidas em meio (RPMI). As células foram analisadas por citometria de fluxo para avaliar a expressão do receptor de IL-8, CXCR2. Os histogramas são derivados de um experimento representativo de 4 experimentos independentes, e mostram o efeito do tratamento com 1400W (superior), ODQ (intermediário), ou KT (inferior) sobre a internalização de CXCR2 induzida por LPS. O gráfico representa média  $\pm$  E.P.M. da intensidade média de fluorescência (mean fluorescence intensity, MFI) observado em cada um dos grupos. \* indica diferença significativa em relação à expressão de CXCR2 do controle não estimulado com LPS (RPMI).

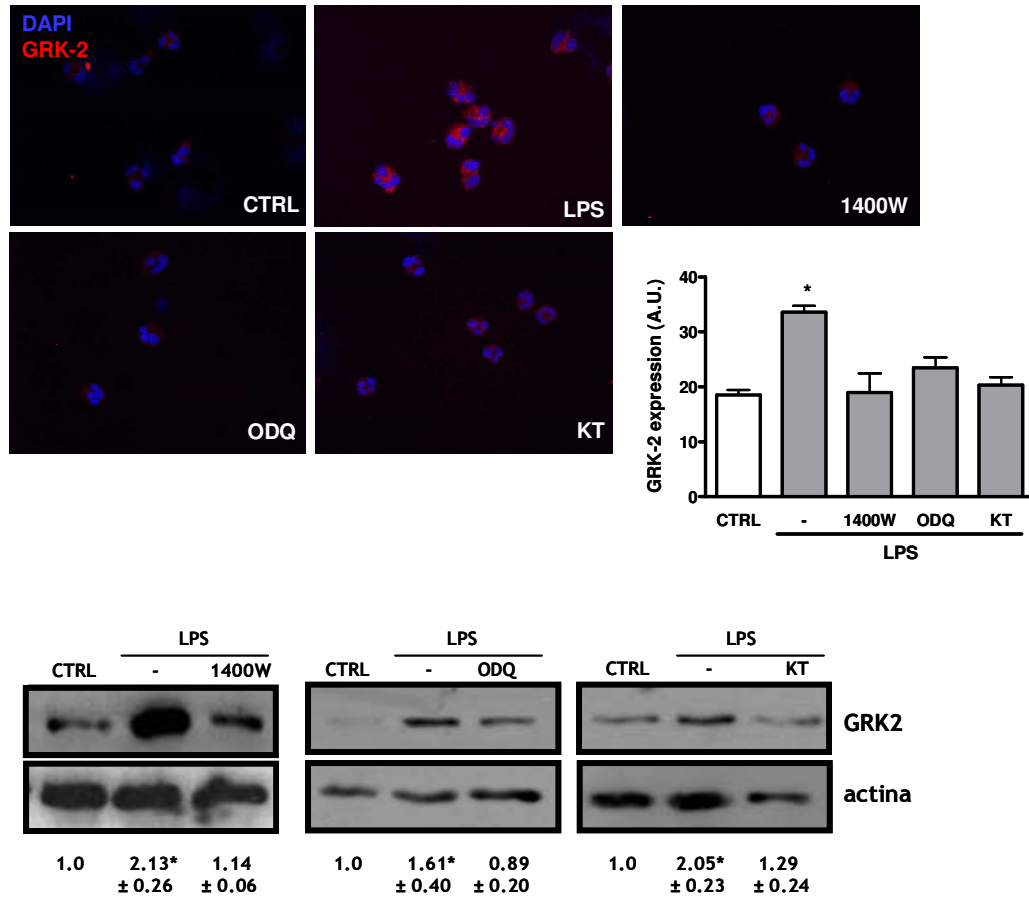


**Figura 13. Efeito do LPS sobre a expressão de BLT1 em neutrófilos humanos.** Neutrófilos humanos isolados foram incubados por 30 minutos com o inibidor seletivo de iNOS, 1400W (30  $\mu$ M), o inibidor seletivo de GC, ODQ (10  $\mu$ M), ou o inibidor seletivo de PKG, KT 5823 (3  $\mu$ M), ou o respectivo veículo (DMSO 0,1%). Em seguida, as células foram incubadas por 1 hora com LPS (10  $\mu$ g/mL) ou mantidas em meio (RPMI). As células foram analisadas por citometria de fluxo para avaliar a expressão do receptor de LTB<sub>4</sub>, BLT1. Os histogramas são derivados de um experimento representativo de 4 experimentos independentes, e mostram o efeito do tratamento com 1400W (superior), ODQ (intermediário), ou KT (inferior) sobre a internalização de BLT1 induzida por LPS. O gráfico representa média  $\pm$  E.P.M. da intensidade média de fluorescência (mean fluorescence intensity, MFI) observado em cada um dos grupos. \* indica diferença significativa em relação à expressão de BLT1 do controle não estimulado com LPS (RPMI).



**Figura 14. Efeito do LPS sobre a expressão de FPRL-1 em neutrófilos humanos.** Neutrófilos humanos isolados foram incubados por 1 hora com LPS (10  $\mu$ g/mL) ou mantidos em meio (RPMI). As células foram analisadas por citometria de fluxo para avaliar a expressão do receptor de fMLP, FPRL-1. O histograma é derivado de um experimento representativo de 4 experimentos independentes, e mostra o efeito do LPS sobre a expressão de FPRL-1 em neutrófilos. O gráfico representa média  $\pm$  E.P.M. da proporção de células FPRL-1 positivas observadas em cada um dos grupos. O insert mostra um experimento paralelo onde o efeito do LPS foi testado através da sua capacidade de internalização do CXCR2.

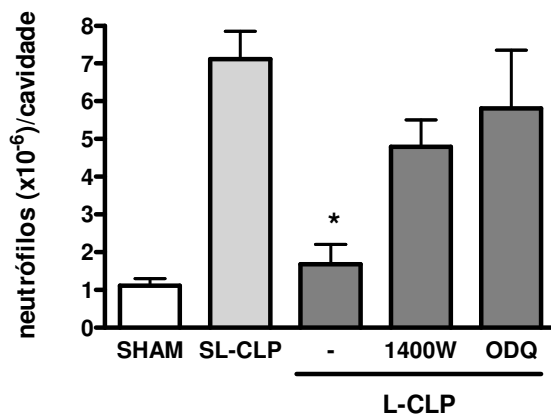




**Figura 15. Efeito do LPS sobre a expressão de GRK2 em neutrófilos humanos.** Neutrófilos humanos isolados foram incubados por 30 minutos com o inibidor seletivo de iNOS, 1400W (30  $\mu$ M), o inibidor seletivo de GC, ODQ (10  $\mu$ M), ou o inibidor seletivo de PKG, KT 5823 (3  $\mu$ M), ou o respectivo veículo (DMSO 0,1%). Em seguida, as células foram incubadas por 1 hora com LPS (10  $\mu$ g/mL) ou mantidas em meio (RPMI). As células foram analisadas por imunofluorescência (painel superior) ou westernblotting (painel inferior) para avaliar a expressão de GRK2. (Painel superior) As imagens são derivadas de um experimento representativo de 3 experimentos independentes, e mostram o efeito do tratamento com 1400W, ODQ, ou KT sobre a expressão de GRK2 induzida por LPS. A marcação em vermelho corresponde à expressão de GRK2 e a marcação em azul, os núcleos celulares marcados com DAPI. O gráfico representa média  $\pm$  E.P.M. da intensidade de fluorescência vermelha (expressão de GRK2) observada em cada um dos grupos. \* indica diferença significativa em relação ao grupo controle não estimulado com LPS. (Painel inferior) As imagens são derivadas de um experimento representativo de 3 experimentos independentes, e mostram o efeito do tratamento com 1400W (esquerda), ODQ (meio), ou KT (direita) sobre a expressão de GRK2 induzida por LPS. A expressão de actina foi utilizada como controle de carregamento. Os números representam média  $\pm$  E.P.M. da expressão relativa de GRK2 quando a expressão no estado não estimulado foi considerada 1. \* indica diferença significativa em relação ao grupo controle não estimulado com LPS.

**4.10. Efeito da inibição da atividade de GC sobre a função migratória de neutrófilos em um modelo experimental de sepse.** Tendo demonstrado o envolvimento da via NO-GC-PKG no estabelecimento da inibição da migração de neutrófilos, avaliamos se a ativação desta via estaria ocorrendo in vivo. Utilizando um modelo experimental de sepse, avaliamos o efeito do tratamento dos animais com o inibidor seletivo de GC, ODQ, sobre a migração de neutrófilos. Animais submetidos ao modelo de CLP subletal (SL-CLP) desenvolvem uma peritonite branda, com intensa migração de neutrófilos para a cavidade 6 horas após o procedimento (Figura 16). Por outro lado, animais submetidos ao modelo de CLP letal apresentam falência da migração de neutrófilos, representada por número reduzido de neutrófilos presentes na cavidade peritoneal (Figura 16). Em concordância com estudos anteriores do grupo, o tratamento dos animais com o inibidor seletivo da iNOS, 1400W, recuperou a capacidade migratória dos neutrófilos nos animais submetidos ao CLP letal (Figura 16). Da mesma forma, e em concordância com nossos dados in vitro, o tratamento dos animais com o inibidor seletivo da GC, ODQ, foi capaz de restaurar a migração de neutrófilos para o peritônio de animais submetidos ao CLP letal (Figura 16). Estes dados sugerem que a via NO-GC-PKG está envolvida no estabelecimento da falência da migração de neutrófilos e que esta via é ativada in vivo durante o episódio de sepse.

**4.11. Efeito da inibição da atividade de GC sobre o controle da infecção em um modelo experimental de sepse.** Estudos anteriores do nosso grupo mostram que a utilização de inibidores da síntese de NO na sepse é limitado, pelo menos em parte, por interferir com a capacidade de controle da infecção (BENJAMIM *et al.*, 2002). Neste sentido, avaliamos o efeito do tratamento com ODQ sobre o controle da infecção bacteriana no modelo de CLP. Animais submetidos ao CLP sub-letal não apresentaram

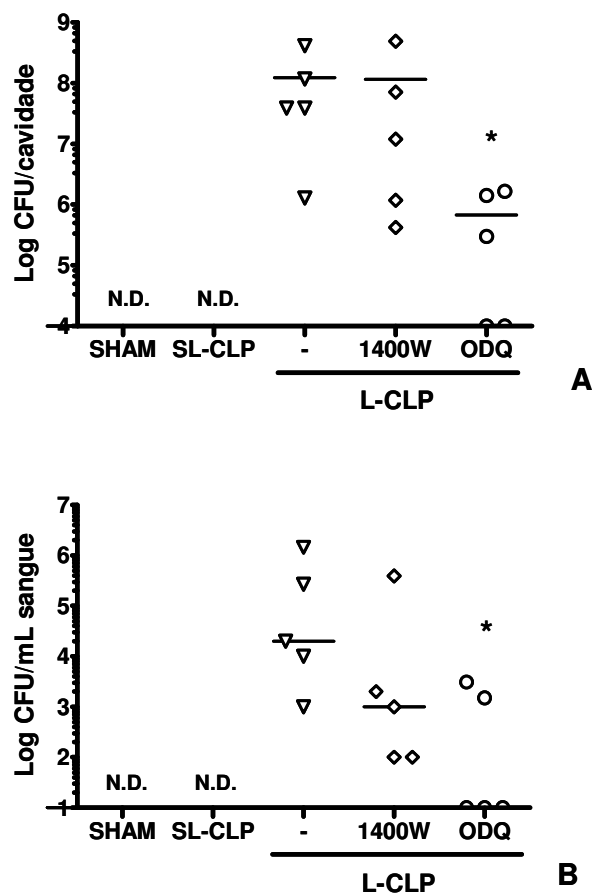


**Figura 16. Efeito da inibição da atividade de GC sobre a função migratória de neutrófilos em um modelo experimental de sepse.** Quantificação do número de neutrófilos recuperados da cavidade peritoneal 6 horas após o procedimento de ligação e perfuração do ceco (CLP). O gráfico representa a média  $\pm$  E.P.M. do número de neutrófilos por cavidade em animais submetidos à sepse subletal (SL-CLP), à sepse letal (L-CLP), ou à sepse letal após tratamento com 1400W ou ODQ. Nos grupos tratados, os animais receberam uma dose de 1400W (3 mg/Kg) ou ODQ (5  $\mu$ mol/Kg), por via subcutânea, 30 minutos antes do CLP. \* indica diferença significativa em relação aos animais submetidos ao SL-CLP. N = 8 para cada grupo.

número apreciável de UFCs na cavidade peritoneal e no sangue, condizente com o estabelecimento de uma infecção branda e controlada pelo influxo de neutrófilos para a cavidade (Figura 17, painéis A e B). Animais submetidos ao CLP letal, por outro lado, apresentaram número elevado de UFCs na cavidade peritoneal e significativo número de UFCs no sangue, caracterizando uma infecção severa sistêmica cujo controle parece ser prejudicado pelo número reduzido de neutrófilos na cavidade (Figura 17, painéis A e B). A inibição da iNOS pelo tratamento dos animais com 1400W, embora capaz de recuperar a migração de neutrófilos para a cavidade, não teve efeito significativo sobre o controle da infecção (Figura 17, painéis A e B). Os animais tratados com 1400W apresentaram contagens de UFCs no lavado peritoneal e sangue similares aos observados para o grupo controle não tratado, a despeito de apresentarem número significativamente maior de neutrófilos na cavidade. Este resultado é bastante similar ao

reportado anteriormente por Benjamim e colaboradores (BENJAMIM *et al.*, 2002), e sugere uma explicação para a limitação do uso de inibidores da síntese de NO na sepse que seria a interferência com a capacidade dos neutrófilos de eliminar bactérias e controlar o foco primário de infecção. Interessantemente, o tratamento dos animais com ODQ teve significativo impacto sobre o controle da infecção. Animais tratados com ODQ apresentaram contagens significativamente menores de UFCs no lavado peritoneal quando comparados com o grupo controle não tratado ou o grupo tratado com 1400W (Figura 17, painel A). Além disso, não fomos capazes de detectar UFCs no sangue de três dos cinco animais estudados, sugerindo um eficiente controle do foco primário de infecção (Figura 17, painel B).

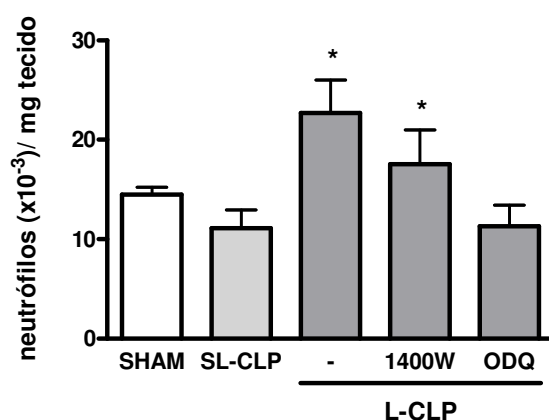
***4.12. Efeito da inibição da atividade de GC sobre o seqüestro pulmonar de neutrófilos em um modelo experimental de sepse.*** A lesão pulmonar decorrente da sepse contribui para a falência respiratória e é geralmente atribuída ao seqüestro de neutrófilos ativados e a liberação de enzimas e radicais citotóxicos no parênquima pulmonar (SATO *et al.*, 1998; CZERMAK *et al.*, 1999). Procuramos avaliar o impacto da inibição da atividade de GC sobre o seqüestro de neutrófilos no tecido pulmonar. Como esperado, animais submetidos ao CLP letal apresentaram elevada atividade de MPO no tecido pulmonar, sugestivo de intenso seqüestro de neutrófilos (Figura 18). O tratamento dos animais com 1400W teve um pequeno impacto sobre o seqüestro de neutrófilos para o pulmão (Figura 18). Por outro lado, o tratamento com ODQ reduziu a atividade de MPO no tecido pulmonar para níveis similares aos observados no grupo controle não submetido ao CLP ou aos observados em animais submetidos à CLP branda ou animais controle (Figura 18).



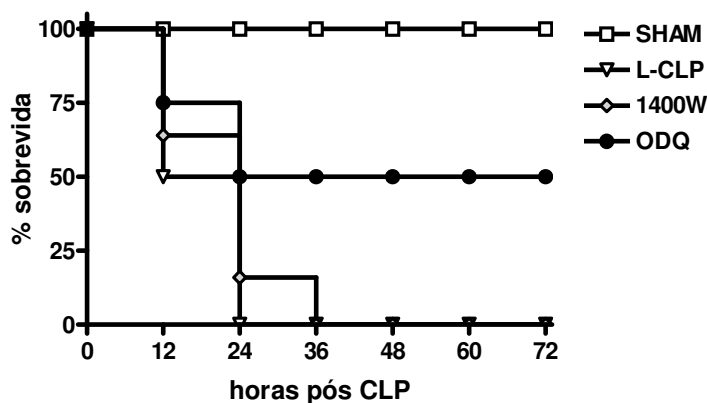
**Figura 17. Efeito da inibição da atividade de GC sobre o controle da infecção em um modelo experimental de sepse.** Quantificação do número de unidades formadoras de colônia (UFCs) de bactérias na cavidade peritoneal (painel A) ou no sangue (painel B) 6 horas após o procedimento de ligação e perfuração do ceco (CLP). Os gráficos representam o logaritmo do número de UFCs e a linha demarca a mediana do número de UFCs na cavidade (A) ou sangue (B) de animais submetidos à sepse subletal (SL-CLP), à sepse letal (L-CLP), ou à sepse letal após tratamento com 1400W ou ODQ. Nos grupos tratados, os animais receberam uma dose de 1400W (3 mg/Kg) ou ODQ (5  $\mu$ mol/Kg), por via subcutânea, 30 minutos antes do CLP. \* indica diferença significativa em relação aos animais submetidos ao SL-CLP. N = 5 para cada grupo. N.D.: não detectado.

**4.13. Efeito do pré-tratamento com inibidor da atividade de GC na sobrevivência de animais submetidos a um modelo experimental de sepse.** Tendo em vista a recuperação da capacidade migratória de neutrófilos e um melhor controle da infecção em animais tratados com o inibidor da GC, avaliamos o impacto deste tratamento na sobrevivência dos

animais submetidos ao CLP. Como mostrado na Figura 19, animais submetidos ao CLP letal sucumbiram à infecção dentro de 24 horas. Os animais pré-tratados com 1400W não apresentaram melhora na sobrevivência, apresentando 100% de mortalidade em 36 horas ( $P= 0.5288$ , relativo aos animais não tratados, Figura 19). Por outro lado, os animais pré-tratados com ODQ apresentaram aumento significativo na sobrevivência ( $P= 0.0154$ , relativo ao grupo não tratado), com 50% de sobrevivência ao longo de todo o período de observação (Figura 19).



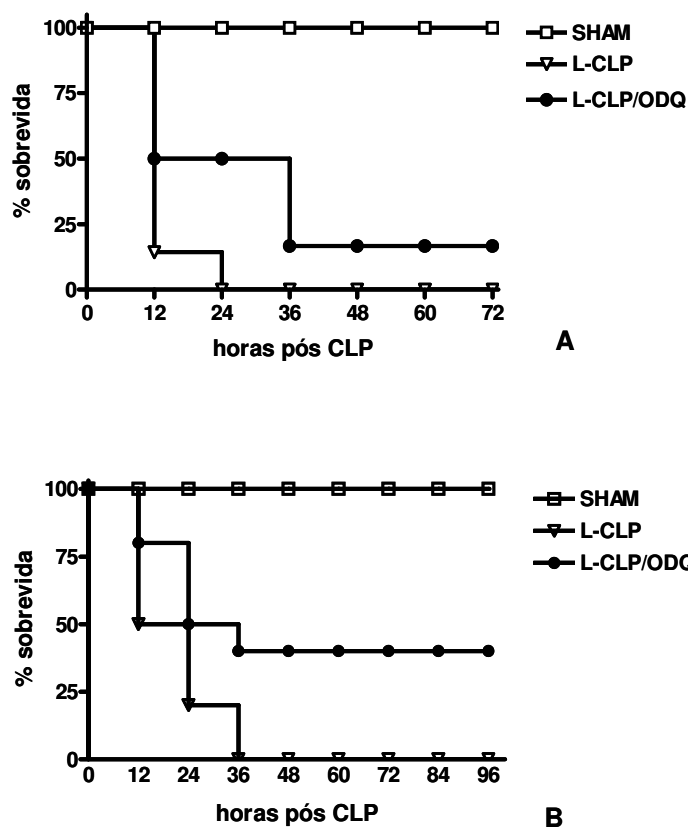
**Figura 18.** Efeito da inibição da atividade de GC sobre o sequestro pulmonar de neutrófilos em um modelo experimental de sepse. Quantificação indireta do número de neutrófilos no tecido pulmonar através do ensaio de atividade de mieloperoxidase. A atividade de MPO no tecido pulmonar foi avaliada 6 horas após o procedimento de ligação e perfuração do ceco (CLP). O gráfico representa a média  $\pm$  E.P.M. do número de neutrófilos por mg de tecido pulmonar, calculado a partir da atividade de MPO em extratos de pulmão obtidos de animais submetidos à sepse subletal (SL-CLP), à sepse letal (L-CLP), ou à sepse letal após tratamento com 1400W ou ODQ. Nos grupos tratados, os animais receberam uma dose de 1400W (3 mg/Kg) ou ODQ (5  $\mu$ mol/Kg), por via subcutânea, 30 minutos antes do CLP. \* indica diferença significativa em relação aos animais submetidos ao SL-CLP. N = 5 para cada grupo.



**Figura 19.** Efeito do pré-tratamento com inibidor da atividade de GC na sobrevivência de animais submetidos a um modelo experimental de sepse. Animais foram tratados com 1400W (3 mg/Kg), ODQ (5  $\mu$ mol/Kg) ou veículo (DMSO 1%, L-CLP), por via subcutânea, 30 minutos antes de serem submetidos ao CLP letal. A sobrevivência dos animais foi monitorada por um período de 72 horas. Animais submetidos ao procedimento cirúrgico, mas que não tiveram o ceco ligado nem perfurado foram utilizados como controles (SHAM). N = 7 para cada grupo.

**4.14. Efeito do pós-tratamento com inibidor da atividade de GC na sobrevivência de animais submetidos a um modelo experimental de sepse.** Avaliamos por fim o impacto da inibição da atividade de GC em um modelo que melhor mimetiza o contexto clínico da sepse. Neste modelo, animais submetidos ao CLP letal foram tratados com ODQ após o estabelecimento da infecção. Em um primeiro protocolo de, os animais foram tratados com duas doses de ODQ, 3 e 12 horas após o procedimento de CLP. Neste protocolo, após 24 horas do procedimento, os animais tratados apresentaram 50% de sobrevivência enquanto que, neste mesmo período, os animais não tratados apresentaram 100% de mortalidade (Figura 20, painel A). Nas 24 horas seguintes, a sobrevivência dos animais tratados com ODQ declinou para 16,7%, não atingindo significância estatística ( $P= 0.1461$ , relativo ao grupo controle não tratado, Figura 20). Decidimos então usar um

segundo protocolo onde os animais foram tratados com uma terceira dose de ODQ em 24 horas (total de 3 doses, em 3, 12 e 24 horas após o procedimento) (Figura 20, painel B). Neste protocolo, o grupo não tratado apresentou 100% de mortalidade dentro de 36 horas, enquanto que a sobrevivência dos animais tratados foi mantida em 40% ao longo de todo o período de observação (96 horas), sendo significativamente maior ( $P= 0.0325$ , em relação ao grupo controle não tratado) (Figura 20, painel B).



**Figura 20.** Efeito do pós-tratamento com inibidor da atividade de GC na sobrevivência de animais submetidos a um modelo experimental de sepse. (Painel A) Animais foram tratados com 1400W (3 mg/Kg), ODQ (5  $\mu$ mol/Kg) ou veículo (DMSO 1%, L-CLP), em duas doses subcutâneas, 3 e 12 horas após serem submetidos ao CLP letal – protocolo I.  $N = 7$  para cada grupo. (Painel B) Animais foram tratados com 1400W (3 mg/Kg), ODQ (5  $\mu$ mol/Kg) ou veículo (DMSO 1%, L-CLP), em três doses subcutâneas, 3, 12 e 24 horas após serem submetidos ao CLP letal – protocolo II. A sobrevivência destes animais foi monitorada por um período de 72 a 96 horas. Animais submetidos ao procedimento cirúrgico, mas que não tiveram o ceco ligado nem perfurado foram utilizados como controles (SHAM).  $N = 10$  para cada grupo.



## 5. DISCUSSÃO

### 5.1. Resultados in vitro

No presente estudo avaliamos as vias de sinalização envolvidas no estabelecimento da disfunção de migração de neutrófilos na sepse. Estudos anteriores de nosso grupo e outros descrevem uma inabilidade dos neutrófilos em responder a estímulos quimiotáticos durante a sepse (ALVES-FILHO *et al.*, 2008; REDDY & STANDIFORD, 2010). Parte destes estudos demonstra também a participação do NO neste fenômeno (ALVES-FILHO *et al.*, 2008; REDDY & STANDIFORD, 2010). No entanto, as vias de sinalização disparadas pelo NO em neutrófilos e que contribuem para o estabelecimento deste estado ainda não foram descritas. Mais especificamente, a participação da via GC-cGMP-PKG, a via clássica de sinalização do NO, neste processo nunca foi demonstrada.

Usando um sistema de estimulação in vitro de neutrófilos humanos com ligantes de TLR pudemos descrever a participação da via NO-GC-PKG na falência da migração de neutrófilos. Observamos que os neutrófilos incubados in vitro com LPS (um ligante de TLR4) ou LTA (um ligante de TLR2) apresentavam uma sensível diminuição da sua capacidade migratória in vitro. A inibição farmacológica da iNOS neste sistema foi capaz de bloquear os efeitos do LPS, de acordo com as observações feitas com neutrófilos isolados de pacientes. Desta forma, entendemos que nosso modelo, embora simplista, guarda similaridades com o quadro observado na sepse, pelo menos no que tange a desregulação da função de neutrófilos.

Neste sistema utilizamos ainda inibidores farmacológicos da GC e da PKG, os efetores finais da via de sinalização do NO. De forma similar ao inibidor da iNOS, estes

inibidores foram capazes de reverter os efeitos do LPS e do LTA sobre a capacidade migratória dos neutrófilos. Em concordância, a ativação direta da enzima GC foi capaz de mimetizar os efeitos do LPS e do LTA. Além disso, mostramos que a estimulação de neutrófilos com LPS é capaz de aumentar os níveis intracelulares de cGMP, em um processo dependente da ativação da iNOS e da GC. Estes dados sugerem fortemente a participação da via NO-GC-PKG no estabelecimento da falência da migração de neutrófilos.

Nossos resultados sugerem também que a ativação da via NO-GC-PKG é um evento comum a pelo menos dois diferentes receptores do tipo Toll (TLR4 e TLR2). A similaridade de efeitos para ligantes de TLR2 e TLR4 sugere o envolvimento da via MyD88 neste fenômeno. O TLR2 sinaliza exclusivamente via MyD88 enquanto que o TLR4 sinaliza por vias dependentes e independentes de MyD88 (BEUTLER, 2009). No entanto, estudos sugerem que a via TLR4 independente de MyD88 é inativa em neutrófilos (TAMASSIA *et al.*, 2007), reforçando a idéia do envolvimento de MyD88 na modulação da quimiotaxia de neutrófilos. Outra evidência para o envolvimento desta via é que a ativação de MyD88 por ligantes de TLR resulta na ativação de NF- $\kappa$ B, um fator de transcrição envolvido na regulação da expressão de iNOS (LOWENSTEIN *et al.*, 1993; LIM *et al.*, 2004). As vias de sinalização anteriores à ativação da iNOS neste modelo ainda não foram descritas e devem ser alvo de futuros estudos.

Recentemente, Clements e colaboradores demonstraram que a nitratação de actina pelo NO tornaria os neutrófilos incapazes de migrar (CLEMENTS *et al.*, 2003). Esta modificação tornaria o citoesqueleto inflexível e prejudicaria o rearranjo dinâmico necessário para o processo de migração. Estes dados contrastam com os nossos, pois atribuímos os efeitos do NO à ativação da via GC-cGMP-PKG e não a modificações químicas de proteínas celulares. No entanto, Clements e colaboradores utilizaram neste

estudo moléculas doadoras de NO (CLEMENTS *et al.*, 2003), o que pode gerar concentrações de NO que não refletem aquelas encontradas em circunstâncias fisiopatológicas. Além disso, as modificações estruturais sugeridas neste estudo implicariam em uma inibição geral da resposta migratória de neutrófilos, o que não é compatível com os dados da literatura. Estudos mostram que neutrófilos isolados de animais sépticos não se tornam incapazes de migrar, mas sim apresentam uma alteração no seu perfil de resposta migratória (SPEYER *et al.*, 2004). Estas células ganham responsividade a novos ligantes, como ligantes de CCR2 (MCP-1 e MIP-1 $\alpha$ ). Observações similares foram feitas por nosso grupo com neutrófilos de pacientes com sepse ou neutrófilos humanos isolados, estimulados *in vitro* com LPS (SOUTO *et al.*, submetido).

Aprofundando nosso estudo, observamos que a estimulação de neutrófilos com LPS resulta na diminuição da expressão de receptores para fatores quimiotáticos como o CXCR2 (receptor de IL-8) e o BLT1 (receptor de LTB<sub>4</sub>). Este fenômeno poderia explicar a menor capacidade de resposta dos neutrófilos a estes agonistas. Em adição, observamos um aumento na expressão de GRK2 em neutrófilos estimulados com LPS. Sendo GRK2 uma enzima capaz de fosforilar GPRCs e sendo o CXCR2 um alvo descrito para esta enzima (FAN & MAILK, 2003; VROON *et al.*, 2006), podemos sugerir que o aumento da expressão de GRK2 é um mecanismo responsável pela internalização de receptores nestas células. Observamos também que a ambos os eventos – internalização de receptores e expressão de GRK2 – dependem da ativação da via NO-GC-PKG, sugerindo fortemente a interdependência destes processos. Não podemos excluir ainda a participação de outras isoformas, como a GRK5 (que já mostramos estar mais expressa em neutrófilos de pacientes com sepse, ARRAES *et al.*, 2006) e GRK6, a isoforma envolvida na regulação da expressão do receptor de LTB<sub>4</sub>

em neutrófilos (KAVELAARS *et al.*, 2003). No entanto, a expressão destas isoformas e sua possível regulação pela via TLR4-NO-GC-PKG não foi estudada.

Observações similares sobre a regulação da expressão de GRK2 e da internalização de receptores pelo LPS em neutrófilos já foram reportadas na literatura (KHANDAKER *et al.*, 1998; FAN & MALIK, 2003; VAN DEN BLINK *et al.*, 2004). Estes estudos sugerem a participação de um mecanismo dependente de tirosina quinase, da ativação de p38 e de síntese protéica, que culmina na internalização de CXCR2 e CXCR1 em neutrófilos estimulados com LPS. Dados anteriores do nosso grupo confirmam a participação de síntese protéica neste fenômeno, pois o tratamento de neutrófilos com ciclohexemida foi capaz de reverter os efeitos do LTA sobre a migração de neutrófilos (ALVES-FILHO *et al.*, 2009). A dependência de síntese protéica para a internalização dos receptores abre o questionamento da dinâmica do processo que estamos descrevendo. Síntese protéica em eucariotos é um evento celular relativamente lento e que geralmente demanda horas para ocorrer. Além disso, estudos sobre expressão de iNOS e síntese de NO são conduzidos em tempos longos de incubação (mínimo de 6 horas, geralmente entre 18 e 24 horas). No entanto, o aumento na expressão de GRK2 e a internalização de receptores em resposta ao LPS pode ser observada já em 1 hora de incubação, um tempo geralmente considerado rápido demais para eventos dependentes de síntese. Estudos futuros sobre a dinâmica do efeito do LPS na expressão de GRK2 e na internalização de receptores são necessários para melhor compreendermos este fenômeno.

Entretanto, dada a característica do neutrófilo de ser uma célula preparada para respostas rápidas, é possível que a síntese protéica ocorra de forma mais rápida nestas células, permitindo aumentos detectáveis de proteína em tempos relativamente curtos. Além disso, a dinâmica de expressão de iNOS em neutrófilos ainda não é bem

compreendida, inclusive com relatos na literatura da expressão constitutiva da isoforma induzida de NO sintase (ARMSTRONG, 2001; CEDERGREN *et al.*, 2003).

Neste estudo observamos também a inibição da resposta de neutrófilos ao fMLP após a estimulação com LPS ou LTA. Diferentemente dos outros receptores estudados, a expressão do receptor de baixa afinidade do fMLP, o FPRL-1, não foi alterada pela estimulação com LPS. Possivelmente a estimulação com LPS impacte apenas na expressão do receptor de alta afinidade, o FPR. Isso seria interessante, pois impediria que o neutrófilo se tornasse completamente irresponsivo a este estímulo, mantendo sua capacidade de reconhecer e responder a produtos bacterianos. De fato, o fMLP é um potente estimulador da atividade microbicida de neutrófilos, sendo este efeito dependente dos receptores de baixa afinidade, enquanto que a resposta quimiotática pode ser atribuída quase que exclusivamente à ativação dos receptores de alta afinidade (HERRMANN *et al.*, 2007).

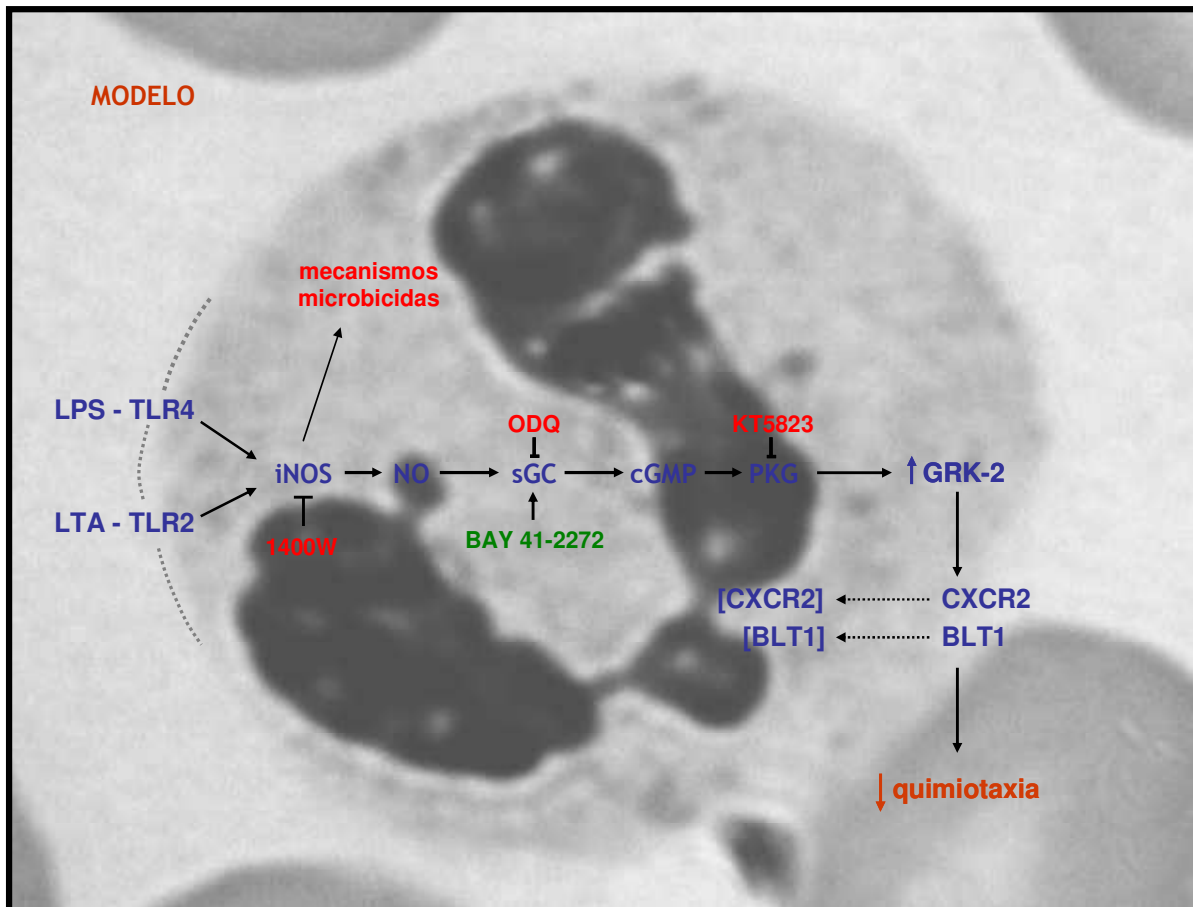
Nossos dados de internalização de receptores sugerem, portanto, um quadro interessante do ponto de vista biológico, onde o LPS seria capaz de inibir a função quimiotática dos neutrófilos sem interferir com sua capacidade de ativar mecanismos microbicidas em resposta a produtos bacterianos. É tentador especular que este seja um mecanismo fisiológico de controle da localização dos neutrófilos no tecido infectado. O neutrófilo recém-chegado no tecido seria capaz de reconhecer gradientes quimiotáticos de forma a se guiar em direção ao foco infeccioso. A sinalização via receptores tipo Toll funcionaria como um sinal de chegada à fonte da infecção e, portanto, sinalizaria a necessidade do neutrófilo de parar de migrar e permanecer no local.

A grande falha deste sistema é sua vulnerabilidade à sepse. Na vigência de uma infecção sistêmica, este mecanismo seria ativado na circulação (e não no foco primário de infecção), impedindo que os neutrófilos deixem os vasos em direção aos tecidos.

Assim como a sepse parece resultar do descontrole de um processo biológico fundamentalmente benéfico – a resposta inflamatória, a falência da migração de neutrófilos parece ser um mecanismo normal, ocorrendo no lugar errado.

## **5.2. Modelo**

Tomados em conjunto, nossos dados *in vitro* permitem a sugestão de um modelo onde a ativação de receptores do tipo Toll em neutrófilos humanos levaria à ativação da iNOS, a síntese de NO e o disparo da via NO-GC-PKG. A ativação desta via culminaria com o aumento da expressão de GRK2 (e talvez outras isoformas) e a internalização de receptores, levando a um bloqueio da resposta quimiotática dos neutrófilos (Figura 21). Na sepse, este processo ocorreria na circulação devido à presença de componentes bacterianos circulantes, o que tornaria os neutrófilos incapazes de migrar para o tecido e controlar a infecção.



**Figura 21. Modelo proposto.** Com base nos nossos resultados, propomos o modelo representado no esquema acima. Em neutrófilos, a sinalização via TLR levaria a uma rápida ativação de iNOS com produção de NO e ativação da via NO-GC-PKG. Esta via induziria o aumento da expressão de GRK2 (e possivelmente outras GRKs) o que resultaria na internalização de receptores, tornando o neutrófilo hiporresponsivo a estímulos quimiotáticos. Os pontos de ação das drogas utilizadas no trabalho estão também representados.

### 5.3. Resultados in vivo.

Pacientes sépticos desenvolvem disfunções em vários sistemas fisiológicos incluindo os sistemas cardiovascular, respiratório, nervoso e renal (COHEN, 2002; RUSSEL, 2006; MARSHALL, 2008). Mais recentemente, o sistema imunológico foi também reconhecido como um sistema fisiológico susceptível a disfunção na sepse (LYN-KEW & STANDIFORD, 2008; WANG & DENG, 2008). A falência da migração de neutrófilos é uma importante disfunção do sistema imunológico descrita na sepse. Este processo parece contribuir para o agravamento do quadro clínico do paciente e, de fato, o grau de hiporresponsividade de neutrófilos se correlaciona diretamente com a gravidade do quadro clínico e com um prognóstico desfavorável (TAVARES-MURTA *et al.*, 2002).

A falência de migração de neutrófilos na sepse parece depender do NO produzido pela iNOS. Em modelos experimentais de sepse, o tratamento dos animais com inibidores farmacológicos da iNOS restaura a migração de neutrófilos para o foco infeccioso (BENJAMIM *et al.*, 2000; BENJAMIM *et al.*, 2002). Em concordância com estas observações, animais geneticamente deficientes na iNOS são refratários aos efeitos da sepse sobre a função migratória de neutrófilos (BENJAMIM *et al.*, 2002). Além disso, em pacientes com sepse, a inibição da migração de neutrófilos se correlaciona com o aumento na expressão de iNOS e no aumento dos níveis séricos de nitrito e nitrato (indicativos de produção de NO) (TAVARES-MURTA *et al.*, 2002; ARRAES *et al.*, 2006).

Entretanto, em modelos experimentais de sepse, a inibição da sintase de NO resulta em aumento da mortalidade. Adicionalmente, animais  $iNOS^{-/-}$  se mostram mais susceptíveis à sepse que animais controle (BENJAMIM *et al.*, 2002). Resultados



similares foram reportados em pacientes humanos, quando uma triagem clínica de fase III, testando os efeitos de um inibidor da síntese de NO na sepse, teve de ser abortado por resultar em aumento significativo da mortalidade (LÓPEZ *et al.*, 2004). Estes resultados atestam as limitações do uso de inibidores da NO sintase na terapia da sepse.

Interessantemente, resultados mais promissores foram obtidos com inibidores da enzima guanilato ciclase (PREISER *et al.*, 1995; KIROV *et al.*, 2001; EVORA *et al.*, 2006; FERNANDES *et al.*, 2009). Esta enzima é uma efetora de uma série de efeitos biológicos do NO e, portanto, se esperaria que a inibição de sua atividade tivesse resultados similares aos obtidos com a inibição da síntese de NO. De fato, os dados reportados na literatura sugerem que a inibição da síntese de NO e a inibição da atividade de GC resultam em efeitos similares sobre a função cardiovascular na sepse. No entanto, os efeitos finais de ambas as abordagens são completamente distintos, resultando em aumento da mortalidade no primeiro e melhora da sobrevivência para o segundo (AVONTUUR *et al.*, 1998; KIROV *et al.*, 2001; LÓPEZ *et al.*, 2004; WATSON *et al.*, 2004; KWOK & HOWES, 2006; EVORA *et al.*, 2007). Estes resultados sugerem que a ação dos inibidores da GC sobre outros sistemas (além do sistema cardiovascular) deve contribuir de forma importante para seus efeitos benéficos.

Neste sentido, nosso estudo apresenta um possível mecanismo para os efeitos benéficos de inibidores de GC na sepse. Nossos resultados sugerem que a inibição da atividade de GC é capaz de restaurar a função migratória de neutrófilos, sem, no entanto, interferir com sua capacidade microbicida.

Dados experimentais demonstram que os animais tratados com inibidores da NO sintase apresentam elevada contagem de bactérias no foco primário e no sangue durante a sepse, a despeito de um intenso influxo neutrofílico (BENJAMIM *et al.*, 2002). Isto sugere que os neutrófilos destes animais, embora tenham sua função migratória intacta,

são incapazes de controlar a infecção. Provavelmente, a inibição da iNOS impede que estes neutrófilos utilizem todo seu potencial microbicida, por não serem capazes de sintetizar NO. Por outro lado, como sugerem nossos dados, a inibição da GC teria o mesmo efeito sobre a função migratória, com o benefício de não interferir com a capacidade de síntese de NO e, portanto, com a capacidade microbicida do neutrófilo.

Com base nestes pressupostos, testamos os efeitos da inibição da atividade de GC em um modelo experimental de sepse. Como já descrito, a inibição farmacológica da iNOS com 1400W foi capaz de restaurar a função migratória de neutrófilos em animais submetidos à sepse. Da mesma forma, e em concordância com nossos dados *in vitro*, observamos que o tratamento com ODQ, um inibidor seletivo da GC, foi capaz de restaurar a migração de neutrófilos de maneira similar ao 1400W. No entanto, a resultante final dos dois tratamentos foi bastante diferente. Por um lado, o tratamento com 1400W não teve impacto na sobrevivência dos animais. Além disso, as contagens de bactéria no peritônio (foco primário de infecção neste modelo) e no sangue dos animais tratados ou não com 1400W foram indiscerníveis. Considerando que os animais tratados possuem contagens de neutrófilos muito superiores aos dos animais não tratados, é razoável afirmar que estas células apresentam uma profunda incapacidade de controlar a infecção. Por outro lado, o tratamento com ODQ resultou em significativo aumento na sobrevivência. Nestes animais, as contagens de bactéria na cavidade peritoneal foram cerca de 100 vezes menor que nos animais controle e parte dos animais apresentou cultura de sangue negativa, indicando um eficiente controle da infecção.

Estes dados corroboram nossos dados *in vitro* e sugerem que a ativação da via NO-GC-PKG em neutrófilos ocorra *in vivo* durante a sepse e contribua para a inibição da função migratória destas células. De fato, estudos mostram que apenas a inibição da sinalização via CXCR2 ou via BLT1 já é suficiente para tornar os animais altamente

susceptíveis à sepse (RIOS-SANTOS *et al.*, 2003; RIOS-SANTOS *et al.*, 2007). Desta forma, caso ocorra in vivo, como sugerem nossos resultados, a ativação da via NO-GC-PKG com conseqüente internalização de CXCR2 e BLT1, isto por si já contribuiria de forma suficiente para a mortalidade.

A regulação da migração de neutrófilos pela ativação da via NO-GC-PKG in vivo foi descrita recentemente usando um modelo de inflamação aguda por injeção intraperitoneal de carragenina (DAL SECCO *et al.*, 2006). Neste estudo, o efeito inibidor da via NO-GC-PKG foi atribuído à modulação da expressão de moléculas de adesão pelo endotélio. No entanto, a modulação direta da resposta quimiotática de neutrófilos pela ativação da GC não foi considerada. Tendo estes resultados em vista, podemos considerar a possibilidade de interação entre os dois mecanismos (endotélio e neutrófilos) na sepse, gerando um somatório de efeitos no sentido de inibir a transmigração de neutrófilos.

#### **5.4. Potencial terapêutico.**

Usando uma abordagem clinicamente mais relevante, tratamos os animais após o estabelecimento da sepse. Inicialmente, tratamos os animais com duas doses de ODQ, 3 e 12 horas após o CLP. Em 24 horas, quando todos os animais não tratados haviam sucumbido a infecção, os animais tratados apresentavam sobrevida de 50%. Entre 24 e 48 horas, no entanto, a sobrevida neste grupo caiu para em torno de 15%, não atingindo significância estatística. Este resultado mostrava claramente o potencial do tratamento com ODQ, embora o tempo de tratamento devesse ser ajustado. De fato, estudos usando azul de metileno (um inibidor não seletivo de GC) e ODQ, mostram que os efeitos benéficos do tratamento dependem do tempo de administração da droga (SILVA-

SANTOS *et al.*, 2002; FERNANDES *et al.*, 2009). Neste sentido, decidimos usar uma terceira dose de ODQ em 24 horas (quando ainda tínhamos 50% de sobrevida). Neste protocolo, a sobrevida observada em 24 horas foi praticamente mantida ao longo de todo o período de observação.

Os efeitos benéficos dos inibidores de GC na sepse são amplamente reconhecidos. Alguns grupos defendem inclusive uma séria revisão do uso destes inibidores em pacientes críticos (KWOK & HOWES, 2006; EVORA *et al.*, 2007). No entanto, os mecanismos envolvidos nos efeitos benéficos destas drogas permanecem obscuros. A maior contribuição do presente estudo é, portanto, trazer um fundamento celular e molecular capaz de explicar, pelo menos em parte, os reconhecidos efeitos benéficos desta classe de drogas na terapia da sepse.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES-FILHO, J.C., FREITAS, A., RUSSO, M., CUNHA, F.Q. 2004. Toll-like receptor 4 signaling leads to neutrophil migration impairment in polymicrobial infection. *Crit. Care Med.* 34: 461-470.

ALVES-FILHO, J.C., FREITAS, A., SOUTO, F.O., SPILLER, F., PAULA-NETO, H.A., SILVA, J.S., GAZINELLI, R.T., TEIXEIRA, M.M., FERREIRA, S.H., CUNHA, F.Q. 2009. Regulation of chemokine receptor by Toll-like receptor 2 is critical to neutrophil migration and resistance to polymicrobial sepsis. *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* 106: 4018-4023.

ALVES-FILHO, J.C., FREITAS, A., SPILLER, F., SOUTO, F.O., CUNHA, F.Q. 2008. The role of neutrophils in severe sepsis. *Shock.* 30 suppl 1: 3-9.

ANDERSON, K.V., JÜRGENS, G., NÜSSLEIN-VOLHARD, C. 1985. Establishment of dorsal-ventral polarity in the Drosophila embryo: genetic studies on the role of the Toll gene product. *Cell.* 42: 779-89.

ANGUS, D.C., WAX, R.S. 2001. Epidemiology of sepsis: an update. *Crit Care Med.* 29: S109-116.

ARMSTRONG, R. 2001. The physiological role and pharmacological potential of nitric oxide in neutrophil activation. *Int Immunopharmacol.* 1: 1501-1512.

ARRAES, S.M., FREITAS, M.S., DA SILVA, S.V., PAULA NETO, H.A., ALVES-FILHO, J.C., AUXILIADORA MARTINS, M., BASILE-FILHO, A., TAVARES-MURTA, B.M., BARJA-FIDALGO, C. & CUNHA, F.Q. 2006. Impaired neutrophil chemotaxis in sepsis associates with GRK expression and inhibition of actin assembly and tyrosine phosphorylation. *Blood.* 108: 2906-2913.

AVONTUUR, J.A., TUTEIN NOLTHENIUS, R.P., VAN BODEGOM, J.W., BRUINING, H.A. 1998. Prolonged inhibition of nitric oxide synthesis in severe septic shock: a clinical study. *Crit Care Med.* 26: 660-667.

BATEMAN, R.M., SHARPE, M.D., ELLIS, C.G. 2003. Bench-to-bedside review: Microvascular dysfunction in sepsis – hemodynamics, oxygen transport, and nitric oxide. *Crit. Care.* 7: 359-373.

BENJAMIM, C.F., FERREIRA, S.H. & CUNHA, F.Q. 2000. Role of nitric oxide in the failure of neutrophil migration in sepsis. *J. Infect. Dis.* 182: 214.

BENJAMIM, C.F., HOGABOAM, C.M., KUNKEL, S.L. 2004. The chronic consequences of severe sepsis. *J. Leukoc. Biol.* 75: 408-412.

BENJAMIM, C.F., SILVA, J.S., FORTES, Z.B., OLIVEIRA, M.A., FERREIRA, S.H. & CUNHA, F.Q. 2002. Inhibition of leukocyte rolling by nitric oxide during sepsis leads to reduced migration of active microbicidal neutrophils. *Infect. Immun.* 70: 3602.

BEUTLER, B. 2009. Microbe sensing, positive feedback loops, and the pathogenesis of inflammatory diseases. *Immunol. Rev.* 227: 248-263.

BRADFORD, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72: 248-254.

BROVKOVYCH, V., GAO, X.-P., ONG, E., BROVKOVYCH, S., BRENNAN, M.-L., SU, X., HAZEN, S.L., MALIK, A.B., SKIDGEL, R.A. 2008. Augmented inducible nitric oxide synthase expression and increased NO production reduce sepsis-induced lung injury and mortality in myeloperoxidase-null mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 295: L96-L103.

BURAS, J.A., HOLZMANN, B., SITKOVSKY, M. 2005. Animal models of sepsis: setting the stage. *Nat Rev Drug Discov.* 4: 854-865.

CARY, S.P.L., WINGER, J.A., DERBYSHIRE, E.R. & MARLETTA, M.A. 2006. Nitric oxide signaling: no longer simply on or off. *Trends Biochem. Sci.* 31: 231.

CAUWELS, A., VAN MOLLE, W., JANSSEN, B., EVERAERDT, B., HUANG, P., FIERS, W., BROUCKAERT, P. 2000. Protection against TNF-induced lethal shock by soluble guanylate cyclase inhibition requires functional inducible nitric oxide synthase. *Immunity.* 13: 223-231.

CAVASSANI, K.A., CARSON 4th, W., MOREIRA, A.P., WEN, H., SCHALLER, M.A., ISHII, M., LINDELL, D.M., DOU, Y., LUKACS, N.N., KESHAMOUNI, V.G., HOGABOAM, C.M., KUNKEL, S.L. 2010. The post sepsis-induced expansion and enhanced function of regulatory T cells creates an environment to potentiate tumor growth. *Blood.* Publicado online em 3 de fev. DOI 10.1182/blood-2009-09-241083.

- CAVAZZONI-ZANOTTI, S.L., HOLLENBERG, S.M. 2009. Cardiac dysfunction in severe sepsis and septic shock. *Curr. Opin. Crit. Care.* 15: 392-397.
- CEDERGREN, J., FOLLIN, P., FORSLUND, T., LINDMARK, M., SUNDQVIST, T., SKOGH, T. 2003. Inducible nitric oxide synthase (NOS II) is constitutive in human neutrophils. *APMIS.* 111: 963-968.
- CLEMENTS, M.K., SIEMSEN, D.W., SWAIN, S.D., HANSON, A.J., NELSON-OVERTON, L.K., ROHN, T.T., QUINN, M.T. 2003. Inhibition of actin polymerization by peroxynitrite modulates neutrophil functional responses. *J. Leukoc. Biol.* 73: 344-355.
- COELHO, A.L., DE FREITAS, M.S., MARIANO-OLIVEIRA, A., OLIVEIRA-CARVALHO, A.L., ZINGALI, R.B., BARJA-FIDALGO, C. 2001. Interaction of disintegrins with human neutrophils induces cytoskeleton reorganization, focal adhesion kinase activation, and extracellular-regulated kinase-2 nuclear translocation, interfering with the chemotactic function. *FASEB J.* 15:1643-1645.
- COHEN, J. 2002. The immunopathogenesis of sepsis. *Nature.* 420: 885-891.
- COWBURN, A.S., CONDLIFFE, A.M., FARAH, N., SUMMERS, C., CHILVERS, E.R. 2008. Advances in neutrophil biology: clinical implications. *Chest.* 134: 606-612.
- CROSARA-ALBERTO, D.P., DARINI, A.L.C., INOUE, R.Y., SILVA, J.S., FERREIRA, S.H., CUNHA, F.Q. 2002. Involvement of NO in the failure of neutrophil migration during sepsis induced by Staphylococcus aureus. *Br. J. Pharmacol.* 136: 645-658.
- CZERMAK, B.J., BRECKWOLDT, M., RAVAGE, Z.B., HUBER-LANG, M., SCHMAL, H., BLESS, N.M., FRIEDL, H.P., WARD, P.A. 1999. Mechanisms of enhanced lung injury during sepsis. *Am J Pathol.* 154: 1057-1065.
- DALE, D.C., BOXER, L., LILES, W.C. 2008. The phagocytes: neutrophils and monocytes. *Blood.* 112: 935-945.
- DAL-SECCO, D., MOREIRA, A.P., FREITAS, A., SILVA, J.S., ROSSI, M.A., FERREIRA, S.H., CUNHA, F.Q. 2006. Nitric oxide inhibits neutrophil migration through a mechanism dependent on ICAM-1: role of soluble guanylate cyclase. *Nitric Oxide* 15: 77-86.

DELANO, M.J., SCUMPIA, P.O., WEINSTEIN, J.S., COCO, D., NAGARAJ, S., KELLY-SCUMPIA, K.M., O'MALLEY, K.A., WYNN, J.L., ANTONENKO, S., AL-QURAN, S.Z., SWAN, R., CHUNG, C.S., ATKINSON, M.A., RAMPHAL, R., GABRILOVICH, D.I., REEVES, W.H., AYALA, A., PHILLIPS, J., LAFACE, D., HEYWORTH, P.G., CLARE-SALZLER, M., MOLDAWER, L.L. 2007. MyD88-dependent expansion of an immature GR-1(+)CD11b(+) population induces T cell suppression and Th2 polarization in sepsis. *J Exp Med.* 204: 1463-1474.

DENG, J.C., CHENG, G., NEWSTEAD, M.W., ZENG, X., KOBAYASHI, K., FLAVELL, R.A., STANDIFORD, T.J. 2006. Sepsis-induced suppression of lung innate immunity is mediated by IRAK-M. *J. Clin. Invest.* 116: 2532-2542.

EVORA, P.R.B., RODRIGUES, A.F., VICENTE, W.V.A., VICENTE, Y.A., BASSETO, S., BASILE FILHO, A., CAPELLINI, V.K. 2007. Is the cyclic GMP system underestimated by intensive care and emergency teams? *Med. Hypotheses* 69: 564-567.

EVORA, P.R., VIARO, F. 2006. The guanylyl cyclase inhibition by MB as vasoplegic circulatory shock therapeutical target. *Curr Drug Targets.* 7: 1195-1204.

FAN, J. & MALIK, A.B. 2003. Toll-like receptor-4 (TLR4) signaling augments chemokine-induced neutrophil migration by modulating cell surface expression of chemokine receptors. *Nat. Med.* 9: 315.

FERNANDES, D., SILVA-SANTOS, J.E., DUMA, D., VILLELA, C.G., BARJA-FIDALGO, C., ASSREUY, J. 2006. Nitric oxide-dependent reduction in soluble guanylate cyclase functionality accounts for early lipopolysaccharide-induced changes in vascular reactivity. *Mol. Pharmacol.* 69: 983-990.

FERNANDES, D., SORDI, R., PACHECO, L.K., NARDI, G.M., HECKERT, B.T., VILLELA, C.G., LOBO, A.R., BARJA-FIDALGO, C., ASSREUY, J. 2009. Late, but not early, inhibition of soluble guanylate cyclase decreases mortality in a rat sepsis model. *J Pharmacol Exp Ther.* 328: 991-999.

FIERRO, I.M., NASCIMENTO DA SILVA, V., ARRUDA, M.A.B., FREITAS, M.S., PLOTKOWSKI, M.C., CUNHA, F.Q., BARJA-FIDALGO, C. 1999. Induction of NOS in rat blood PMN in vivo and in vitro: modulation by tyrosine kinase and involvement in bactericidal activity. *J. Leukoc. Biol.* 65: 1-7.

FLOHÉ, S.B., AGRAWAL, H., SCHMITZ, D., GERTZ, M., FLOHÉ, S., SCHADE, F.U. 2006. Dendritic cells during polymicrobial sepsis rapidly mature but fail to initiate a protective Th1-type immune response. *J. Leukoc. Biol.* 79: 473-481.



FOSTER, M.W., HESS, D.T., STAMLER, J.S. 2009. Protein S-nitrosylation in health and disease: a current perspective. *Trends Mol Med.* 15: 391-404.

GEISZT, M., KAPUS, A., LIGETI, E. 2001. Chronic granulomatous disease: more than the lack of superoxide? *J Leukoc Biol.* 69: 191-196.

HAUSER, B., BRACHT, H., MATEJOVIC, M., RADERMACHER, P., VENKATESH, B. 2005. Nitric oxide synthase inhibition in sepsis? Lessons learned from large animal studies. *Anesth. Analg.* 101: 488-498.

HERRMANN, J.M., BERNARDO, J., LONG, H.J., SEETOO, K., MCMENAMIN, M.E., BATISTA JR, E.L., VAN DYKE, T.E., SIMONS, E.R. 2007. Sequential chemotactic and phagocytic activation of human polymorphonuclear neutrophils. *Infect Immun.* 75: 3989-3998.

HESS, D.T., MATSUMOTO, A., KIM, S.-O., MARSHALL, H.E. & STAMLER, J.S. 2005. Protein S-nitrosylation: purview and parameters. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6: 150.

HIRSCH, E., KATANAIEV, V.L., GARLANDA, C., AZZOLINO, O., PIROLA, L., SILENGO, L., SOZZANI, S., MANTOVANI, A., ALTRUDA, F., WYMANN, M.P. 2000. Central role for G protein-coupled phosphoinositide 3-kinase gamma in inflammation. *Science.* 287: 1049-1053.

HOTCHKISS, R.S., TINSLEY, K.W., SWANSON, P.E., SCHMIEG JR, R.E., HUI, J.J., CHANG, K.C., OSBORNE, D.F., FREEMAN, B.D., COBB, J.P., BUCHMAN, T.G., KARL, I.E. 2001. Sepsis-induced apoptosis causes progressive profound depletion of B and CD4+ T lymphocytes in humans. *J. Immunol.* 166: 6952-6963.

HUBBARD, W.J., CHOUDHRY, M., SCHWACHA, M.G., KERBY, J.D., RUE 3<sup>RD</sup>, L.W., BLAND, K.I., CHAUDRY, I.H. 2005. Cecal ligation and puncture. *Shock.* 24 Suppl 1: 52-57.

ISCHIROPOULOS, H. 2003. Biological selectivity and functional aspects of protein tyrosine nitration. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 305: 776.

JONES, A.E., PUSKARICH, M.A. 2009. Sepsis-induced tissue hypoperfusion. *Crit Care Clin.* 25: 769-779.

KAPLAN, S.S., LANCASTER, J.R., BASFORD, R.E., SIMMONS, R.L. 1996. Effect of nitric oxide on staphylococcal killing and interactive effect with superoxide. *Infect. Immunity* 64: 69–76.

KAVELAARS, A., VROON, A., RAATGEVER, R.P., FONG, A.M., PREMONT, R.T., PATEL, D.D., LEFKOWITZ, R.J., HEIJNEN, C.J. 2003. Increased acute inflammation, leukotriene B4-induced chemotaxis, and signaling in mice deficient for G protein-coupled receptor kinase 6. *J Immunol.* 171: 6128-6134.

KHANDAKER, M.H., XU, L., RAHIMPOUR, R., MITCHELL, G., DEVRIES, M.E., PICKERING, J.G., SINGHAL, S.K., FELDMAN, R.D., KELVIN, D.J. 1998. CXCR1 and CXCR2 are rapidly down-modulated by bacterial endotoxin through a unique agonist-independent, tyrosine kinase-dependent mechanism. *J. Immunol.* 161: 1930-1938.

KIROV, M.Y., EVGENOV, O.V., EVGENOV, N.V., EGORINA, E.M., SOVERSHAEV, M.A., SVEINBJØRNSSON, B., NEDASHKOVSKY, E.V., BJERTNAES, L.J. 2001. Infusion of methylene blue in human septic shock: a pilot, randomized, controlled study. *Crit. Care Med.* 29: 1860–1867.

KWOK, E.S.H., HOWES, D. 2006. The use of methylene blue in sepsis: a systematic review. *J. Intensive Care Med.* 21: 359-363.

LEMAITRE, B., NICOLAS, E., MICHAUT, L., REICHHART, J.M., HOFFMANN, J.A. 1996. The dorsoventral regulatory gene cassette *spätzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell.* 86: 973-983.

LEY, K., LAUDANNA, C., CYBULSKY, M.I., NOURSHARGH, S. 2007. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol.* 7:678-689.

LIM, S., KANG, K.W., PARK, S.Y., KIM, S.I., CHOI, Y.S., KIM, N.D., LEE, K.U., LEE, H.K., PAK, Y.K. 2004. Inhibition of lipopolysaccharide-induced inducible nitric oxide synthase expression by a novel compound, mercaptopyrazine, through suppression of nuclear factor-kappaB binding to DNA. *Biochem Pharmacol.* 68: 719-728.

LÓPEZ, A., LORENTE, J.A., STEINGRUB, J., BAKKER, J., MCLUCKIE, A., WILLATTS, S., BROCKWAY, M., ANZUETO, A., HOLZAPFEL, L., BREEN, D., SILVERMAN, M.S., TAKALA, J., DONALDSON, J., ARNESON, C., GROVE, G., GROSSMAN, S. & GROVER, R. 2004. Multiple-center, randomized, placebo-

controlled, double-blind study of the nitric oxide synthase inhibitor 546C88: effect on survival in patients with septic shock. *Crit. Care Med.* 32: 21.

LOWENSTEIN, C.J., ALLEY, E.W., RAVAL, P., SNOWMAN, A.M., SNYDER, S.H., RUSSELL, S.W., MURPHY, W.J. 1993. Macrophage nitric oxide synthase gene: two upstream regions mediate induction by interferon gamma and lipopolysaccharide. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90: 9730-9734.

LYN-KEW, K., STANDIFORD, T.J. 2008. Immunosuppression in sepsis. *Curr Pharm Des.* 14: 1870-1881.

MAGDER, S. 2009. Bench-to-bedside review: Ventilatory abnormalities in sepsis. *Crit Care.* 13: 202.

MALAWISTA, S.E., MONTGOMERY, R.R., VAN BLARICOM, G. 1992. Evidence for reactive nitrogen intermediates in killing of staphylococci by human neutrophil cytoplasts. A new microbicidal pathway for polymorphonuclear leukocytes. *J Clin Invest.* 90: 631-636.

MALECH, H.L., HICKSTEIN, D.D. 2007. Genetics, biology and clinical management of myeloid cell primary immune deficiencies: chronic granulomatous disease and leukocyte adhesion deficiency. *Curr Opin Hematol.* 14: 29-36.

MARTIN, G.S., MANNINO, D.M., EATON, S., MOSS, M. 2003. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med.* 348: 1546-1554.

MEDZHITOV, R. 2008. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature.* 454: 428-435.

MEDZHITOV, R., PRESTON-HURLBURT, P., JANEWAY JR, C.A. 1997. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature.* 388: 394-397.

MESTRINER, F.L., SPILLER, F., LAURE, H.J., SOUTO, F.O., TAVARES-MURTA, B.M., ROSA, J.C., BASILE-FILHO, A., FERREIRA, S.H., GREENE, L.J., CUNHA, F.Q. 2007. 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.* 104: 19595-19600.

MONCADA, S., PALMER, R.M.J., HIGGS, E.A. 1989. Biosynthesis of nitric oxide from L-arginine. A pathway for the regulation of cell function and communication. *Biochem. Pharmacol.* 38: 1709–1715.

MONCADA, S., HIGGS, E.A. 2006. The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology. *Br J Pharmacol.* 147 Suppl 1: S193-201.

MORENO, S.E., ALVES-FILHO, J.C., BERTOZI, G., ALFAYA, T.M., THÈZE, J., FERREIRA, S.H., VARGAFTIG, B.B. 2006a. Systemic administration of interleukin-2 inhibits inflammatory neutrophil migration: role of nitric oxide. *Br J Pharmacol.* 148: 1060-1066.

MORENO, S.E., ALVES-FILHO, J.C., RIOS-SANTOS, F., SILVA, J.S., FERREIRA, S.H., CUNHA, F.Q., TEIXEIRA, M.M. 2006b. Signaling via platelet-activating factor receptors accounts for the impairment of neutrophil migration in polymicrobial sepsis. *J Immunol.* 177: 1264-1271.

MURAD, F. 2006. Nitric oxide and cyclic GMP in cell signaling and drug development. *N. Engl. J Med.* 355: 2003.

NAPIMOGA, M.H., VIEIRA, S.M., DAL-SECCO, D., FREITAS, A., SOUTO, F.O., MESTRINER, F.L., ALVES-FILHO, J.C., GRESPAN, R., KAWAI, T., FERREIRA, S.H., CUNHA, F.Q. 2008. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligand, 15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2, reduces neutrophil migration via a nitric oxide pathway. *J Immunol.* 180: 609-617.

NAUSEEF, W.M. 2007. How human neutrophils kill and degrade microbes: an integrated view. *Immunol Rev.* 219: 88-102.

NEMZEK, J.A., HUGUNIN, K.M., OPP, M.R. 2008. Modeling sepsis in the laboratory: merging sound science with animal well-being. *Comp Med.* 58: 120-128.

NEWBURGER, P.E. 2006. Disorders of neutrophil number and function. *Hematology.* 104.

PALMER, R.M.J., FERRIGE, A.G., MONCADA, S. 1987. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature.* 327: 524–526.

PREISER, J.C., LEJEUNE, P., ROMAN, A., CARLIER, E., DE BACKER, D., LEEMAN, M., KAHN, R.J., VINCENT, J.L. 1995. Methylene blue administration in septic shock: a clinical trial. *Crit Care Med.* 23: 259-264.

PREMONT, R.T., GAINETDINOV, R.R. 2007. Physiological roles of G protein-coupled receptor kinases and arrestins. *Annu Rev Physiol.* 69: 511-534.

PULITI, M., VON HUNOLSTEIN, C., BISTONI, F., OREFICI, G., TISSI, L. 2004. Inhibition of nitric oxide synthase exacerbates group B Streptococcus sepsis and arthritis in mice. *Infect. Immunity* 72: 4891-4894.

REDDY, R.C., STANDIFORD, T.J. 2010. Effects of sepsis on neutrophil chemotaxis. *Curr. Opin. Hematol.* 17: 18-24.

REMICK, D.G. 2007. Pathophysiology of sepsis. *Am. J. Pathol.* 170: 1435.

RIOS-SANTOS, F., ALVES-FILHO, J.C., SOUTO, F.O., SPILLER, F., FREITAS, A., LOTUFO, C.M.C., SOARES, M.B., DOS SANTOS, R.R., TEIXEIRA, M.M., CUNHA, F.Q. 2007. Down-regulation of CXCR2 on neutrophils in severe sepsis is mediated by inducible nitric oxide synthase-derived nitric oxide. *Am. J. Resp. Crit. Care Med.* 175: 490-497.

RIOS-SANTOS, F., BENJAMIM, C.F., ZAVERY, D., FERREIRA, S.H., CUNHA, F.Q. 2003. A critical role of leukotriene B4 in neutrophil migration to infectious focus in cecal ligation and puncture sepsis. *Shock* 19: 61-65.

RITTER, S.L., HALL, R.A. 2009. Fine-tuning of GPCR activity by receptor-interacting proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 10: 819-830.

RITTIRSCH, D., FLIERL, M.A., WARD, P.A. 2008. Harmful molecular mechanisms in sepsis. *Nat. Rev. Immunol.* 8: 776-787.

RUSSEL, J.A. 2006. Management of sepsis. *N. Engl. J. Med.* 355: 1699-1713.

RUSSEL, J.A. 2008. The current management of septic shock. *Minerva Med.* 99: 431-458.

SATO, Y., VAN EEDEN, S.F., ENGLISH, D., HOGG, J.C. 1998. Pulmonary sequestration of polymorphonuclear leukocytes released from bone marrow in bacteremic infection. *Am J Physiol.* 275(2 Pt 1): L255-L261.

SHARSHAR, T., HOPKINSON, N.S., ORLIKOWSKI, D., ANNANE, D. 2005. Science review: The brain in sepsis--culprit and victim. *Crit Care.* 9: 37-44.

SHIMAOKA, M., PARK, E.J. 2008. Advances in understanding sepsis. *Eur J Anaesthesiol.* 42: 146-153.

SILVA-SANTOS, J.E., TERLUK, M.R., ASSREUY, J. 2002. Differential involvement of guanylate cyclase and potassium channels in nitric oxide-induced hyporesponsiveness to phenylephrine in endotoxemic rats. *Shock* 17: 70-76.

SPEYER, C.L., GAO, H., RANCILIO, N.J., NEFF, T.A., HUFFNAGLE, G.B., SARMA, J.V., WARD, P.A. 2004. Novel chemokine responsiveness and mobilization of neutrophils during sepsis. *Am. J. Pathol.* 165: 2187-2196.

SPRONK, P.E., ZANDSTRA, D.F., INCE, C. 2004. Bench-to-bedside review: sepsis is a disease of the microcirculation. *Crit Care.* 8: 462-468.

TAMASSIA, N., LE MOIGNE, V., CALZETTI, F., DONINI, M., GASPERINI, S., EAR, T., CLOUTIER, A., MARTINEZ, F.O., FABBRI, M., LOCATI, M., MANTOVANI, A., MCDONALD, P.P., CASSATELLA, M.A. 2007. The MyD88-independent pathway is not mobilized in human neutrophils stimulated via TLR4. *J Immunol.* 178: 7344-7356.

TAVARES-MURTA, B.M., MACHADO, J.S., FERREIRA, S.H., CUNHA, F.Q. 2001. Nitric oxide mediates the inhibition of neutrophil migration induced by systemic administration of LPS. *Inflammation.* 25: 247-253.

TAVARES-MURTA, B.M., CUNHA, F.Q., FERREIRA, S.H. 1998. 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.* 124: 1369-1374.

TAVARES-MURTA, B.M., ZAPAROLI, M., FERREIRA, R.B., SILVA-VERGARA, M.L., OLIVEIRA, C.H., MURTA, E.F., FERREIRA, S.H., CUNHA, F.Q. 2002. Failure of neutrophil chemotactic function in septic patients. *Crit. Care Med.* 30: 1056-1061.

THELEN, M., STEIN, J.V. 2008. How chemokines invite leukocytes to dance. *Nat Immunol.* 9: 953-959.

TORRES-DUEÑAS, D., BENJAMIM, C.F., FERREIRA, S.H., CUNHA, F.Q. 2006. Failure of neutrophil migration to infectious focus and cardiovascular changes on sepsis in rats: Effects of the inhibition of nitric oxide production, removal of infectious focus, and antimicrobial treatment. *Shock.* 25: 267-276.

VAN DEN BLINK, B., BRANGER, J., WEIJER, S., GUPTA, A., VAN DEVENTER, S.J., PEPPELENBOSCH, M.P., VAN DER POLL, T. 2004. p38 mitogen activated protein kinase is involved in the downregulation of granulocyte CXC chemokine receptors 1 and 2 during human endotoxemia. *J. Clin. Immunol.* 24: 37-41.

VANDENBROUCKE, E., MEHTA, D., MINSHALL, R., MALIK, A.B. 2008. Regulation of endothelial junctional permeability. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1123: 134-145.

VAN HAASTERT, P.J., DEVREOTES, P.N. 2004. Chemotaxis: signalling the way forward. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 5: 626-634.

VENTETUOLO, C.E., LEVY, M.M. 2008. Sepsis: a clinical update. *Clin J Am Soc Nephrol.* 3: 571-577.

VINCENT, J.L., ABRAHAM, E. 2006. The last 100 years of sepsis. *Am J Respir Crit Care Med.* 173: 256-263.

VROON, A., HEIJNEN, C.J., KAVELAARS, A. 2006. GRKs and arrestins: regulators of migration and inflammation. *J. Leukoc. Biol.* 80: 1214-1221.

VROON, A., HEIJNEN, C.J., RAATGEVER, R., TOUW, I.P., PLOEMACHER, R.E., PREMONT, R.T., KAVELAARS, A. 2004. GRK6 deficiency is associated with enhanced CXCR4-mediated neutrophil chemotaxis in vitro and impaired responsiveness to G-CSF in vivo. *J Leukoc Biol.* 75: 698-704.

WANG, T.S., DENG, J.C. 2008. Molecular and cellular aspects of sepsis-induced immunosuppression. *J Mol Med.* 86: 495-506.

WATSON, D., GROVER, R., ANZUETO, A., LORENTE, J., SMITHIES, M., BELLOMO, R., GUNTUPALLI, K., GROSSMAN, S., DONALDSON, J., LE GALL, J.R., GLAXO WELLCOME INTERNATIONAL SEPTIC SHOCK STUDY GROUP. 2004. Cardiovascular effects of the nitric oxide synthase inhibitor NG-methyl-L-

arginine hydrochloride (546C88) in patients with septic shock: results of a randomized, double-blind, placebo-controlled multicenter study (study no. 144-002). *Crit Care Med.* 32: 13-20.

WEN, H., DOU, Y., HOGABOAM, C.M., KUNKEL, S.L. 2008. Epigenetic regulation of dendritic cell-derived interleukin-12 facilitates immunosuppression after a severe innate immune response. *Blood.* 111: 1797-1804.

WHEELER, D.S., ZINGARELLI, B., WHEELER, W.J., WONG, H.R. 2009. Novel pharmacologic approaches to the management of sepsis: targeting the host inflammatory response. *Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov.* 3: 96-112.

WIERSINGA, W.J., VAN'T VEER, C., VAN DEN PANGAART, P.S., DONDORP, A.M., DAY, N.P., PEACOCK, S.J., VAN DER POLL, T. 2009. Immunosuppression associated with interleukin-1R-associated-kinase-M upregulation predicts mortality in Gram-negative sepsis (melioidosis). *Crit. Care Med.* 37: 569-576.

WILSON, N.S., BEHRENS, G.M., LUNDIE, R.J., SMITH, C.M., WAITHMAN, J., YOUNG, L., FOREHAN, S.P., MOUNT, A., STEPTOE, R.J., SHORTMAN, K.D., DE KONING-WARD, T.F., BELZ, G.T., CARBONE, F.R., CRABB, B.S., HEATH, W.R., VILLADANGOS, J.A. 2006. Systemic activation of dendritic cells by Toll-like receptor ligands or malaria infection impairs cross-presentation and antiviral immunity. *Nat. Immunol.* 7: 165-172.

WISNOSKI, N., CHUNG, C.S., CHEN, Y., HUANG, X., AYALA, A. 2007. The contribution of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T-regulatory-cells to immune suppression in sepsis. *Shock.* 27: 251-257.

WOODFIN, A., VOISIN, M.B., NOURSHARGH, S. 2010. Recent developments and complexities in neutrophil transmigration. *Curr Opin Hematol.* 17: 9-17.



## **ANEXO I**

Parte deste estudo originou o manuscrito “INHIBITION OF GUANYLYL CYCLASE RESTORES NEUTROPHIL MIGRATION AND MAINTAINS BACTERIAL ACTIVITY INCREASING SURVIVAL IN SEPSIS” dos autores Heitor A. Paula Neto, José Carlos Alves Filho, Fabricio O. Souto, Fernando Spiller, Rafael S. Amendola, Andressa Freitas, Fernando Q. Cunha e Christina Barja Fidalgo.

O manuscrito foi submetido para publicação na revista Shock. O conteúdo do manuscrito foi avaliado positivamente pelo corpo editorial e as sugestões dos revisores estão sendo incorporadas à nova versão para breve resubmissão.

**INHIBITION OF GUANYLYL CYCLASE RESTORES NEUTROPHIL  
MIGRATION AND MAINTAINS BACTERICIDAL ACTIVITY INCREASING  
SURVIVAL IN SEPSIS**

Heitor A. Paula-Neto<sup>\*</sup>; José C. Alves-Filho<sup>†</sup>; Fabricio O. Souto<sup>†</sup>; Fernando Spiller<sup>†</sup>;  
Rafael S. Amêndola<sup>\*</sup>, Andressa Freitas<sup>†</sup>; Fernando Q. Cunha<sup>†</sup> and Christina Barja-  
Fidalgo<sup>\*</sup>.

<sup>\*</sup>Laboratório de Farmacologia Bioquímica e Celular, Departamento de Farmacologia,  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de  
Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil; <sup>†</sup>Laboratório de Inflamação e Dor, Departamento de  
Farmacologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo,  
Ribeirão Preto, Brasil.

**Correspondence to:** Christina Barja-Fidalgo. Adress: Av. 28 de setembro, 87 fundos –  
5º andar, sala 02. Zip Code: 20551-030. Phone number: 55-21-25876398. Fax number:  
55-21-25876808. e-mail: barja-fidalgo@uerj.br.

**Running title:** sGC activity and neutrophil function in sepsis

This work was supported by grants from the Coordenação de Aperfeiçoamento de  
Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico  
e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro  
(FAPERJ) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

**ABSTRACT**

Sepsis results from an overwhelming response to infection and is a major contributor to death in intensive care units worldwide. In recent years we and others have shown that neutrophil functionality is impaired in sepsis. This correlates with sepsis severity and contributes to aggravation of sepsis by precluding bacterial clearance. Nitric oxide (NO) is a major contributor in the impairment of neutrophil function in sepsis. However attempts to inhibit NO synthesis in sepsis resulted in increased death despite restoring neutrophil migration. This could be in part attributed to a reduction of the NO-dependent microbicidal activity of neutrophils. In sepsis, the beneficial effects resulting from the inhibition of soluble guanylyl cyclase (sGC), a downstream target of NO, has been long appreciated but poorly understood. However the effects of sGC inhibition on neutrophil function in sepsis have never been addressed. In the present study we show that TLR activation in human neutrophils leads to decreased chemotaxis which correlated with chemotactic receptor internalization and increased G protein-coupled receptor kinase 2 expression, in a process involving the NO-sGC-protein kinase G axis. We also demonstrate that inhibition of sGC activity increased survival in a murine model of sepsis which was paralleled by restored neutrophil migratory function and increased bacterial clearance. Finally the beneficial effect of sGC inhibition could also be demonstrated in mice treated after the onset of sepsis. Our results suggest that the beneficial effects of sGC inhibition in sepsis could be at least in part attributed to a recover of neutrophil functionality.

**Key words:** nitric oxide – Toll-like receptor – G protein-coupled receptor kinase – protein kinase G – chemotaxis – cyclic GMP

## INTRODUCTION

Sepsis is a complex clinical syndrome resulting from a systemic inflammatory response to infection. Septic patients usually present dysfunctions in several physiological systems that, in a substantial number of individuals, can evolve to multi-organ failure and death (1,2). Cardiovascular dysfunction for example is characterized by severe hypotension and, in a number of cases, refractoriness to hypertensive agents (3). In recent years, we and others have described an innate immune dysfunction in animal models of sepsis as well as in human septic subjects (4-13). This is represented by an inability of neutrophils to respond to chemotactic stimuli both *in vivo* and *in vitro*. This neutrophil dysfunction correlates well with outcome in septic patients and may contribute to aggravation of sepsis by precluding neutrophil efflux to tissues and an efficient control of the primary infectious focus.

Nitric oxide (NO) is a major contributor to sepsis pathophysiology. NO mediates the cardiovascular dysfunction observed in sepsis through its potent vasodilatory activity (14). Moreover NO was shown to mediate neutrophil dysfunction in sepsis (4-7). Pharmacological inhibition of NO synthesis or genetic ablation of the inducible NO synthase (iNOS) gene rescues neutrophil functionality in experimental models of sepsis (5-7). Moreover the unresponsiveness to chemotactic stimuli observed in neutrophils isolated from human septic patients correlates with increased iNOS expression and increased circulating nitrite/nitrate levels (8). However iNOS deficient mice or pharmacological inhibition of NO synthesis in animals and human septic patients resulted in increased mortality (5,7,15,16). To our understanding the limitations of NOS inhibition in sepsis could result at least in part from an interference with the ability of cells to produce NO and kill bacteria to control infection. In fact, in the cecal ligation

and puncture (CLP) model of sepsis, iNOS deficient mice and animals treated with NOS inhibitors presented similar bacterial loads in peritoneal cavity and blood, despite the recover in neutrophil migratory function (5,7).

Inhibition of the downstream effector of NO, the enzyme soluble guanylyl cyclase (sGC) has proven benefit in sepsis and septic shock (17-21). The rationale for the use of sGC inhibitors in sepsis is the recover of cardiovascular function. However, although the use of both NO or sGC inhibitors results in similar recover of cardiovascular function in sepsis, only the inhibition of sGC has proved beneficial effects in sepsis outcome (3,15,17-19,22). These results suggest that sGC inhibition may have beneficial effects over other physiological systems that could contribute to its observed efficacy. Additionally the well recognized dysfunction in neutrophil migration observed in sepsis is NO-dependent, but the involvement of sGC in this process has never been addressed.

Here we extended our previous studies to investigate the participation of sGC activation in the establishment of neutrophil dysfunction in sepsis. We used an in vitro model of neutrophil stimulation with TLR ligands to dissect the modulation of neutrophil migratory function by sGC activity. We also used an experimental model of sepsis to confront the effects of iNOS and sGC inhibition in vivo regarding neutrophil function, the effects on infection control and mice survival.

## MATERIALS AND METHODS

***Neutrophil isolation and treatment.*** Blood was collected from human healthy volunteers to EDTA-containing tubes. Neutrophils were isolated from human venous blood using Percoll gradients as described (23). Neutrophil purity and viability were >97% and >99%, respectively as assessed by differential counts and Trypan dye exclusion. Isolated neutrophils ( $10^6$  cells/mL) were treated with either 1400W, a specific iNOS inhibitor (30 $\mu$ M), ODQ, a sGC inhibitor (10 $\mu$ M), KT5823, a specific PKG inhibitor (3 $\mu$ M), or vehicle (DMSO 0.01%) for 30 minutes. Cells were then stimulated with LPS (10 $\mu$ g/mL) for a further 60 minutes, washed and assayed as described bellow. Where indicated cells were treated with BAY41-2272, a NO-independent sGC activator (30 $\mu$ M), for 60 minutes. Concentrations used were determined in preliminary concentration-effect experiments accessing *in vitro* neutrophil chemotaxis. In these experiments we observed no effect of the inhibitors alone or vehicle on neutrophil chemotactic responses to all chemoattractants used (not shown). In selected experiments neutrophils were treated with lyptothieoic acid (LTA, 10 $\mu$ g/mL) exactly as described for LPS.

***In vitro neutrophil chemotaxis.*** Neutrophil chemotaxis was evaluated using a 48-well Boyden chamber (Neuroprobe Inc., Gaithersburg, MD) using 5 $\mu$ m pore size polyvinylpyrrolidone-free polycarbonate membranes as described (23). Chemoattractants (28 $\mu$ L) we placed in the bottom chamber and 50 $\mu$ L of the neutrophil suspension ( $10^6$  cells/mL) were added to the top chamber. The chambers were then incubated for 1 h at 37°C with 5% CO<sub>2</sub>, after which membranes were removed, fixed and stained with Diff-Quick staining kit. The number of neutrophils, which had

migrated to the lower side of the filter, was counted in at least five random fields (1000X magnification). The results are representative of at least three independent experiments performed in triplicate for each sample, and are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. of the number of neutrophils per field. Chemoattractants used were fMLP ( $10^{-7}$ M), leukotriene B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>,  $10^{-8}$ M) or IL-8 (30nM). Migration to medium alone (random migration) was used as negative control.

***Determination of cGMP intracellular levels.*** Measurement of cGMP levels was carried out using a commercial kit (GE Healthcare UK Limited, Buckinghamshire, UK). Neutrophils ( $10^6$  cells) were treated as described, washed and resuspended in 180  $\mu$ L RPMI medium. Cells were immediately frozen and kept at  $-80^{\circ}\text{C}$  until use. Samples were manipulated as recommended by the manufacturer to determine the total cellular cGMP content.

***Flow cytometry.*** Neutrophils were treated as above and immediately fixed with ice-cold 1% paraformaldehyde in PBS. After extensive wash in FACS buffer (2% BSA, 5% FCS, 0.1% sodium azide in PBS), cells were resuspended in 50 $\mu$ L FACS buffer and incubated with PE-labeled mouse IgG<sub>1</sub> anti-human CXCR2 or PE-labeled mouse IgG2a anti-human BLT1 (1:50) for 30 minutes at  $4^{\circ}\text{C}$ . Cells were then washed in FACS buffer and analyzed using a FACScalibur (BD Biosciences, San Jose, CA) with help of Cell Quest software. Data were analyzed using FCS Express 3.0 for Windows.

***Immunofluorescence.*** Neutrophils were treated as described above and GRK-2 expression was evaluated using a rabbit anti-human GRK2 (1:200) and AlexaFluor 594-conjugated anti-rabbit secondary antibody (Invitrogen). Nuclei were counter stained

with DAPI. Images were acquired on an epifluorescence microscope (BX-50, Olympus).

**Westernblotting.** Neutrophils ( $4 \times 10^6$  cells) treated as described were immediately lysed with 80 $\mu$ L boiling lysis buffer (1% SDS, 1mM orthovanadate, 10mM Tris, pH 7.4). Lysates were boiled for 3 minutes, sonicated and boiled for a further 2 minutes. Samples of 5 $\mu$ L were diluted 1:10 and used for protein quantification by the Bradford method. Lysates were mixed with 20 $\mu$ L 5X sample buffer, boiled for 3 minutes and stored at -20°C until use. Protein samples of 30 $\mu$ g were separated on a 10% SDS-PAGE and transferred to PVDF membranes. GRK2 and  $\beta$ -actin were detected using primary rabbit anti-GRK2 and mouse anti- $\beta$ -actin antibodies (1:1000) followed by appropriate HRP-conjugated secondary antibodies (1:10000). Immunoreactive bands were visualized by ECL. Images were acquired and then analyzed with ImageJ software.

**Mice and in vivo procedures.** All animal procedures were approved by and conducted following the guidelines of the Ethics Committee of the Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP-USP, protocol number 181/2008). C57/BL6 male and female mice, weighing 20-25g, were kept in specific pathogen-free (SPF) conditions with free access to food and water.

**Cecal ligation and puncture (CLP).** Cecal ligation and puncture was carried out as described previously (10). In brief, mice were anaesthetized with tribromoethanol (250 mg/Kg), a 1cm midline incision was made on the abdomen. Cecum was exposed and ligated below the ileocecal junction without causing bowel obstruction. A single puncture was made through the cecum with a 21- or 16-gauge needle to induce sublethal



(SL-CLP) or lethal (L-CLP) sepsis, respectively. Peritoneal wall and skin incision were closed, and animals received 1mL saline subcutaneously.

***Pre-treatment protocol.*** Mice were treated with 5 $\mu$ mol/Kg ODQ or 3mg/Kg 1400W by a single subcutaneous injection 30 minutes before CLP. Neutrophil migration to the peritoneal cavity, neutrophil sequestration in lungs (as determined by lung MPO activity), and blood and peritoneal CFU enumeration were carried out 6 hours after CLP as described bellow. In another set of experiments, mice were treated as above and survival was monitored every 12 hours through 72 hours after surgery. Doses used were chosen based on our previous report (24). ODQ was diluted in PBS 1% DMSO and 1400W was dilluted in sterile saline.

***Post-treatment protocol.*** Mice were post-treated with two protocols. In the first, animals were treated with two subcutaneous injections of 5 $\mu$ mol/Kg ODQ, 3 and 12 hours after CLP and survival was monitored for 72 hours after CLP procedure. In the second protocol, animals were treated with three subcutaneous injections of 5 $\mu$ mol/Kg ODQ, 3, 12 and 24 hours after CLP and survival was monitored for 96 hours after CLP procedure.

***Neutrophil migration in vivo.*** Neutrophil migration to the peritoneal cavity was carried out 6 hours after CLP as described (10). Peritoneal cavity was washed using 3mL PBS containing 1mM EDTA. Total cell counts were performed on hemocytometer and differential cell counts were carried out on cytocentrifuge smears stained with Diff-Quick staining kit (Laborclin, Pinhais, PR, Brazil). Results are presented as mean  $\pm$  S.E.M. of the number of neutrophils per cavity.

***Blood and peritoneal CFU enumeration.*** Blood and peritoneal CFU enumeration were carried out 6 hours after CLP as described (10).

**Lung myeloperoxidase activity.** Neutrophil sequestration in lungs was determined by the MPO activity in tissue extracts as described (10), 6 hours after CLP. Lungs were perfused with 3mL of PBS via the right ventricle, removed and transferred to 1.5mL tubes containing pH 4.7 buffer (0.1M NaCl, 0.02M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.015M sodium EDTA). Samples were weighted, frozen and kept at -20°C until use. Upon thawing, tissue was homogenized in buffer, centrifuged at 3000g for 10 minutes and the pellet was subjected to hypotonic lysis (1.5mL of 0.2%NaCl solution followed 30 seconds later by addition of an equal volume of a solution containing 1.6% NaCl and 5% glucose). After a further centrifugation, the pellet was resuspended in 0.05M phosphate buffer (pH 5.4) containing 0.5% hexadecyl-trimethylammonium bromide and re-homogenized. One-milliliter aliquots of the suspension were transferred into 1.5mL tubes followed by three freeze-thaw cycles. The aliquots were then centrifuged for 15 minutes at 3000g before performing the assay. MPO activity in the resuspended pellet was assayed by measuring the change in OD450 nm using tetramethylbenzidine (1.6 mM) and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.5 mM). The reaction was stopped after 30 minutes of incubation at room temperature, by adding 100µL of 4M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and was quantified at 450nm in a spectrophotometer. The neutrophil content was calculated from a standard curve using neutrophils isolated from murine bone-marrow. Results are expressed in relative number of neutrophils per milligram of wet tissue.

**Reagents.** *Escherichia coli* LPS (serotype 0111:B4), *Staphylococcus aureus* lipoteichoic acid (LTA), *N*-[[3-(aminomethyl)phenyl]methyl]-ethanimidamide dihydrochloride (1400W), rhodamine-conjugated phalloidine, bovine serum albumin (BSA), and *N*-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (fMLP) were from Sigma. Percoll was from Amersham Biosciences. [1H-(1,2,4)oxadiazolo(4,3-a)quinoxalin-1-

one (ODQ), (9S,10R,12R)-2,3,9,10,11,12-hexahydro-10-methoxy-2, 9-dimethyl-1-oxo-9, 12-epoxy-1H-diindolo [1,2,3-fg:3',2',1'-kl] pyrrolo [3,4-i] [1,6] benzodiazocine-10-carboxylic acid, methyl ester (KT5823) and leukotriene B4 were from Tocris Biosciences. [5-cyclopropyl-2-[1-(2-fluoro-benzyl)-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-3-yl]pyrimidin-4-ylamine] (BAY 41-2272) was from Calbiochem. Interleukin-8 was from R&D Systems. PE-labeled anti-human CXCR2 and BLT1 antibodies were from BD Biosciences. Anti-human GRK2, anti- $\beta$ -actin and HRP-conjugated secondary antibodies were from Santa Cruz Biotechnology.

***Statistical analysis.*** Data were analyzed with help of GraphPad Prism 4 for Windows. Statistical significance was tested using ANOVA followed by Bonferroni post-test, except for differences in survival rates which were tested using Fisher exact test and bacterial counts which were tested using Mann-Whitney test.  $P < 0.05$  was considered statistically significant.

## RESULTS

***TLR ligands inhibit human neutrophil chemotaxis through a NO-sGC-PKG-dependent pathway.*** Diminished neutrophil responsiveness to chemotactic stimulation during sepsis has been previously shown by our group and others in animals as well as human patients (4). This well correlates with sepsis outcome and experimental data support the involvement of iNOS-derived NO production in this phenomenon (4-8). However the molecular mechanisms involved are currently unknown. To better access the mechanisms underlying neutrophil unresponsiveness to chemotactic stimulation during severe sepsis, we used a model in which isolated human neutrophils were stimulated *ex vivo* with LPS, a TLR4 ligand. This stimulation induced a concentration-dependent decrease in chemotactic responsiveness to the classical neutrophil chemoattractants IL-8, leukotriene B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>) and fMLP (Figure 1A-C).

Treatment of cells with the selective iNOS inhibitor, 1400W, before TLR stimulation, completely restored neutrophil chemotactic responses. This effect was also observed in cells pre-treated with ODQ, a selective sGC inhibitor, or KT5823, a selective inhibitor of the sGC downstream target cGMP-dependent protein kinase (PKG) (Figure 1A-C). Similar results were observed when we used the TLR2 ligand, lipoteichoic acid (LTA). LTA induced a significant decrease in neutrophil responsiveness to IL-8 and fMLP, which could be restored by pre-treatment of cells with pharmacological inhibitors of the components of the NO-sGC-PKG signaling axis (Figure 1D and E).

To further characterize the involvement of the NO-sGC-PKG signaling pathway on the impairment of neutrophil chemotaxis, we used the NO-independent sGC activator, BAY41-2272. As shown in Figure 2A and B, incubation of neutrophils with

BAY lead to a reduced chemotactic response to IL-8 and fMLP similar to that observed with LPS. Additionally, we measured the total cGMP cellular content in neutrophils stimulated with LPS. As depicted in Figure 2C, LPS induced a marked increase in total intracellular cGMP content, which was inhibited by treatment of cells with 1400W or ODQ. Taken together, the data suggest that TLR activation stimulates NO production and activation of the sGC-cGMP-PKG signaling axis, leading to impaired chemotactic responsiveness in human neutrophils.

***LPS induces chemotactic receptor internalization through a NO-sGC-PKG-dependent pathway.*** We next tested whether LPS stimulation lead to chemotactic receptor internalization. Neutrophils incubated with LPS showed diminished membrane expression of the IL-8 receptor CXCR2 and the LTB<sub>4</sub> receptor BLT1 (Figure 3). This effect could be reverted by pre-treatment of cells with pharmacological inhibitors of iNOS, sGC or PKG (Figure 3). This suggested that at least part of the inhibitory effects of LPS on neutrophil migration could be attributed to a heterologous receptor desensitization that depended on the NO-sGC-PKG signaling pathway.

***LPS upregulates GRK-2 expression through a NO-sGC-PKG-dependent pathway.*** Chemoattractants signal through G protein-coupled receptors (GPCR) and their signaling activity is finely regulated by receptor desensitization through the activity of GPCR kinases (GRK). GRKs mediate GPCR desensitization through receptor phosphorylation and targeting for  $\beta$ -arrestin-dependent internalization, thus turning cells hyporesponsive to subsequent GPCR stimulation (25). The observed receptor internalization could thus be explained by an upregulated GRK expression triggered by LPS. Indeed we recently showed that neutrophils isolated from septic patients presented

an increased GRK2 and GRK5 expression (11) and others have shown that *in vitro* LPS stimulation upregulates GRK2 expression in neutrophils (26). Using immunofluorescence and westernblotting analysis we accessed the relative GRK2 expression in human neutrophils stimulated *ex vivo* with LPS. As shown in Figure 4, LPS stimulation upregulates GRK2 expression in human neutrophils. Pre-treatment of cells with 1400W, ODQ or KT5823 prevented LPS-induced GRK2 upregulation, which may explain the reversal of chemotactic receptor internalization by pre-treatment of cells with pharmacological inhibitors of the NO-sGC-PKG signaling pathway.

***Effects of in vivo ODQ treatment in an experimental model of sepsis.*** As our results pointed to the participation of sGC activation on the NO-dependent impairment in neutrophil chemotactic function, we sought to determine the relative contribution of sGC activation to the establishment of neutrophil dysfunction *in vivo*. In this regard, we accessed the *in vivo* effects of GC inhibition in an experimental model of severe sepsis. As shown in Figure 5A, pre-treatment of mice with 1400W or ODQ restored neutrophil migration to the peritoneal cavity. Interestingly, mice pre-treated with 1400W succumbed to infection in a similar rate than that observed in the untreated group whereas mice pre-treated with ODQ presented 50% survival (Figure 5B). Analyzing bacterial infection we found that animals pre-treated with 1400W presented bacterial counts in peritoneum and blood similar to those found in untreated animals (Figure 5C and D, respectively). On the other hand, mice treated with ODQ presented significantly less bacteria in the peritonium and blood (Figure 5C and D, respectively). Moreover, neutrophil sequestration in lungs was prevented by ODQ treatment but not 1400W (Figure 5E). Based on these findings we conclude that the NO-sGC signaling pathway is operative *in vivo* and that sGC inhibition could restore neutrophil function in sepsis.

Moreover these findings suggest that the limitations in using NOS inhibitors in sepsis can be, at least in part, attributed to an interference with the ability of neutrophils to control infection, which cannot be compensated for by restoring neutrophil migratory function. In this sense, sGC inhibition preserves the ability of neutrophils to kill bacteria and control infection probably because it does not interfere directly with NO synthesis. These data therefore demonstrate that sGC inhibition restores neutrophil migration without interfering with neutrophil killing function, thus overcoming one important limitation for the use of NOS inhibitors in sepsis.

***Effect of ODQ treatment on mice survival in a model of sepsis.*** We demonstrated that sGC inhibition in sepsis restored neutrophil migration without impacting neutrophil killing function and that this contributes to an increased survival in mice treated with sGC inhibitors. This encouraged us to test whether sGC inhibition would improve survival of mice after the onset of infection, using a post-treatment protocol consisting of two s.c. injections at 3 and 12 hours after CLP. Mice submitted to CLP and treated with vehicle died within 24-48 hours, a period when ODQ-treated mice showed 50% survival. Survival rates of mice treated with ODQ dropped to 16.7% after 24 hours and remained at the end of the observation period (Figure 6A). We then used a second post-treatment protocol consisting of three s.c. injections of ODQ at 3, 12 and 24 hours. In this second protocol, survival could be maintained at 40% throughout the observation period (96 hours), which was clearly higher than that observed for the untreated group (100% mortality within 48 hours, Figure 6B). We therefore believe that together our results support a detrimental role for sGC activation in sepsis and point to sGC inhibition as a promising potential therapeutic target in sepsis.

## DISCUSSION

Septic subjects develop dysfunctions on multiple physiological systems including the cardiovascular, respiratory, nervous and immune systems (1,2). An innate immune dysfunction observed in sepsis is an inability of neutrophils to respond to chemotactic stimulation *in vivo* and *in vitro* (4). This impairs an efficient control of bacterial infection and may contribute to the aggravation of sepsis. The process of neutrophil dysfunction in sepsis is largely dependent on iNOS-derived NO. However in experimental models, NOS inhibition *in vivo* resulted in increased mortality and a recent phase III clinical trial using a NO synthase inhibitor resulted in increased mortality of septic patients (5,15,16). This limits the use of NOS inhibitors in sepsis therapy. More promising results were observed in the clinics using inhibitors of the downstream effector of NO, the enzyme sGC (17-19). The beneficial effects of sGC inhibitors on the cardiovascular function in sepsis have long been appreciated. However the participation of sGC on the establishment of neutrophil dysfunction in sepsis and the modulation of this process by sGC inhibitors has never been addressed.

We addressed for the first time the relative contribution of sGC activation to the establishment of neutrophil dysfunction in sepsis. We used a model in which TLR stimulation of human neutrophils lead to decreased neutrophil chemotactic responsiveness to the classical chemotactic mediators IL-8, LTB<sub>4</sub> and fMLP. In this model treatment of human neutrophils with pharmacological inhibitors to different components of the NO-sGC-PKG signaling pathway prevented the effects of LPS on neutrophil responsiveness to chemotactic stimuli. Furthermore, using LTA, another TLR ligand that activates TLR2, we observed similar results suggesting that the NO-dependent impairment of neutrophil chemotactic function is a common mechanism



shared by different TLR ligands and is largely attributed to the activation of the NO-sGC-PKG signaling axis.

Our further study on the mechanisms triggered by LPS on neutrophils demonstrated that LPS stimulation leads to internalization of the IL-8 receptor, CXCR2, and the LTB<sub>4</sub> receptor BLT1. The effect of LPS on CXCR2 internalization has been previously described by others (27,28) although the mechanisms involved in this process remained unaddressed. Inhibition of the different components of the NO-sGC-PKG signaling pathway recovered CXCR2 and BLT1 membrane expression in neutrophils stimulated with LPS. This suggests that LPS is able to induce heterologous desensitization of neutrophils to IL-8 and LTB<sub>4</sub> stimulation through a mechanism involving the activation of the NO-sGC-PKG signaling pathway. We and others have previously demonstrated a crucial role played by CXCR2 and LTB<sub>4</sub> receptor in sepsis. Inhibition of CXCR2 or LTB<sub>4</sub> receptor signaling rendered animals more susceptible to infection by impairing neutrophil migration to the primary infectious focus (12,29). As LPS induced internalization of both CXCR2 and LT1 receptors and decreased neutrophil responsiveness to IL-8 and LTB<sub>4</sub>, we can suggest that this LPS effect could contribute to worsen the clinical outcome in septic patients.

We have also observed unresponsiveness to fMLP in neutrophils stimulated with LPS. This suggests that LPS and the activation of the NO-sGC-PKG signaling pathway has more profound effects on neutrophil responsiveness to chemotactic stimulation since fMLP engages a different receptor and signals through a different signaling pathway (30). The molecular mechanisms underlying neutrophil unresponsiveness to fMLP were not addressed in the present study and are currently being examined.

LPS-induced chemotactic receptor internalization was paralleled by an increase in GRK2 expression. This increased GRK2 expression was also blocked by previous

treatment of cells with inhibitors of the NO-sGC-PKG pathway. GRK2 upregulation in neutrophils by LPS treatment has been recently reported (26), although the mechanisms involved in this phenomenon were not investigated. More recently, we have shown that, besides LPS, neutrophil stimulation with LTA leads to neutrophil unresponsiveness to chemotactic stimulation that correlates with increased GRK2 expression and decreased CXCR2 membrane expression (13). Based on these findings it can be proposed that both TLR2 and TLR4 ligands induce NO production and consequent activation of the sGC-cGMP-PKG pathway. This would lead to increased expression of GRK2 and chemotactic receptor internalization, rendering neutrophils unresponsive to chemotactic stimulation. Moreover upregulation of GRK2 expression would represent a mechanism of long-term desensitization of neutrophils to chemotactic stimuli that could be in place during septic episodes.

Recently Clements and coworkers reported that NO could inhibit neutrophil chemotaxis through the formation of peroxynitrite (31). Tyrosine nitration of actin filaments in neutrophils would then impair neutrophil mobility and render cells unable to migrate. This could be happening during sepsis and would argue against our findings as the mechanisms used by NO to impair neutrophil migration would involve the formation of peroxynitrite and not the activation of the NO-sGC-PKG signaling pathway. However nitration of actin filaments would implicate in a general migratory dysfunction of neutrophils which is not what is observed *in vivo*. Neutrophils from septic rats present increased migration to the CCR2 ligands, CCL2 and CCL7 (9). We have observed a similar profile in mice and human septic patients (Souto et al, manuscript in preparation), suggesting that during sepsis neutrophils shift their responsiveness to chemotactic mediators but are still able to migrate. Therefore the

activation of the NO-sGC-PKG signaling pathway is a more likely mechanism by which NO interferes with neutrophil chemotactic function during severe sepsis.

Our in vitro results reveal a point where the beneficial and the detrimental roles of NO in sepsis diverge. NO plays a beneficial role as an important mediator of bacterial killing which is largely dependent on the reactive nature of NO and the attack of cellular components by reactive nitrogen species (32,33). On the other hand, the detrimental effect of NO on neutrophil responses to chemotactic stimuli seems to depend on the activation of the sGC-cGMP-PKG signaling pathway. In addition the NO-sGC-PKG signaling pathway also contributes significantly to the cardiovascular collapse observed in severe sepsis (20,22). Therefore the beneficial role of NO in sepsis is reactive in nature and largely sGC-independent whereas the detrimental role can be attributed to the activation of the NO-sGC-PKG signaling pathway and thus is mainly sGC-dependent.

Based on these assumptions, we reasoned that interfering with sGC activity would represent a better therapeutic target in sepsis than inhibition of NO synthesis. sGC inhibition would interfere with the detrimental role of NO but leave NO production and the host's microbicidal activity intact. Intact iNOS-derived NO production may have further benefits besides infection control. In this sense, it was demonstrated, in a model of TNF-induced shock, that the beneficial effects of sGC inhibition required intact iNOS activity (34). Since this model did not involve infection, one may speculate that maintaining iNOS activity while inhibiting its signaling through sGC has beneficial effects over other systems as well.

We compared the effects of iNOS and sGC inhibition in an experimental model of sepsis. We show that inhibition of iNOS activity recovered neutrophil migratory function but neutrophils were unable to control infection. In contrast, sGC inhibition

resulted in recover of neutrophil migratory function together with efficient control of infection. We therefore reason that the limitations in using NOS inhibitors in sepsis could be attributed, at least in part, to an interference on the ability of neutrophils (and probably other cells of the innate immune system) to produce NO and kill bacteria. In this sense sGC inhibition could recover neutrophil migratory function without interfering with neutrophil capacity of NO production and bacterial killing. The modulation of neutrophil migration by sGC activity *in vivo* was recently demonstrated by our group (24). In this study it was shown that sGC activation by NO inhibits neutrophil migration through the modulation of ICAM-1 expression by endothelium. Our study demonstrates that NO-dependent activation of sGC is able to directly inhibit neutrophil migration. Although the modulation of endothelial ICAM-1 expression by sGC has never been evaluated in the context of sepsis, one may speculate that both mechanisms act synergistically *in vivo* to inhibit neutrophil migration.

We further tested our hypothesis in a more clinically relevant setting. We treated mice with ODQ 3 and 12 hours after the onset of sepsis and found a 50% survival at 24 hours post-CLP compared to the 100% mortality in the untreated group. After this period, survival decreased to 16.7% and remained throughout the observation period. The lower efficacy seen on post-treatment protocol, relative to the pre-treatment protocol, may be explained by a time-dependent effectiveness of sGC inhibition in experimental sepsis, as reported previously (21). In these studies, vascular reactivity was only restored by ODQ when administered 2 or 24 hours after LPS injection, a time window not covered by our protocol. We then used a second post-treatment protocol in which three ODQ administrations were used (3, 12 and 24 hours). Using this protocol, we could observe a 40% survival in the treated group whereas untreated mice showed

100% mortality within 24-48 hours. Taken together, these results strongly support our hypothesis and point to the potential of sGC inhibition as a therapeutic target in sepsis.

This proposition finds clinical support in early studies using the unspecific sGC inhibitor methylene blue (MB) in severe septic subjects. These studies revealed a beneficial outcome for critically ill patients treated with MB as an adjuvant therapy in sepsis. Recently some groups proposed the consideration of a revisited clinical use of MB in intensive care units (19). Taken together, our data point to sGC inhibition as a promising therapeutic approach in sepsis. However it remains necessary large clinical trials to definitely demonstrate the efficacy of sGC inhibitors in sepsis and to develop a reproducible protocol for the use of these molecules in the clinics.

The present study shed new light on previous studies by our group and others that describe the involvement of NO on the impairment of neutrophil migration. We show for the first time that the effects of NO on neutrophil migratory function in sepsis is dependent on sGC activation. Our present data also provide, for the first time, cellular and molecular support for the potential clinical benefits of sGC inhibition as a therapy in sepsis. Inhibition of NO synthesis or sGC activity is often based on the roles played by NO in the cardiovascular changes observed in sepsis. Less attention is drawn to the inflammatory/immune roles of NO. The unexpected outcome of NO synthesis inhibition in animal studies and clinical trials may have stemmed, at least in part, from the inhibition of the beneficial role of NO as a microbicidal mechanism used by cells of the innate immune system. Our results suggest that, besides the positive cardiovascular effects of sGC inhibition, this approach could also have a beneficial effect on the immune/inflammatory component of sepsis. sGC inhibition would then emerge as a potential therapeutic target in sepsis since it could restore neutrophil migration without

compromising neutrophil microbicidal activity, thus bypassing the limitations of NO synthesis inhibition.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

We acknowledge the technical assistance of Simone Lima and Marcela Sousa (UERJ) and Walter Turato (FMRP-USP) with FACS data acquisition. We thank Prof. C. N. Paiva (IMPPG, UFRJ) for discussions and critical reading of the manuscript.

**REFERENCES**

1. Russel JA: Management of sepsis. *N. Engl. J. Med.* 355:1699-1713, 2006.
2. Rittirsch D, Flierl MA, Ward PA: Harmful molecular mechanisms in sepsis. *Nat. Rev. Immunol.* 8:776-787, 2008.
3. Cavazzoni-Zanotti SL, Hollenberg, SM: Cardiac dysfunction in severe sepsis and septic shock. *Curr. Opin. Crit. Care* 15:392-397, 2009.
4. Reddy RC, Standiford TJ: Effects of sepsis on neutrophil chemotaxis. *Curr. Opin. Hematol.* 17:18-24, 2010.
5. Benjamim CF, Silva JS, Fortes ZB, Oliveira MA, Ferreira SH, Cunha FQ: Inhibition of leukocyte rolling by nitric oxide during sepsis leads to reduced migration of active microbicidal neutrophils. *Infect. Immunity* 70:3602-3610, 2002.
6. Crosara-Alberto DP, Darini ALC, Inoue RY, Silva JS, Ferreira SH, Cunha FQ: Involvement of NO in the failure of neutrophil migration during sepsis induced by *Staphylococcus aureus*. *Br. J. Pharmacol.* 136:645-658, 2002.
7. Benjamim CF, Ferreira SH, Cunha FQ: Role of nitric oxide in the failure of neutrophil migration in sepsis. *J. Infect. Dis.* 182:214-223, 2000.
8. Tavares-Murta BM, Zapparoli M, Ferreira RB, Silva-Vergara ML, Oliveira CH, Murta EF, Ferreira SH, Cunha FQ: Failure of neutrophil chemotactic function in septic patients. *Crit. Care Med.* 30:1056-1061, 2002.
9. Speyer CL, Gao H, Rancilio NJ, Neff TA, Huffnagle GB, Sarma JV, Ward PA: Novel chemokine responsiveness and mobilization of neutrophils during sepsis. *Am. J. Pathol.* 165:2187-2196, 2004.



10. Alves-Filho JC, Freitas A, Russo M, Cunha FQ: Toll-like receptor 4 signaling leads to neutrophil migration impairment in polymicrobial infection. *Crit. Care Med.* 34:461-470, 2004.
11. Arraes, SMA, de Freitas MS, Silva SV, Paula Neto HA, Alves Filho JC, Auxiliadora Martins M, Basile-Filho A, Tavares-Murta BM, Barja-Fidalgo C, Cunha FQ: Impaired neutrophil chemotaxis in sepsis associates with GRK expression and inhibition of actin assembly and tyrosine phosphorylation. *Blood* 108:2906-2913, 2006.
12. Rios-Santos F, Alves-Filho JC, Souto FO, Spiller F, Freitas A, Lotufo CMC, Soares MB, dos Santos RR, Teixeira MM, Cunha FQ: Down-regulation of CXCR2 on neutrophils in severe sepsis is mediated by inducible nitric oxide synthase-derived nitric oxide. *Am. J. Resp. Crit. Care Med.* 175:490-497, 2007.
13. Alves-Filho JC, Freitas A, Souto FO, Spiller F, Paula-Neto HA, Silva JS, Gazinelli RT, Teixeira MM, Ferreira SH, Cunha FQ: Regulation of chemokine receptor by Toll-like receptor 2 is critical to neutrophil migration and resistance to polymicrobial sepsis. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 106:4018-4023, 2009.
14. Bateman RM, Sharpe MD, Ellis CG: Bench-to-bedside review: Microvascular dysfunction in sepsis – hemodynamics, oxygen transport, and nitric oxide. *Crit. Care* 7:359-373, 2003.
15. López A, Lorente JA, Steingrub J, Bakker J, McLuckie A, Willatts S, Brockway M, Anzueto A, Holzapfel L, Breen D, Silverman MS, Takala J, Donaldson J, Arneson C, Grove G, Grossman S, Grover R: Multiple-center, randomized, placebo-controlled, double-blind study of the nitric oxide synthase inhibitor 546C88: effect on survival in patients with septic shock. *Crit. Care Med.* 32:21-30, 2004.

16. Puliti M, von Hunolstein C, Bistoni F, Orefici G, Tissi L: Inhibition of nitric oxide synthase exacerbates group B Streptococcus sepsis and arthritis in mice. *Infect. Immunity* 72:4891-4894, 2004.
17. Kirov MY, Evgenov OV, Evgenov NV, Egorina EM, Sovershaev MA, Sveinbjörnsson B, Nedashkovsky EV, Bjertnaes LJ : Infusion of methylene blue in human septic shock: a pilot, randomized, controlled study. *Crit. Care Med.* 29:1860–1867, 2001.
18. Kwok ESH, Howes D: The use of methylene blue in sepsis: a systematic review. *J. Intensive Care Med.* 21:359-363, 2006.
19. Evora PRB, Rodrigues AF, Vicente WVA, Vicente YA, Basseto S, Basile Filho A, Capellini VK: Is the cyclic GMP system underestimated by intensive care and emergency teams? *Med. Hypotheses* 69:564–567, 2007.
20. Silva-Santos JE, Terluk MR, Assreuy J: Differential involvement of guanylate cyclase and potassium channels in nitric oxide-induced hyporesponsiveness to phenylephrine in endotoxemic rats. *Shock* 17:70–76, 2002.
21. Fernandes D, Silva-Santos JE, Duma D, Villela CG, Barja-Fidalgo C, Assreuy J: Nitric oxide-dependent reduction in soluble guanylate cyclase functionality accounts for early lipopolysaccharide-induced changes in vascular reactivity. *Mol. Pharmacol.* 69:983–990, 2006.
22. Hauser B, Bracht H, Matejovic M, Radermacher P, Venkatesh B: Nitric oxide synthase inhibition in sepsis? Lessons learned from large animal studies. *Anesth. Analg.* 101:488-498, 2005.
23. Coelho AL, de Freitas MS, Mariano-Oliveira A, Oliveira-Carvalho AL, Zingali RB, Barja-Fidalgo C: Interaction of disintegrins with human neutrophils induces cytoskeleton reorganization, focal adhesion kinase activation, and extracellular-

regulated kinase-2 nuclear translocation, interfering with the chemotactic function. *FASEB J.* 15:1643-1645, 2001.

24. Dal-Secco D, Moreira AP, Freitas A, Silva JS, Rossi MA, Ferreira SH, Cunha FQ: Nitric oxide inhibits neutrophil migration through a mechanism dependent on ICAM-1: role of soluble guanylate cyclase. *Nitric Oxide* 15:77-86, 2006.

25. Vroon A, Heijnen CJ, Kavelaars A: GRKs and arrestins: regulators of migration and inflammation. *J. Leukoc. Biol.* 80:1214-1221, 2006.

26. Fan J, Malik AB: Toll-like receptor 4 (TLR4) signaling augments chemokine-induced neutrophil migration by modulating cell surface expression of chemokine receptors. *Nat. Med.* 9:315-321, 2003.

27. Khandaker MH, Xu L, Rahimpour R, Mitchell G, DeVries ME, Pickering JG, Singhal SK, Feldman RD, Kelvin DJ: CXCR1 and CXCR2 are rapidly down-modulated by bacterial endotoxin through a unique agonist-independent, tyrosine kinase-dependent mechanism. *J. Immunol.* 161:1930-1938, 1998.

28. van den Blink B, Branger J, Weijer S, Gupta A, van Deventer SJ, Peppelenbosch MP, van der Poll T: p38 mitogen activated protein kinase is involved in the downregulation of granulocyte CXC chemokine receptors 1 and 2 during human endotoxemia. *J. Clin. Immunol.* 24:37-41, 2004.

29. Rios-Santos F, Benjamim CF, Zavery D, Ferreira SH, Cunha FQ: A critical role of leukotriene B4 in neutrophil migration to infectious focus in cecal ligation and puncture sepsis. *Shock* 19:61-65, 2003.

30. Heit B, Tavener S, Raharjo E, Kubes P: An intracellular signaling hierarchy determines direction of migration in opposing chemotactic gradients. *J. Cell Biol.* 159:91-102, 2002.

31. Clements MK, Siemsen DW, Swain SD, Hanson AJ, Nelson-Overton LK, Rohn TT, Quinn MT: Inhibition of actin polymerization by peroxynitrite modulates neutrophil functional responses. *J. Leukoc. Biol.* 73:344-355, 2003.
32. Kaplan SS, Lancaster JR, Basford RE, Simmons RL: Effect of nitric oxide on staphylococcal killing and interactive effect with superoxide. *Infect. Immunity* 64:69-76, 1996.
33. Fierro IM, Nascimento da Silva V, Arruda MAB, Freitas MS, Plotkowski MC, Cunha FQ, Barja-Fidalgo C: Induction of NOS in rat blood PMN in vivo and in vitro: modulation by tyrosine kinase and involvement in bactericidal activity. *J. Leukoc. Biol.* 65:1-7, 1999.
34. Cauwels A, Van Molle W, Janssen B, Everaerd B, Huang P, Fiers W, Brouckaert P: Protection against TNF-induced lethal shock by soluble guanylate cyclase inhibition requires functional inducible nitric oxide synthase. *Immunity* 13:223-231, 2000.

**FOOTNOTES**

1. Abbreviations used. CLP: cecal ligation and puncture; GRK: G protein-coupled receptor kinase; iNOS: inducible nitric oxide synthase; LTA: lipoteichoic acid; LTB<sub>4</sub>: leukotriene B<sub>4</sub>; MB: methylene blue; MPO: myeloperoxidase; PKG: cGMP-dependent protein kinase; sGC: soluble guanylate cyclase.

2. Present address to J.C.A-F: Department of Immunology, Infection and Inflammation, University of Glasgow, Glasgow, UK.

**FIGURE LEGENDS**

**Figure 1. *TLR ligands inhibit human neutrophil chemotaxis through a NO-GC-PKG-dependent pathway.*** Neutrophils were treated for 30 minutes with selective pharmacological inhibitors of iNOS (1400W, 30 $\mu$ M), sGC (ODQ, 10 $\mu$ M) or PKG (KT, 3 $\mu$ M) and stimulated for a further 60 minutes with LPS (10 $\mu$ g/mL, panels A-C) or LTA (10 $\mu$ g/mL, panels D and E). After washing, cells were assayed for chemotaxis in response to IL-8 (30nM, A), LTB<sub>4</sub> (10<sup>-8</sup>M, B and D) or fMLP (10<sup>-7</sup>M, C and E). Data represent mean  $\pm$  S.E.M. of the number of neutrophils per 1000X field counted under optical microscopy. Data derives from 3 independent experiments. \* indicates significant differences relative to control neutrophils migrating in response to stimuli.

**Figure 2. *Increased intracellular cGMP levels associates with decreased neutrophil responsiveness to chemotactic stimuli.*** Neutrophils were incubated for 60 minutes with the GC activator BAY41-2272 (BAY) and assayed for chemotactic response to IL-8 (30nM, A) or fMLP (10<sup>-7</sup>M, B). Data represent mean  $\pm$  S.E.M. of the number of neutrophils per 1000X field counted under optical microscopy. Data derives from 3 independent experiments. \* indicates significant differences relative to control neutrophils migrating in response to stimuli. (C) Total intracellular cGMP content was accessed in cell extracts of human neutrophils incubated as described in Figure 1. Data represent mean  $\pm$  S.E.M. of cGMP content (fmol) per 10<sup>6</sup> cells in 4 independent experiments.

**Figure 3. *LPS induces chemotactic receptor internalization through a NO-GC-PKG-dependent pathway.*** CXCR2 (left panels) and BLT1 (right panels) membrane

expression were accessed by FACS analysis in neutrophils treated as described in Figure 1. Histograms represent one representative out of 4 independent experiments. In all histograms control cells (black line), cells treated with LPS (dark gray line) and cells treated with inhibitors before LPS treatment (light gray line) are represented. Upper histograms represent cells pre-treated with 1400W. Middle histograms represent cells pre-treated with ODQ. Lower histograms represent cells pre-treated with KT. Graphs are a representation of the FACS data and indicates CXCR2 (left) or BLT1 (right) mean fluorescence intensity (MFI). Data is mean  $\pm$  S.E.M. from 4 independent experiments. \* represents significant difference relative to control cells.

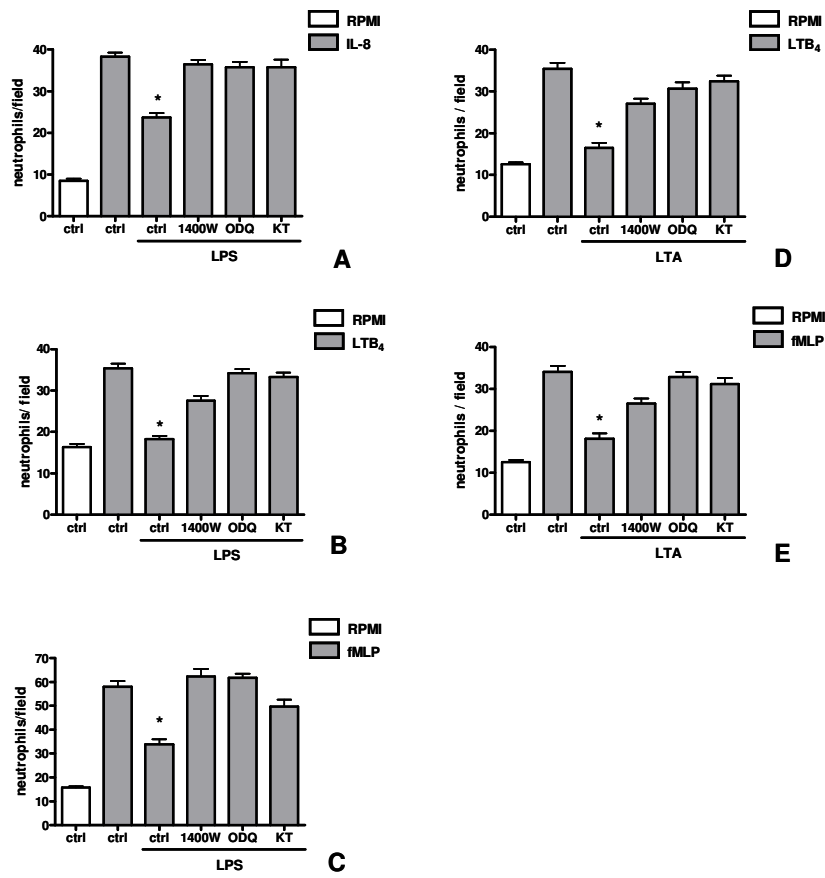
**Figure 4. *LPS upregulates GRK-2 expression through a NO-GC-PKG-dependent pathway.*** (Upper panel) Immunofluorescence analysis of neutrophils treated as in Figure 1. GRK2 is visualized as red fluorescence (AlexaFluor-594) and nuclei as blue (DAPI). Images show a representative experiment and graph shows the quantification of 3 independent experiments. \* indicates significant differences relative to control cells. (Lower panel) Westernblotting analysis of neutrophils treated as in Figure 1. Effect of 1400W (left), ODQ (middle) and KT (right) on the LPS-induced increase in GRK2 expression is presented. One representative experiment out of three is presented. Quantification of GRK2 expression relative to the house-keeping marker  $\beta$ -actin is represented in numbers, considering GRK2 expression in control cells as 1. \* indicates significant differences relative to control cells.

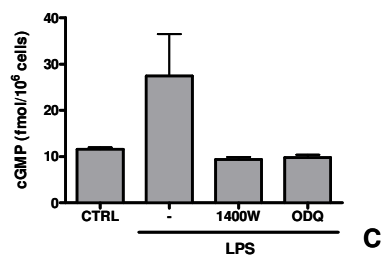
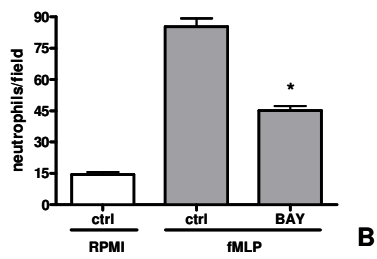
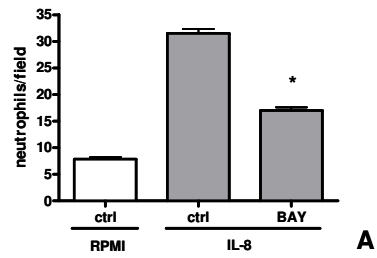
**Figure 5. *Effects of iNOS or sGC inhibition in an experimental model of sepsis.*** (A) Absolute neutrophil numbers in peritoneal cavity of mice submitted to sublethal CLP (SL-CLP), lethal CLP (L-CLP) or L-CLP 30 minutes after treatment with ODQ

(5 $\mu$ mol/kg, s.c.) or 1400W (3mg/kg, s.c.). Data represent mean  $\pm$  S.E.M. of the number of neutrophils per cavity and \* indicates significant difference relative to SL-CLP group. (B) Survival curve for mice submitted to L-CLP 30 minutes after ODQ or 1400W treatment. Graph shows the percent survival through the 72 hour observation period. Mice undergone surgery but receiving no punctures (SHAM) were used as controls. N=8 for each experimental group. (C and D) Bacterial CFU counts in peritoneal cavity (C) and in blood (D) of mice submitted to SL-CLP, L-CLP or L-CLP 30 minutes after treatment with ODQ or 1400W. Data represent the log of the CFU count present in peritoneal cavity (C) and blood (D) and \* indicate significant difference relative to L-CLP group. (E) Neutrophil numbers in lung extracts of mice submitted to SL-CLP, L-CLP or L-CLP 30 minutes after treatment with ODQ or 1400W. Data represent mean  $\pm$  S.E.M. of the number of neutrophils per mg of wet tissue. \* indicates significant difference relative to SL-CLP group.

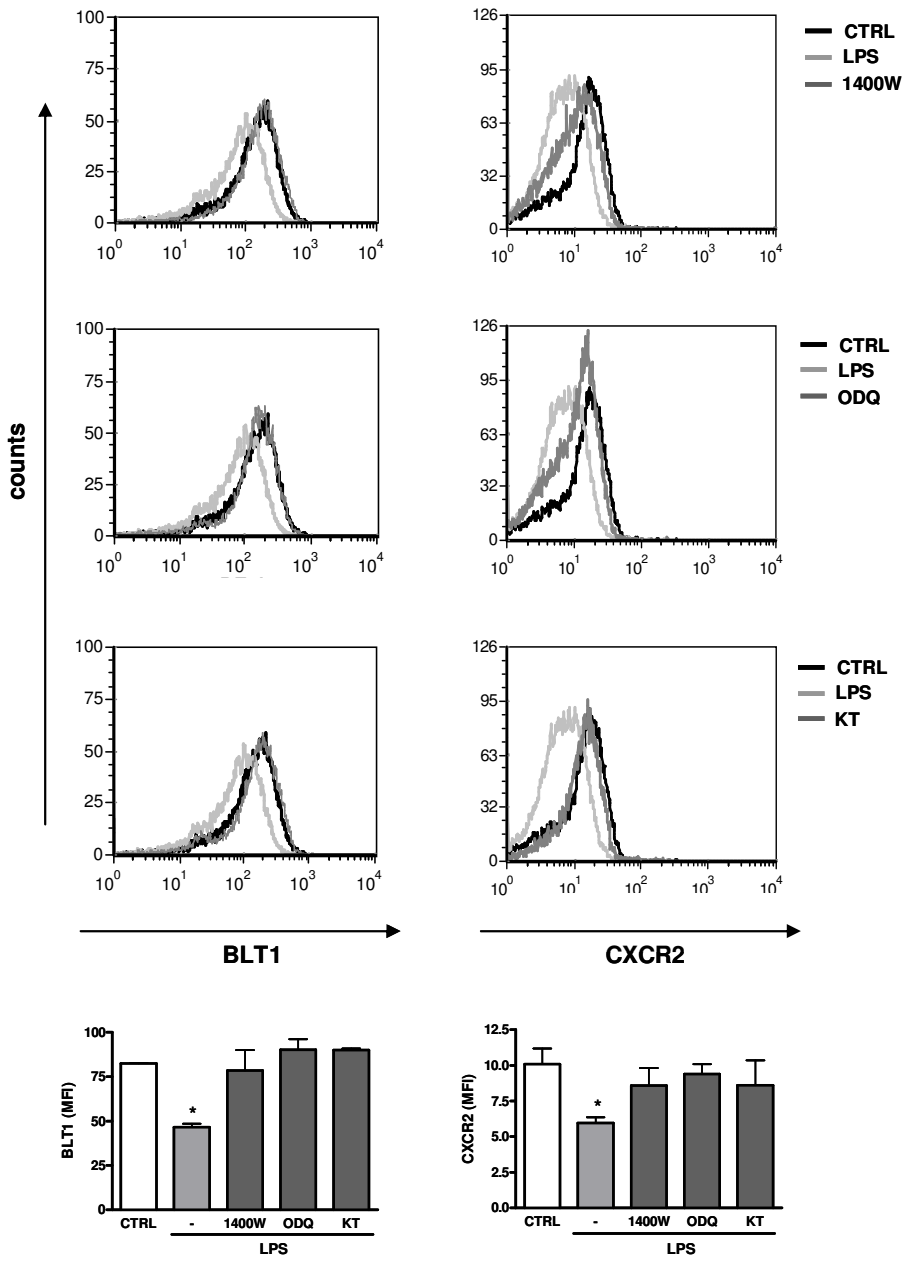
**Figure 6. *Post-treatment with ODQ improves survival in an experimental model of severe sepsis.*** (A) Survival curve for mice treated with ODQ 3 and 12 hours after CLP procedure. ODQ doses were the same as in Figure 5B and SHAM mice were used as controls. Graph shows the percent survival through the 72 hour observation period. N=6 for each experimental group. (B) Survival curve for mice treated with ODQ 3, 12 and 24 hours after CLP procedure. ODQ doses were the same as in A and SHAM mice were used as controls. Graph shows the percent survival through the 96 hour observation period. N=10 for each experimental group.

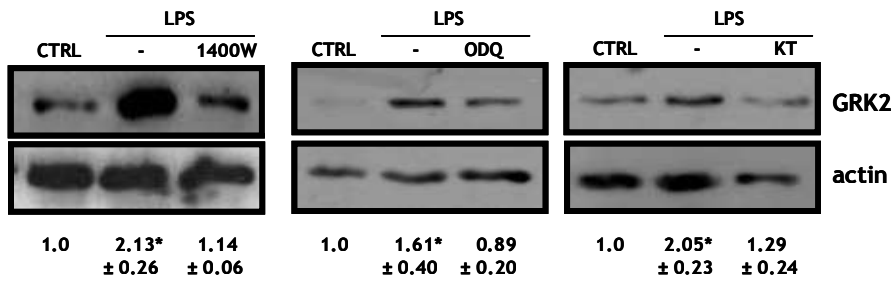
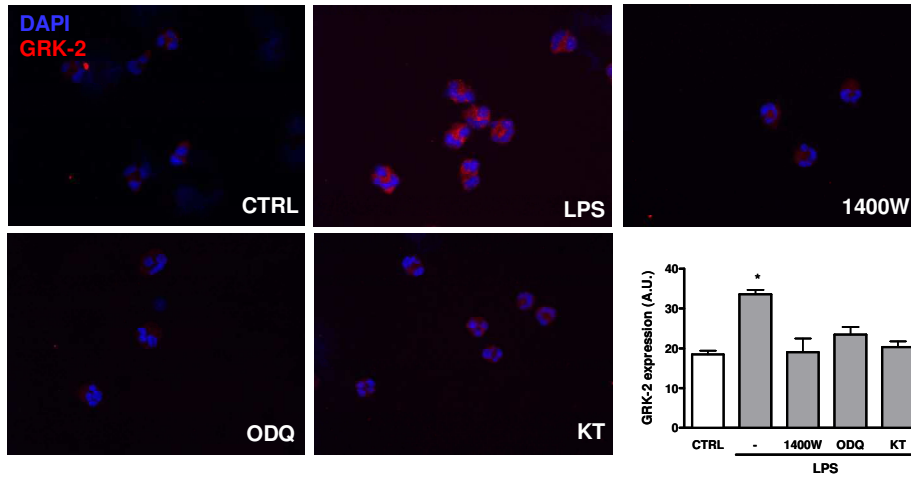


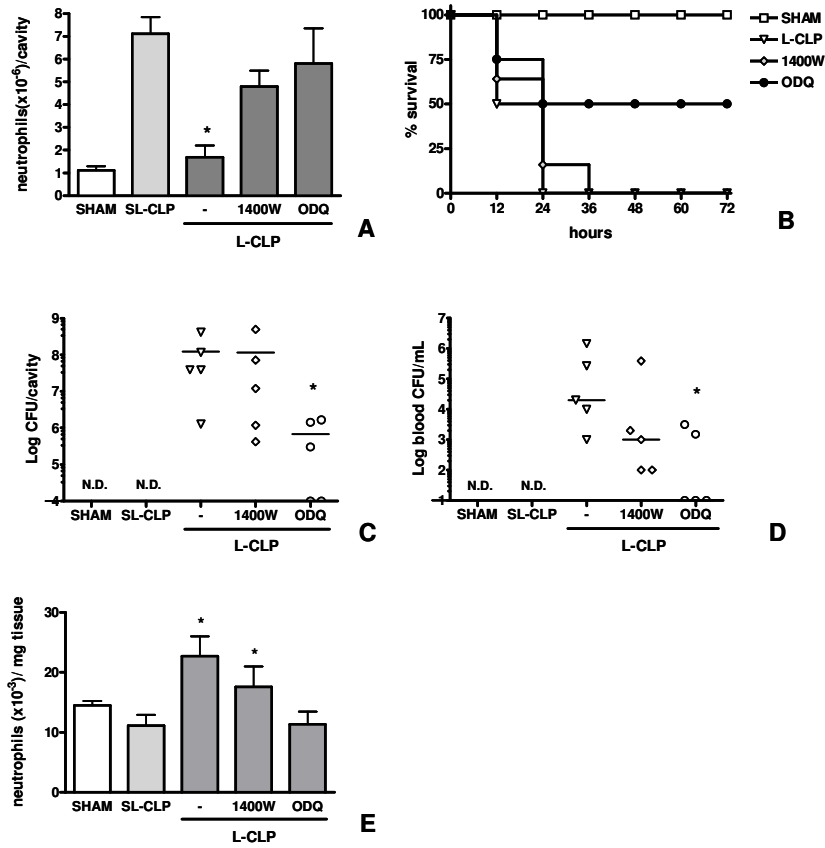
Paula-Neto *et al.* – Figure 1

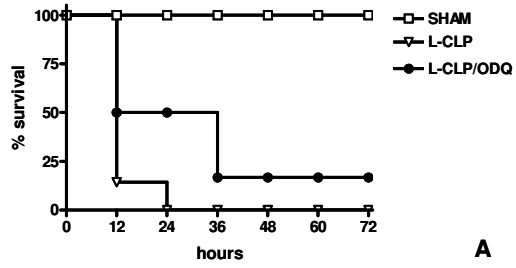
Paula-Neto *et al.* – Figure 2

Paula-Neto *et al.* – Figure 3

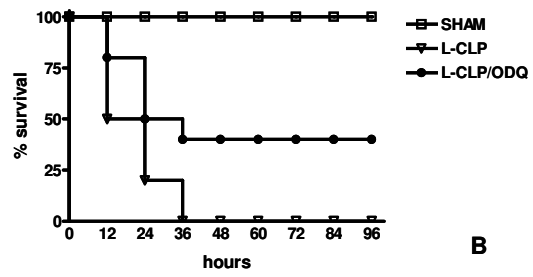


Paula-Neto *et al.* – Figure 4

Paula-Neto *et al.* – Figure 5

Paula-Neto *et al.* – Figure 6

A



B

## ANEXO II

Artigos publicados como co-autor durante o período de Doutorado.

**Artigo I.** "IMPAIRED NEUTROPHIL CHEMOTAXIS IN SEPSIS ASSOCIATES WITH GRK EXPRESSION AND INHIBITION OF ACTIN ASSEMBLY AND TYROSINE PHOSPHORYLATION", dos autores: Sandra M. Arraes, Marta S. Freitas, Simone V. da Silva, **Heitor A. Paula Neto**, José Carlos Alves-Filho, Maria Auxiliadora Martins, Aníbal Basile-Filho, Beatriz M. Tavares-Murta, Christina Barja-Fidalgo e Fernando Q. Cunha, publicado na revista *Blood*. em 2006 (*Blood*, 2006, 108: 2906-2913).

**Artigo II.** "REGULATION OF CHEMOKINE RECEPTOR BY TOLL-LIKE RECEPTOR 2 IS CRITICAL TO NEUTROPHIL MIGRATION AND RESISTANCE TO POLYMICROBIAL SEPSIS", dos autores: José Carlos Alves-Filho, Andressa Freitas, Fabricio O. Souto, Fernando Spiller, **Heitor A. Paula Neto**, João S. Silva, Ricardo T. Gazinelli, Mauro M. Teixeira, Sergio H. Ferreira e Fernando Q. Cunha, publicado na revista *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* em 2009 (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 2009, 106: 4018-4023).

# blood

2006 108: 2906-2913  
Prepublished online Jul 18, 2006;  
doi:10.1182/blood-2006-05-024638

## **Impaired neutrophil chemotaxis in sepsis associates with GRK expression and inhibition of actin assembly and tyrosine phosphorylation**

Sandra Mara A. Arraes, Marta S. Freitas, Simone V. da Silva, Heitor A. de Paula Neto, Jose Carlos Alves-Filho, Maria Auxiliadora Martins, Anibal Basile-Filho, Beatriz M. Tavares-Murta, Christina Barja-Fidalgo and Fernando Q. Cunha

---

Updated information and services can be found at:

<http://bloodjournal.hematologylibrary.org/cgi/content/full/108/9/2906>

Articles on similar topics may be found in the following *Blood* collections:

[Cell Adhesion and Motility](#) (789 articles)

[Signal Transduction](#) (1920 articles)

[Chemokines, Cytokines, and Interleukins](#) (530 articles)

[Phagocytes](#) (944 articles)

---

Information about reproducing this article in parts or in its entirety may be found online at:

[http://bloodjournal.hematologylibrary.org/misc/rights.dtl#repub\\_requests](http://bloodjournal.hematologylibrary.org/misc/rights.dtl#repub_requests)

Information about ordering reprints may be found online at:

<http://bloodjournal.hematologylibrary.org/misc/rights.dtl#reprints>

Information about subscriptions and ASH membership may be found online at:

<http://bloodjournal.hematologylibrary.org/subscriptions/index.dtl>

Blood (print ISSN 0006-4971, online ISSN 1528-0020), is published semimonthly by the American Society of Hematology, 1900 M St, NW, Suite 200, Washington DC 20036.

Copyright 2007 by The American Society of Hematology; all rights reserved.





## Impaired neutrophil chemotaxis in sepsis associates with GRK expression and inhibition of actin assembly and tyrosine phosphorylation

Sandra Mara A. Arraes, Marta S. Freitas, Simone V. da Silva, Heitor A. de Paula Neto, Jose Carlos Alves-Filho, Maria Auxiliadora Martins, Anibal Basile-Filho, Beatriz M. Tavares-Murta, Christina Barja-Fidalgo, and Fernando Q. Cunha

**The deregulation of inflammatory response during sepsis seems to reflect the overproduction of mediators, which suppress leukocyte functions. We investigated the intracellular mechanisms underlying the inability of neutrophils from severe septic patients to migrate toward chemoattractants. Patients with sepsis (52) and 15 volunteers were prospectively enrolled. Patients presented increased circulating levels of tumor necrosis factor- $\alpha$ , interferon- $\gamma$ , interleukin (IL)-8, and IL-10. Patients showed reduced neutrophil chemotaxis to formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (FMLP), leukotriene**

**B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>) or IL-8. No difference in the transcription or expression of the IL-8 receptor, CXCR1, was detected in neutrophils from controls and patients. However, septic neutrophils failed to increase tyrosine phosphorylation and actin polymerization in response to IL-8 or LTB<sub>4</sub>. In contrast, septic neutrophils, similar to controls, showed phagocytic activity that induced actin polymerization and augmented phosphotyrosine content. Treatment of control neutrophils with cytokines and lipopolysaccharide (LPS) to mimic endogenous septic environment inhibited actin polymerization and ty-**

**rosine phosphorylation in response to IL-8 or LTB<sub>4</sub>. High expression of G protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2) and GRK5 was detected in septic neutrophils and control cells treated with cytokines plus LPS. Data suggest that endogenous mediators produced during sepsis might continually activate circulating neutrophils, leading to GRK activation, which may induce neutrophil desensitization to chemoattractants. (Blood. 2006;108:2906-2913)**

© 2006 by The American Society of Hematology

### Introduction

Sepsis is a complex clinical syndrome resulting from a damaging host response to infection.<sup>1</sup> In the United States, more than 700 000 patients per year develop sepsis, with mortality rates reported to vary between 30% and 70%, despite the best available supportive care.<sup>2</sup>

Polymorphonuclear neutrophils (PMNs) play the first line in the host defense against microorganisms, being recruited to the inflammatory sites by chemoattractants such as leukotriene B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>) and chemokines.<sup>3,4</sup> Once emigrated, these leukocytes are able to phagocytose and to generate large amounts of reactive oxygen and nitrogen species, such as hydrogen peroxide and nitric oxide, which are crucial products for the microbicidal activity of these cells.<sup>5,6</sup> As neutrophils appear to play a crucial role in the control of the infectious process, one can hypothesize that a deficient migratory ability of neutrophils may aggravate infections. Indeed, impairment of neutrophil migration has been reported in leukemia,<sup>7</sup> diabetes,<sup>8</sup> and AIDS,<sup>9</sup> diseases associated with high susceptibility to infection. Furthermore, previous studies from our group showed that failure of neutrophil migration is observed in severe sepsis induced by cecal ligation and puncture and *Staphylococcus aureus* administration.<sup>10,11</sup> In these lethal models, failure of neutrophil migration to the site of infection was accompanied by increased numbers of bacteria in the peritoneal fluid and blood. Conversely, in sublethal infection in which massive neutrophil migration was

observed, bacterial infection was restricted to the peritoneal cavity, and the animals exhibited a low mortality rate.<sup>10,11</sup> More recently, we have also reported that blood neutrophils obtained from patients with sepsis failed to respond in vitro to the chemotactic stimuli FMLP and LTB<sub>4</sub>. This unresponsiveness was directly associated to a poor prognosis.<sup>12</sup>

Evidence from literature suggests that the high levels of circulating cytokines/chemokines observed in severe sepsis may mediate the impairment of neutrophil migration, in addition to being involved in the deleterious physiopathologic findings of the disease, such as coagulation disorders, cardiovascular collapse, and organ failure.<sup>13</sup> The intravenous administration of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) or interleukin-8 (IL-8) inhibited neutrophil migration to mouse peritoneal cavity and anti-TNF- $\alpha$  antibody partially prevented the inhibition of neutrophil migration in endotoxemia model.<sup>14</sup> However, the molecular mechanisms involved in the reduced ability of neutrophils to migrate during sepsis were not completely clarified.

Independent of their chemical nature, most chemoattractants exert their action via binding to specific G protein-coupled receptors (GPCRs) controlling complex cascades of signaling events. Among these, activation of the tyrosine kinase pathway is a key event to mediate actin filament assembly, a fundamental step

From the Departments of Immunology and Biochemistry, Surgery and Anatomy, and Pharmacology, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto; Department of Pharmacology, Institute of Biology, Universidade do Estado do Rio de Janeiro; and Department of Biological Sciences, Federal University of Triângulo Mineiro, Uberaba, Brazil.

Submitted May 22, 2006; accepted June 24, 2006. Prepublished online as *Blood* First Edition Paper, July 18, 2006; DOI 10.1182/blood-2006-05-024638.

Supported by grants from the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e

Tecnológico (CNPq), CAPES, and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) (Brazil).

**Reprints:** Fernando Q. Cunha, Department of Pharmacology, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Avenida Bandeirantes, 3900, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil 14049-900; e-mail: fdq Cunha@fmp.usp.br.

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. Therefore, and solely to indicate this fact, this article is hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. section 1734.

© 2006 by The American Society of Hematology

for neutrophil responses, including cell locomotion and phagocytosis.<sup>15</sup> However, desensitization of GPCR family receptors is an important determinant of the intensity and duration of agonist stimulation. G protein-coupled receptor kinases (GRKs), specific kinases interacting with GPCR protein, induce receptor phosphorylation and thereby signal GPCR desensitization in the continuing presence of chemoattractants.<sup>16</sup> Therefore, an increased expression of GRKs could augment chemotactic receptor desensitization and in turn reduce neutrophil migratory response.<sup>17</sup>

In the present study, we hypothesized that the impairment of neutrophil migration observed in sepsis could result from signal receptor desensitization mediated by continuous and excessive chemotactic receptor activation. To address this question, we investigated the intracellular mechanisms underlying the inability of neutrophils from severe septic patients to migrate toward IL-8 and LTB<sub>4</sub>. We have demonstrated that the systemic septic environment can overstimulate circulating neutrophils, therefore inducing GRK2 and GRK5 expression and receptor desensitization. GRKs, probably leading to GPCR phosphorylation, might impair chemoattractant-induced tyrosine kinase activity and the subsequent rearrangement of the actin network, thus compromising the ability of neutrophils from patients with sepsis to migrate.

## Patients, materials, and methods

### Patients

The prospectively enrolled patients admitted and treated for sepsis in the Intensive Care Unit of the Department of Surgery, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Brazil, from June 2001 to June 2003. All patients presented clinical and/or laboratory variables that fulfilled the criteria for sepsis.<sup>18</sup> Healthy male and female volunteers served as controls. The study was approved by the Human Subjects Institutional Committee of the Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo (HCRP 4989/99), and written informed consent was obtained from patients (or their caretakers) and volunteers. Patients were excluded for the following reasons: older than 75 years or younger than 15 years; mean arterial pressure less than 50 mm Hg; bradycardia (heart rate < 50 bpm) or tachycardia (heart rate > 125 bpm); intervention with high doses of vasopressor agents (dopamine > 7.5 μg/kg/min, dobutamine > 10 μg/kg/min); oliguria (urine output < 50 mL/h); irreversible circulatory shock; and when informed consent could not be obtained. All patients enrolled were evaluated according to the Acute Physiological and Chronic Health Evaluation (APACHE) II score.

### Neutrophil isolation

Blood neutrophils from patients with sepsis or healthy volunteers were isolated by Percoll gradient<sup>19</sup> and suspended in RPMI medium (97% of viable cells, as assessed by trypan blue exclusion). In some experiments, neutrophils isolated from healthy subjects were pretreated (2 hours, 37°C) with IL-1β (2 ng/mL) plus interferon-γ (IFN-γ; 10 ng/mL) and lipopolysaccharide (LPS; 10 μg/mL), and further incubated (1 hour, 37°C) with IL-8 (10<sup>-9</sup> M) or LTB<sub>4</sub> (10<sup>-8</sup> M).

### Neutrophil migration assay

Chemotaxis was assayed in 48-well microchemotaxis chambers (Neuro Probe, Gaithersburg, MD) using 5-μm PVP-free polycarbonate filter.<sup>19</sup> Neutrophils (10<sup>6</sup> cells/mL in RPMI-0.01% bovine serum albumin [BSA]) were allowed to migrate toward FMLP (10<sup>-7</sup> M), LTB<sub>4</sub> (10<sup>-8</sup> M), or IL-8 (10<sup>-9</sup> M), or medium alone (random migration; 37°C, 5% CO<sub>2</sub>). After 1 hour, filters were removed, fixed, and stained, and neutrophils that migrated through the membrane were counted under a light microscope on at least 5 randomly selected fields.<sup>19</sup> Each sample was assayed in triplicate. Results are expressed as number of neutrophils per field.

### Phagocytosis assay

The ability of septic or healthy neutrophils to phagocytose (1 hour, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>) human plasma-opsonized zymosan (10 particles/cell) was assayed,<sup>20</sup> in the presence or not of cytochalasin B (CyB; 15 μg/mL) or genistein (80 μM), and expressed as the phagocytic index (% of phagocytic cells × number of interiorized particles). The contents of F-actin and phosphotyrosine of phagocytosing cells were analyzed by fluorescence microscopy.

### Cytokine assay

Plasma circulating levels of TNF-α, IFN-γ, IL-8, and IL-10 were determined by double-ligand enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).<sup>12</sup> The results are expressed as picograms of cytokine per milliliter of serum.

### RNA extraction and RT-PCR analysis

Total RNA extracted from neutrophils by Trizol (Gibco-BRL, Carlsbad, CA) was reverse-transcribed using Superscript II reverse transcriptase (RT; Gibco-BRL).<sup>21</sup> The primers for CXCR1 amplification were sense (5') 5' CAG ATC CAC AGA TGT GGG AT-3'; and antisense, (3') 5' AGC AGC CAA GAC AAA CAA ACT-3' amplifying 468 bp. For β-actin: sense, (5') 5'-GGC GAC GAG GCC CAG A-3'; and antisense, (3') 5'-CGA TTT CCC GCT CGG C-3' amplifying 463 bp. The reverse transcription product was amplified, and the polymerase chain reaction (PCR) products were separated in 1.5% agarose gel and identified by ethidium bromide.<sup>21,22</sup> Gel Pro-Analyzer 3.1 software (Media Cybernetics, Silver Spring, MD) was used for densitometric analysis. Results are shown as units of β-actin mRNA.

### CXCR1 expression

Quantification of CXCR1 expression surface antigens was performed in flow cytometry using PE-conjugated antibodies anti-CXCR1 (R&D Systems, Minneapolis, MN) or anti-γ1 and γ2 (BD Pharmingen, San Diego, CA) using a FACSCalibur flow cytometer and the CellQuest software (Becton Dickinson, San Jose, CA).<sup>23</sup>

### Fluorescence microscopy for F-actin, phosphotyrosine or GRK

The contents of F-actin, GRK2, GRK5, and tyrosine-phosphorylated residues were determined in neutrophils stimulated with IL-8, LTB<sub>4</sub>, or zymosan by fluorescence microscopy. After treatment, neutrophil slides were prepared by cytospin centrifuge, and F-actin was stained with TRITC-labeled phalloidin (Sigma, St Louis, MO).<sup>19</sup> Immunocytochemistry for phosphotyrosine or GRKs was developed using biotin conjugated-primary antibodies (anti-pTyr, anti-GRK2, or anti-GRK5, 1:50; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) and streptavidin-conjugated FITC (1:50; Caltag, Burlingame, CA).<sup>24</sup> Microscopic analysis of fluorescent images was done using an epifluorescence microscope (Olympus BX40-F4; Tokyo, Japan) equipped with appropriate filters for FITC or TRITC, and using 100×/1.30 NA oil-immersion objectives. Image capturing was performed with a cooled charged-coupled device CoolSNAP camera (Photometrics, Tucson, AR). All images were captured using identical camera settings: time of exposure, brightness, contrast and sharpness, and an appropriated white balance set according to the fluorescence filter and acquired and analyzed by Image-Pro Plus 4.0 (Media Cybernetics). The mean fluorescence density was determined from a linear measurement of individual cells' fluorescence. All cells of at least 5 randomly chosen fields of each slide, performed in duplicate, were analyzed from at least 10 individual experiments. Results are shown as the mean ± SD of the mean fluorescence densities of each field subtracted from the mean density of the area measured as background for each individual slide. Figures show representative gray images taken by Adobe Photoshop software (Adobe Systems, San Jose, CA).

### Immunoblot for GRK

GRK2 and GRK5 expression in septic neutrophils or in cells treated with cytokines plus LPS and further stimulated with IL-8 or LTB<sub>4</sub> were determined by immunoblots<sup>19,24</sup> with polyclonal anti-GRK2 or anti-GRK5

**Table 1. Characteristics of patients with sepsis**

	Data
No. patients	52
Average age, y (range)	52.1 (17-89)
Male/female ratio, %	51.9/48.1
APACHE II score, mean $\pm$ SD	26.66 $\pm$ 7.68
<b>Microorganism isolates, no. patients</b>	
Gram-negative rods	5
Gram-positive rods	1
Gram-positive coccus	5
Levenings	3
Miscellaneous	12
Negative culture	24
Not determined	2

antibody (Ab; 1:500; Santa Cruz Biotechnology). Immunoreactive proteins were visualized on the PVDF (Hybond-P; Amersham Biosciences, Arlington Heights, IL) by 3,3'-diaminobenzidine, and band densitometry was quantified by Scion Image Software (Scion, Frederick, MD).

### Statistical analysis

Data were analyzed by Prism 3 software (GraphPad Software, San Diego, CA). The Kolmogorov-Smirnov test was used to verify data distribution. Results are expressed as mean  $\pm$  SD, except for cytokine levels, expressed as medians and 25th and 75th percentiles. Unpaired *t* test and Mann-Whitney were used for comparing means or medians between 2 groups, respectively. Analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni was used for multiple comparisons for unpaired data. A *P* value of less than .05 was taken as statistically significant.

## Results

### Clinical data

Patients with sepsis (52) from different sources were enrolled in this study. The main diagnoses included pneumonia in 17 (35.4%) patients, intra-abdominal infection in 6 (12.5%) patients, and trauma in 4 (8.3%) patients. The remaining 21 (43.7%) patients consisted of diverse causes and miscellaneous (Table 1). Characteristics of the patients concerning age, sex, APACHE II score, and bacteriological data are summarized in Table 1. Controls consisted of 15 healthy volunteers, 7 (46.7%) men and 8 (53.3%) women, with a mean age of 30.9  $\pm$  7.4 years (range, 23-47 years).

### Cytokine concentrations

Cytokine levels were determined in serum samples of patients with sepsis and controls. The median time between the onset of sepsis and blood collection was 3 days (range, 1-5 days). Table 2 shows that median serum levels of TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-8, and IL-10 were significantly increased in patients with sepsis compared with controls.

### Neutrophil chemotaxis

The ability of neutrophils obtained from 20 patients with sepsis (mean age  $\pm$  SD, 56.3  $\pm$  17.2 years; range, 26-83 years) and 15 healthy donors to migrate in vitro toward the chemoattractants was assayed. Figure 1A shows that even random migration was found to be reduced in patients. Moreover, migration of neutrophils toward all chemoattractants tested was significantly inhibited (> 50%) in patients with sepsis when compared with controls. Interestingly, although controls and patients differed in age distribution, when patients with sepsis (n = 6, mean age  $\pm$  SD, 39.2  $\pm$  7.6 years; range, 23-47 years) were analyzed within the same range of controls, impaired chemotactic response of septic neutrophils was either observed versus control cells (*P* < .05, unpaired *t* test; asterisk in Figure 1A), respectively, for RPMI (3.5  $\pm$  3.1 vs 7.2  $\pm$  2.9 neutrophils/field), FMLP (13.8  $\pm$  9.4 vs 30.5  $\pm$  12.1 neutrophils/field), LTB<sub>4</sub> (9.5  $\pm$  8.8 vs 21.2  $\pm$  5.2 neutrophils/field), and IL-8 (7.2  $\pm$  6.0 vs 14.3  $\pm$  5.3 neutrophils/field).

### IL-8 receptor expression

To evaluate whether inhibition of chemotactic response of septic neutrophils was related to alterations in chemoattractant receptor expression, CXCR1 mRNA and protein levels were determined by RT-PCR and flow cytometry, respectively. As seen in Figure 1B there was no significant difference in CXCR1 mRNA expression in neutrophils from controls or patients with sepsis. In agreement, no difference between the median fluorescence intensity for CXCR1 was detected between groups (Figure 1C), indicating that cell membrane CXCR1 expression was similar in neutrophils from controls and patients with sepsis.

### Actin polymerization and phosphotyrosine content

During migration, concurrent changes in actin cytoskeleton enable cells to move toward the stimulus. In response to external stimuli, there is a dynamic remodeling of the cytoskeleton, which is involved with changes in cell shape and motility and signal transduction.<sup>25,26</sup> We investigated the alterations in actin cytoskeleton dynamic and the pattern of tyrosine kinase activation in neutrophils from patients with sepsis and controls after stimulation with IL-8 or LTB<sub>4</sub>. Figure 2 shows that under basal conditions (nonstimulation) no significant difference in F-actin content was observed in neutrophils from both controls (Figure 2Ai) and septic patients (Figure 2Aiv). However, while treatment of control cells with IL-8 (Figure 2Aii) or LTB<sub>4</sub> (Figure 2Aiii) increased actin polymerization leading to an increase in cell fluorescence, no alteration in actin assembly was observed in neutrophils from patients with sepsis treated with IL-8 (Figure 2Av) or LTB<sub>4</sub> (Figure 2Avi). A similar pattern of results was observed by immunocytochemistry for phosphotyrosine in both groups. There was no difference in the fluorescence intensity for phosphotyrosine in cells

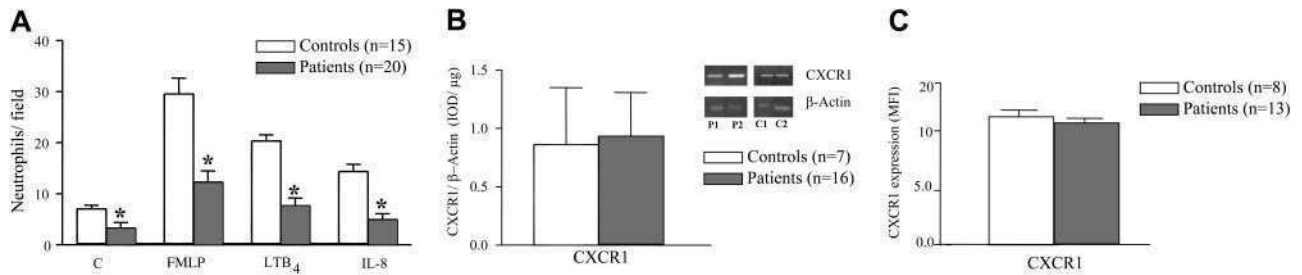
**Table 2. Concentrations of cytokines detected in sera from controls and patients with sepsis**

	TNF- $\alpha$		IFN- $\gamma$		IL-8		IL-10	
	No. individuals	Median concentration, pg/mL (25th-75th percentiles)	No. individuals	Median concentration, pg/mL (25th-75th percentiles)	No. individuals	Median concentration, pg/mL (25th-75th percentiles)	No. individuals	Median concentration, pg/mL (25th-75th percentiles)
Controls	9	0 (0-71.7)	5	170.8 (0-283.6)	9	0 (0-18.4)	9	155.5 (29.1-233.8)
Patients	9	202.4 (147.1-334.6)*	26	528.1 (176-815)*	12	155.7 (122.8-257.5)*	12	343.2 (256-465.9)†

Data are medians of the levels of cytokines detected in serum samples obtained 1 to 5 days after the onset of sepsis.

\**P* < .05 compared with respective controls (Mann-Whitney *U* test).

†*P* < .01 compared with respective controls (Mann-Whitney *U* test).



**Figure 1. Chemotactic activity and CXCR1 receptor expression on neutrophils.** (A) Chemotactic response of septic neutrophils (■, n = 20) or control cells (□, n = 15) toward FMLP ( $10^{-7}$  M), LTB<sub>4</sub> ( $10^{-8}$  M), or IL-8 ( $10^{-9}$  M), or medium alone (C indicates controls) in a microchemotaxis chamber. Data are means  $\pm$  SD. \* $P < .01$  compared with respective control. (B) IL-8 receptor gene expression. Expression of CXCR1 mRNA in neutrophils from controls (□, n = 7) and patients with sepsis (■, n = 16) evaluated by RT-PCR as described in "Patients, materials, and methods." Results are shown as units of  $\beta$ -actin mRNA. Insert shows 2 representative experiments showing CXCR1 and  $\beta$ -actin mRNA expression in neutrophils from controls (C1, C2) and patients with sepsis (P1, P2). (C) Flow cytometric analysis of CXCR1 receptor expression on neutrophils from controls (□, n = 8) and patients with sepsis (■, n = 13). Results are shown as median fluorescence intensity (MFI). Error bars indicate SD.

from controls (Figure 2Bi) or patients with sepsis (Figure 2Biv) incubated with medium alone. However, while the addition of IL-8 or LTB<sub>4</sub> to cultures significantly increased the phosphotyrosine content in control cells (Figure 2Bii and 2Biii, respectively), neutrophils from patients with sepsis were not able to respond to IL-8 (Figure 2Bv) or LTB<sub>4</sub> (Figure 2Bvi). Differences in the intensity of fluorescence among all treatments are demonstrated in Figure 2C and 2D that clearly show the inability of septic neutrophils in signaling with an increase in actin polymerization (Figure 2C) and tyrosine phosphorylation (Figure 2D) after chemoattractant stimulation.

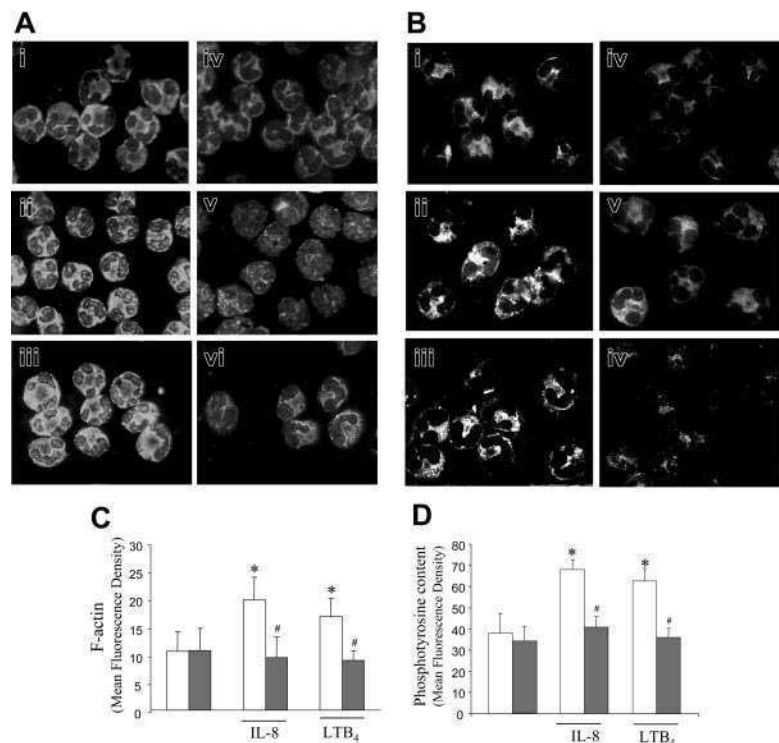
#### Effect of phagocytic activity of septic neutrophils on actin polymerization and phosphotyrosine content

Phagocytosis is absolutely dependent on actin cytoskeleton integrity and can modulate tyrosine kinase activation in leukocytes. The ability to phagocytose opsonized zymosan and the modulation of this process by tyrosine kinase was evaluated in septic neutrophils. As shown in Figure 3A, neutrophils from septic patients (gray bars)

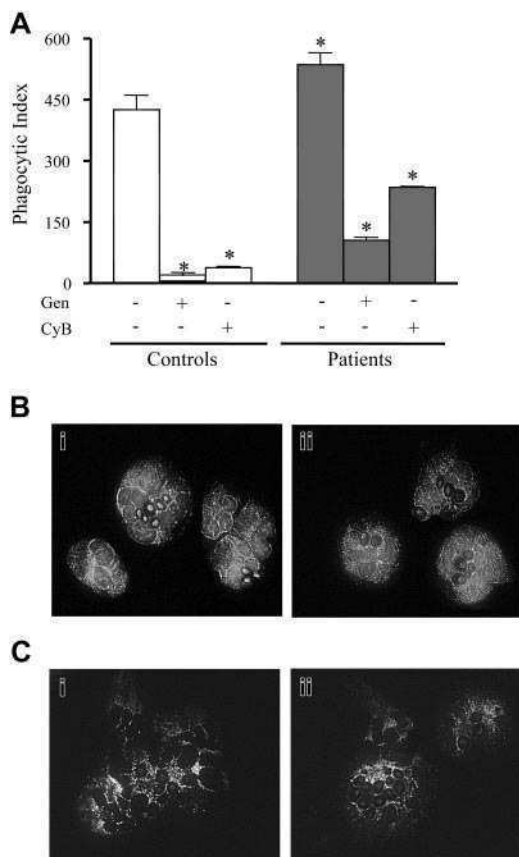
presented greater phagocytic activity ( $P < .05$ ) compared with control neutrophils (open bars). Incubation with either CyB ( $15 \mu\text{g}/\text{mL}$ ), a disruptor of microfilament organization, or genistein ( $80 \mu\text{M}$ ), an inhibitor of tyrosine kinases, reduced phagocytosis of opsonized targets in controls and septic cells (Figure 3A). Cytochemistry analysis of cells under phagocytic activity for F-actin (Figure 3B) or phosphotyrosine (Figure 3C) showed that neutrophils from both groups, control (Figure 3Bi, 3Ci) and septic (Figure 3Bii, 3Cii) were able to respond to opsonized zymosan stimulation, increasing actin polymerization (Figure 3B) and phosphotyrosine content (Figure 3C).

#### Effect of cytokine-LPS treatment on LTB<sub>4</sub>- or IL-8-induced actin assembly and tyrosine phosphorylation

Bacterial products and cytokine serum levels are elevated in sepsis, and, for this, we have investigated with fluorescence microscopy whether pretreatment of neutrophils from healthy volunteers with cytokines and LPS would interfere with actin assembling (Figure



**Figure 2. IL-8 and LTB<sub>4</sub> did not increase actin polymerization and protein tyrosine phosphorylation from septic neutrophils.** The contents of F-actin (A, C) and phosphotyrosine (B, D) were analyzed by cytofluorescence in neutrophils from volunteers (i-iii; □) or patients with sepsis (iv-vi; ■), treated with medium alone (i, iv), IL-8 ( $10^{-9}$  M; ii-iii), or LTB<sub>4</sub> ( $10^{-8}$  M; iv-v). Actin filaments were stained with TRITC-phalloidin (A), and tyrosine-phosphorylated proteins were immunolabeled with FITC-conjugated antiphosphotyrosine Ab (B). Panels show images representative of at least 5 independent experiments. In addition, cells were imaged ( $\times 1000$ ) as described, and the fluorescence intensity of F-actin (C) or phosphotyrosine (D) was quantified. Data are means  $\pm$  SD from 5 independent experiments. \* $P < .05$  compared with cells incubated with medium alone (ANOVA followed by Bonferroni); # $P < .05$  compared with control neutrophils (unpaired *t* test).



**Figure 3. Effect of phagocytosis on actin polymerization and protein tyrosine phosphorylation in septic neutrophils.** (A) Phagocytic index of neutrophils from controls (□) or patients with sepsis (■), treated (+) or not (–) with CyB (15  $\mu$ g/mL) or with genistein (Gen; 80  $\mu$ M). Data are means  $\pm$  SD. \* $P$  < .05 compared with controls (ANOVA followed by Bonferroni). Fluorescence microscopy (magnification:  $\times$  1000) for F-actin (B) and phosphotyrosine (C) of neutrophils from controls (i; □) and patients with sepsis (ii; ■), after phagocytosis of opsonized zymosan, performed as described in “Patients, materials, and methods.”

4A) and tyrosine phosphorylation (Figure 4B) in response to chemoattractants. Basal levels of F-actin (Figure 4Ai) and phosphotyrosine (Figure 4Bi) in blood neutrophils from controls increased significantly after stimulation with IL-8 (Figure 4Aii and 4Bii) or with LTB<sub>4</sub> (Figure 4Aiii and 4Biii). In contrast, pretreatment of neutrophils with cytokines (IL-1 $\beta$  + IFN- $\gamma$ ) plus LPS (Figure 4Aiv and 4Biv) impaired actin polymerization (Figure 4A) and tyrosine phosphorylation (Figure 4B) induced by IL-8 (Figure 4Av and 4Bv) or LTB<sub>4</sub> (Figure 4Avi and 4Bvi). The quantification of cell fluorescence, as described in “Patients, materials, and methods,” is shown in Figure 4C and 4D. Treatment with cytokines and LPS was not able to induce, per se, significant changes in actin cytoskeleton or in phosphotyrosine content when compared with nontreated control cells, but prevented the increase in actin polymerization (Figure 4C) and tyrosine phosphorylation (Figure 4D). Accordingly, pretreatment with LPS and cytokines also inhibited the chemotactic response of neutrophils to IL-8 (Nontreated cells,  $29.3 \pm 3.5$ ; LPS + Ctk,  $13.4 \pm 2.3$ ;  $n = 5$ ;  $P < .05$ ).

#### GRK2 and GRK5 expression

GRKs have been described as key modulators of GPCR desensitization. The IL-8 receptors, CXCRs, and the LTB<sub>4</sub> receptor, BLT1, can be phosphorylated by GRKs, resulting in receptor desensitization.<sup>16,17</sup> Alterations in GRK2 and GRK5 expression on neutrophils from patients with sepsis were analyzed by immunocytochemistry

or immunoblotting (Figure 5A). Compared with control cells (Figure 5Ai and 5Aii), a significant increase in fluorescence was clearly seen in septic neutrophils, indicating high expression of GRK2 (Figure 5Aii) and GRK5 (Figure 5Aiv). Confirming these results, an increase in GRK2 and GRK5 expression was also observed on the immunoblottings of septic neutrophils (Figure 5B). Moreover, in vitro treatment of healthy neutrophils with LPS + IFN- $\gamma$  + IL-1 $\beta$  + IL-8 significantly induced increase in either GRK2 or GRK5 (Figure 5C) expression. Stimulation with LTB<sub>4</sub> also increased GRK2 and GRK5 expression in neutrophils (Figure 5C), although with a lower magnitude than IL-8.

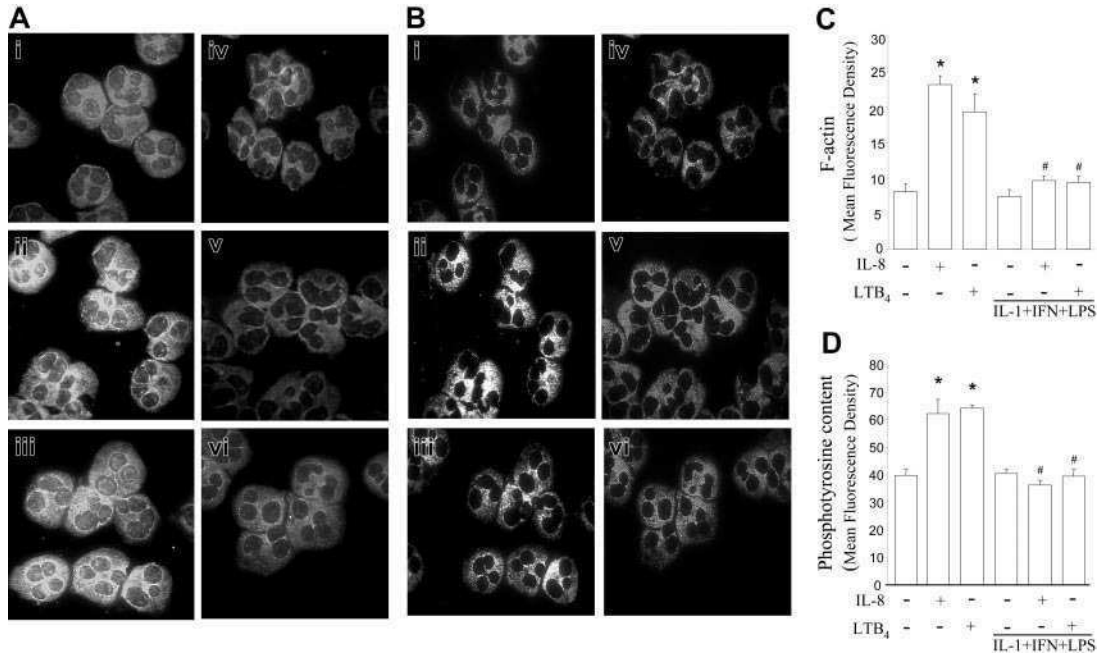
## Discussion

Arising from the body's response to infection, sepsis is a life-threatening and commonly lethal disorder, accompanied by an inability to regulate the inflammatory responses. The impairment of neutrophil migration toward the inflammatory focus limits the appropriate clearance of microorganisms in the peripheral tissue, and has been ascribed as a harmful feature during severe sepsis.<sup>10,11</sup> In animal models, the reduction of neutrophil migration to infection sites accompanied by lethality have been directly associated with increased circulating levels of cytokines, chemokines, and nitric oxide.<sup>10,11</sup> Furthermore, the unresponsiveness of blood neutrophils from septic patients to chemotactic mediators in vitro<sup>27,28</sup> has been directly correlated to a poor prognosis.<sup>12</sup>

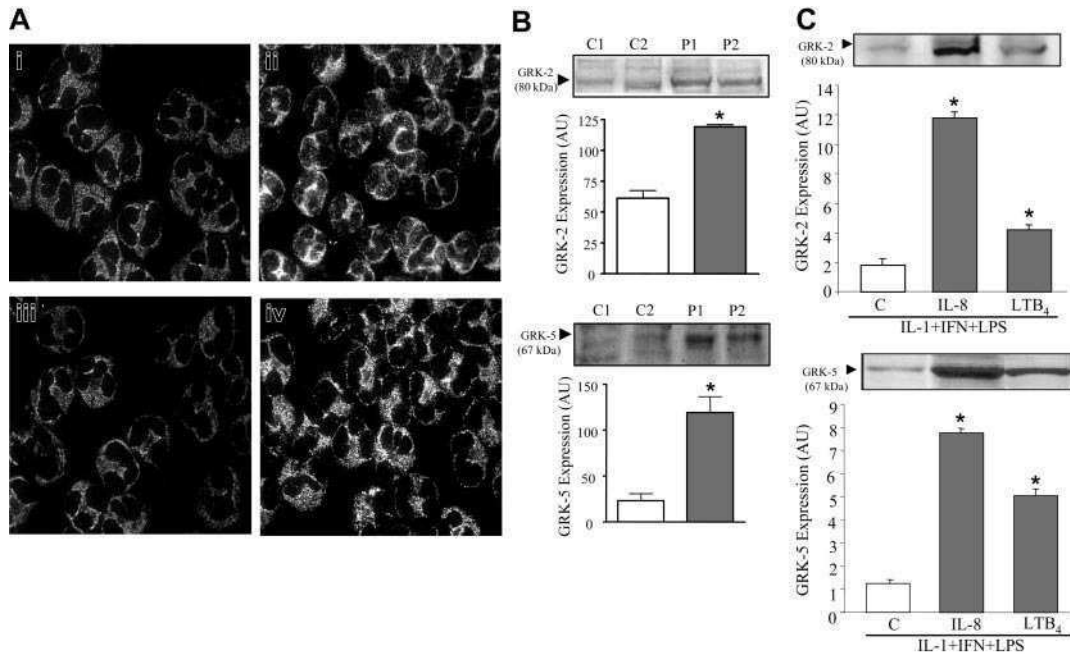
Confirming the severity of sepsis scored as APACHE II, patients with sepsis enrolled in this study presented a significant increase in circulating pro- and anti-inflammatory cytokines, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-8 (CXCL8), and IL-10, accompanied by a high mortality rate. Supporting previous data,<sup>12</sup> we are showing that limited chemotactic ability of septic neutrophils occurs for structurally different chemoattractants, including bacterial products such as FMLP, chemokines, IL-8 (CXCL8), and also lipid mediators, such as LTB<sub>4</sub>. The failure of septic patient neutrophils to mount a chemotactic response could not be ascribed to a deficiency in the transcription or expression of chemotactic receptors since CXCR1, an IL-8 (CXCL8) receptor in humans,<sup>29</sup> was similarly expressed in neutrophils obtained from controls and patients with sepsis. The chemokine receptors CXCR1 and CXCR2 are central for many PMN functions.<sup>29</sup> Although some reports have shown that in vitro treatment with cytokines and/or bacterial products could down-regulate CXCR1 and CXCR2 expression on human neutrophils,<sup>23,30</sup> studies with patients with sepsis, confirming our data, showed that expression of CXCR1, the high-affinity receptor for IL-8, were not altered in sepsis.<sup>31,32</sup>

Most neutrophil chemoattractants recognize membrane GPCR on the leukocytes and, as a result of receptor activation by the chemoattractant, a complex sequence of signaling events are triggered, inducing profound alterations in cytoskeleton dynamics and activating signaling pathway, allowing neutrophils to develop motile, adhesive, phagocytic, and antimicrobial responses.<sup>33</sup>

In the classical view of signaling initiated by activation of GPCR by chemoattractants, the G $\beta\gamma$  complex activates phospholipase C $\beta$  isoforms that, ultimately, results in calcium mobilization and activation of protein kinase C (PKC) that mediates the activation of NADPH oxidase complex, regulating the respiratory burst, phagocytosis, and bacterial killing in neutrophils.<sup>34</sup> In addition, downstream to G proteins, other intracellular signals are triggered, including phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) and mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathways, Src family of



**Figure 4. Effects of LTB<sub>4</sub> and IL-8 on actin-assembly and protein tyrosine phosphorylation of neutrophils treated in vitro with cytokines and LPS.** Neutrophils from healthy individuals were incubated with medium alone (i-iii) or with cytokines + LPS (iv-vi) and further stimulated with IL-8 (10<sup>-9</sup> M; ii, v) or LTB<sub>4</sub> (10<sup>-8</sup> M; iii, vi), as described in "Patients, materials, and methods." F-actin, stained with TRITC-phalloidin (A, C; left panels), and tyrosine-phosphorylated proteins, immunolabeled with FITC-conjugated antiphosphotyrosine Ab (B, D; right panels), were analyzed by fluorescence microscopy (magnification: × 1000) and quantified as described. Data are means ± SD from 10 independent experiments. \**P* < .05 compared with control neutrophils; #*P* < .05 compared with cells incubated with medium alone (ANOVA followed by Bonferroni).



**Figure 5. Increase of GRK2 and GRK5 expression in septic neutrophils.** (A) Neutrophils from controls (i, iii) or patients with sepsis (ii, iv) were immunostained for GRK2 (i-ii) and GRK5 (iii-iv). The panels show a representative experiment out of at least 7 independent experiments. (B) Immunoblotting for GRK2 (top panel) and GRK5 (bottom panel) in neutrophils from patients with sepsis (■) or healthy volunteers (□). The blots, obtained from 2 representative experiments, show GRK2 and GRK5 expression in neutrophils from controls (C1, C2) and patients with sepsis (P1, P2). (C) Immunoblotting for GRK2 (top) and GRK5 (bottom) in neutrophils from healthy volunteers incubated with cytokines and LPS, plus IL-8 (10<sup>-9</sup> M) or LTB<sub>4</sub> (10<sup>-8</sup> M), as described in "Patients, materials, and methods." For immunoblotting, the densitometry of each band, expressing the content of GRK2 and GRK5, was analyzed and expressed in arbitrary units (AU). Data show means ± SD of at least 6 experiments. \**P* < .05 compared with nontreated cells (ANOVA followed by Bonferroni).

tyrosine kinases, Rho family of small guanosine triphosphate-binding proteins, and phosphatases that affects many aspects of neutrophil functioning, particularly chemotaxis and survival.<sup>35</sup> Activation of these pathways by chemoattractants leads to protein phosphorylation, especially on tyrosine residues of several adapter proteins, which amplifies the signal transduction and priming cells to respond to adhesive interactions via integrins.<sup>15</sup> Signaling for motility finds its climax with the polymerization of F-actin, which results in lamella formation and overall rearrangement of the cellular cytoskeleton and cell crawling.<sup>33</sup>

Our data show that rather than a down-regulation of receptor expression on septic neutrophils, a failure of receptor signaling in response to chemoattractants assigned for impairing the neutrophil migration. We have demonstrated that neutrophils from patients with sepsis present a significant reduction in the basal phosphotyrosine protein content and failed to display increase in tyrosine kinase activity and alterations in actin cytoskeleton dynamics in response to IL-8 (CXCL8) or LTB<sub>4</sub>. Moreover, the inability of septic neutrophils to increase actin polymerization and tyrosine kinase activity seems to be restricted to the incapacity of chemoattractants, such as IL-8 or LTB<sub>4</sub>, to trigger the signal transduction through their respective receptors. Neutrophils from patients with sepsis showed a high and cytochalasin b-sensitive phagocytic activity against opsonized particulated stimuli that induced increase and rapid redistribution of F-actin and augment in phosphotyrosine content, indicating that these cells present functional cytoskeleton and signaling pathways that are able to respond to other stimuli than chemoattractants.

Aiming to reproduce in part the endogenous septic environment, human neutrophils obtained from healthy individuals were treated with cytokines and LPS and further stimulated with chemoattractants. Interestingly, this *in vitro* treatment also inhibited chemotactic response, actin polymerization, and the increase of phosphotyrosine content in response to IL-8 or LTB<sub>4</sub> stimulation, suggesting that endogenous mediators produced during sepsis might activate circulating neutrophils, impairing these cells to respond to further chemoattractant stimulation.

In similarity with other GPCRs, chemotactic receptor activation by agonists can lead to receptor desensitization, a phenomenon modulated by GRKs, which phosphorylates GPCR and often results in a rapid attenuation of receptor responsiveness.<sup>15,35</sup> Desensitization of migratory responses is an important determinant

to regulate neutrophil influx in pathologic conditions. Continuous and excessive chemokine receptor activation can induce an increase in the expression of GRKs, which phosphorylate GPCRs to signal receptor desensitization.<sup>16</sup> Prolonged LTB<sub>4</sub> stimulation was reported to desensitize human neutrophils for chemotaxis and calcium influx, through the phosphorylation, by GRK6, of the LTB<sub>4</sub> receptor.<sup>36</sup> Macrophage inflammatory protein-2 was shown to induce, *in vitro*, expression of GRK2 and GRK5 in blood neutrophils.<sup>17</sup> Studies on CXCR1 and CXCR2 functionality showed that high concentrations of IL-8 (CXCL8) decrease migratory responses.<sup>37</sup> This effect seems to be related to GRK2-induced phosphorylation of CXCR1, desensitizing this receptor and probably allowing its internalization.<sup>38</sup>

Since CXCR1 expression was maintained on neutrophils during severe sepsis, it was conceivable to assume that desensitization of chemoattractant receptors may account for the reduced chemotactic responses. Supporting this idea, we demonstrate that neutrophils from patients with sepsis show a significant increase in GRK2 and GRK5 expression. Furthermore, treatment of control neutrophils with cytokines plus LPS and further stimulation with IL-8 (CXCL8) or LTB<sub>4</sub> also up-regulated GRK2 and GRK5, indicating a key role for those mediators in neutrophil desensitization.

In summary, we present evidence that the systemic septic environment can highly activate circulating neutrophils, inducing GRK expression and desensitization of migratory activity. Increase in the GRK expression is associated with impairment of chemoattractant-induced tyrosine kinase activity and subsequent rearrangement of actin network, hence compromising the ability of neutrophils from patients with sepsis to migrate toward the infectious focus. The shift in chemotaxis from activation to desensitization provides a delicate interplay between many cellular factors that tightly regulate the neutrophil migration in sepsis.

## Acknowledgments

We thank Fabiola L. Mestriner and Giuliana Bertozzi Francisco (University of São Paulo) and Marcos B. Batista (Universidade do Estado do Rio de Janeiro) for technical assistance.

The authors have no conflicting financial interests.

Dr Arraes' current affiliation is the Department of Clinical Analysis, State University of Maringá, Maringá, Paraná, Brazil.

## References

- Cohen J. The immunopathogenesis of sepsis. *Nature*. 2002;420:885-891.
- Riedemann NC, Guo R-F, Ward PA. The enigma of sepsis. *J Clin Invest*. 2003;112:460-467.
- Bokoch GM. Chemoattractant signaling and leukocyte activation. *Blood*. 1995;86:1649-1660.
- Moser B, Wolf M, Walz A, Loetscher P. Chemokines: multiple levels of leukocyte migration control. *Trends Immunol*. 2004;25:75-84.
- Malawista SE, Montgomery RR, van Blaricom G. Evidence for reactive nitrogen intermediates in killing of staphylococci by human neutrophil cytoplasmic: a new microbicidal pathway for polymorphonuclear leukocytes. *J Clin Invest*. 1992;90:631-636.
- Fierro IM, Nascimento da Silva V, Arruda MAB, et al. Induction of NOS in rat blood PMN: *in vivo* and *in vitro* modulation by tyrosine kinase and involvement in bactericidal activity. *J Leukoc Biol*. 1999;65:508-514.
- Lejeune M, Sariban E, Cantinieux B, Ferster A, Devalck C, Fondu P. Granulocyte functions in children with cancer are differentially sensitive to the toxic effect of chemotherapy. *Pediatr Res*. 1996;39:835-842.
- Pereira MAA, Sannomiya P, Leme JG. Inhibition of leukocyte chemotaxis by factor in alloxan-induced diabetic rat plasma. *Diabetes*. 1987;36:1307-1314.
- Mastroianni CM, Lichtner M, Mengoni F, et al. Improvement in neutrophil and monocyte function during highly active antiretroviral treatment of HIV-1-infected patients. *AIDS*. 1999;13:883-890.
- Benjamin CF, Ferreira SH, Cunha FQ. Role of nitric oxide in the failure of neutrophil migration in sepsis. *J Infect Dis*. 2000;182:214-223.
- Crosara-Alberto DP, Darini ALC, Inoue RY, Silva JS, Ferreira SH, Cunha FQ. Involvement of NO in the failure of neutrophil migration in sepsis induced by *Staphylococcus aureus*. *Br J Pharmacol*. 2002;136:645-658.
- Tavares-Murta BM, Zaporoli M, Ferreira RB, et al. Failure of neutrophil chemotactic function in septic patients. *Crit Care Med*. 2002;30:1056-1061.
- Bone RC, Grodzin CJ, Balk RA. Sepsis: a new hypothesis for pathogenesis of the disease process. *Chest*. 1997;112:235-246.
- Tavares-Murta BM, Cunha FQ, Ferreira SH. 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*. 1998;124:1369-1374.
- Katanaev VL. Signal transduction in neutrophil chemotaxis. *Biochem*. 2001;66:351-368.
- Gainetdinov RR, Bohn LM, Walker JKL, et al. Muscarinic supersensitivity and impaired receptor desensitization in G protein-coupled receptor kinase 5-deficient mice. *Neuron*. 1999;24:1029-1036.
- Fan J, Malik AB. Toll-like receptor-4 (TLR4) signaling augments chemokine-induced neutrophil migration by modulating cell surface expression

- of chemokine receptors. *Nature Med.* 2003;9:315-321.
18. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, et al. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis: members of the American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference Committee. *Crit Care Med.* 1992;20:864-874.
  19. Coelho AL, de Freitas MS, Mariano-Oliveira A, 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.* 2004;292:371-384.
  20. Fernandes KS, Coelho AL, Lopes Bezerra LM, Barja-Fidalgo C. Virulence of *Sporothrix schenckii* conidia and yeast cells, and their susceptibility to nitric oxide. *Immunology.* 2000;101:563-569.
  21. Goidin D, Mamessier A, Staquet M-J, Schmitt D, Berthier-Vergnes O. Ribosomal 18S RNA prevails over glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and  $\beta$ -actin genes as internal standard for quantitative comparison of mRNA levels in invasive and noninvasive human melanoma cell subpopulations. *Analyt Biochem.* 2001;295:17-21.
  22. Nagase H, Miyamasu M, Yamaguchi M, et al. Expression of CXCR4 in eosinophils: functional analyses and cytokine-mediated regulation. *J Immunol.* 2000;164:5935-5943.
  23. Tikhonov I, Doroshenko T, Chaly Y, Smolnikova V, Pauza CD, Voitenok N. Down-regulation of CXCR1 and CXCR2 expression on human neutrophils upon activation of whole blood by *S. aureus* is mediated by TNF- $\alpha$ . *Clin Exp Immunol.* 2001;125:414-422.
  24. Mariano-Oliveira A, Coelho AL, Terruggi CH, Selistre-de-Araujo HS, Barja-Fidalgo C, de Freitas MS. Alternagin-C, a nonRGD-disintegrin, induces neutrophil migration via integrin signaling. *Eur J Biochem.* 2003;270:4799-4808.
  25. Wymann MP, Kernen P, Bengtsson T, Andersson T, Baggiolini M, Deranleau DA. Corresponding oscillations in neutrophil shape and filamentous actin content. *J Biol Chem.* 1990;265:619-622.
  26. Van Haastert PJ, Devreotes PN. Chemotaxis: signalling the way forward. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2004;5:626-634.
  27. Heit B, Kubes P. Bacterial products sabotage the innate immune system. *Adv Sepsis.* 2004;3:114-120.
  28. Kerfoot SM, Kubes P. Local coordination versus systemic deregulation: complexities in leukocyte recruitment revealed by local and systemic activation of TLR4 in vivo. *J Leukoc Biol.* 2005;77:862-867.
  29. Badolato R. Leukocyte circulation: one-way or round-trip? lessons from primary immunodeficiency patients. *J Leukoc Biol.* 2004;76:1-6.
  30. Williams MA, Cave CM, Quaid G, Solomkin JS. Chemokine regulation of neutrophil function in surgical inflammation. *Arch Surg.* 1999;134:1360-1366.
  31. Cummings CJ, Martin TR, Frevert CW, et al. Expression and function of the chemokine receptors CXCR1 and CXCR2 in sepsis. *J Immunol.* 1999;162:2341-2346.
  32. Chishti AD, Shenton BK, Kirby JA, Baudouin SV. Neutrophil chemotaxis and receptor expression in clinical septic shock. *Intensive Care Med.* 2004;30:605-611.
  33. Vicente-Manzanares M, Sánchez-Madrid F. Role of the cytoskeleton during leukocyte responses. *Nature Rev Immunol.* 2004;4:110-122.
  34. Lew PD. Receptors and intracellular signalling in human neutrophils. *Am Rev Respir Dis.* 1990;141:127-131.
  35. Niggli V. Signaling to migration in neutrophils: importance of localized pathways. *Int J Biochem Cell Biol.* 2003;35:1619-1638.
  36. Kavelaars A, Vroon A, Raatgever RP, et al. Increased acute inflammation, leukotriene B<sub>4</sub>-induced chemotaxis, and signaling in mice deficient for G protein-coupled receptor kinase 6. *J Immunol.* 2003;171:6128-6134.
  37. Feniger-Barish R, Yron I, Meshel T, Matityahu E, Ben-Baruch A. IL-8-induced migratory responses through CXCR1 and CXCR2: association with phosphorylation and cellular redistribution of focal adhesion kinase. *Biochem.* 2003;42:2874-2886.
  38. Barlic J, Khandaker MH, Mahon E, et al. Beta-arrestins regulate interleukin-8-induced CXCR1 internalisation. *J Biol Chem.* 1999;274:16287-16294.



# Regulation of chemokine receptor by Toll-like receptor 2 is critical to neutrophil migration and resistance to polymicrobial sepsis

Jose C. Alves-Filho<sup>a,1</sup>, Andressa Freitas<sup>a</sup>, Fabricio O. Souto<sup>a</sup>, Fernando Spiller<sup>a</sup>, Heitor Paula-Neto<sup>b</sup>, Joao S. Silva<sup>c</sup>, Ricardo T. Gazzinelli<sup>d</sup>, Mauro M. Teixeira<sup>d</sup>, Sergio H. Ferreira<sup>a,1</sup>, and Fernando Q. Cunha<sup>a,1</sup>

<sup>a</sup>Department of Pharmacology and <sup>c</sup>Department of Immunology, School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, 14049–900 Ribeirão Preto, Brazil; <sup>b</sup>Department of Pharmacology, Institute of Biology, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 20551–030 Rio de Janeiro, Brazil; and <sup>d</sup>Department of Biochemistry and Immunology, Biological Sciences Institute, Federal University of Minas Gerais, 31270–901 Belo Horizonte, Brazil

Contributed by Sergio H. Ferreira, January 11, 2009 (sent for review December 12, 2008)

**Patients with sepsis have a marked defect in neutrophil migration. Here we identify a key role of Toll-like receptor 2 (TLR2) in the regulation of neutrophil migration and resistance during polymicrobial sepsis. We found that the expression of the chemokine receptor CXCR2 was dramatically down-regulated in circulating neutrophils from WT mice with severe sepsis, which correlates with reduced chemotaxis to CXCL2 in vitro and impaired migration into an infectious focus in vivo. TLR2 deficiency prevented the down-regulation of CXCR2 and failure of neutrophil migration. Moreover, TLR2<sup>-/-</sup> mice exhibited higher bacterial clearance, lower serum inflammatory cytokines, and improved survival rate during severe sepsis compared with WT mice. In vitro, the TLR2 agonist lipoteichoic acid (LTA) down-regulated CXCR2 expression and markedly inhibited the neutrophil chemotaxis and actin polymerization induced by CXCL2. Moreover, neutrophils activated ex vivo by LTA and adoptively transferred into naïve WT recipient mice displayed a significantly reduced competence to migrate toward thioglycolate-induced peritonitis. Finally, LTA enhanced the expression of G protein-coupled receptor kinases 2 (GRK2) in neutrophils; increased expression of GRK2 was seen in blood neutrophils from WT mice, but not TLR2<sup>-/-</sup> mice, with severe sepsis. Our findings identify an unexpected detrimental role of TLR2 in polymicrobial sepsis and suggest that inhibition of TLR2 signaling may improve survival from sepsis.**

chemokine receptor | neutrophil | sepsis | Toll-like receptor

Successful clearance of bacterial infection depends on efficient neutrophil migration into the infected tissues (1). We and others have demonstrated a marked defect in neutrophil recruitment into the infectious focus during severe experimental sepsis, followed by failure of local bacterial clearance and dissemination of infection, resulting in inappropriate systemic inflammation and increased mortality (2–4). A defect of neutrophil migration also has been described in human sepsis (5). In accordance with these experimental studies, the reduction of neutrophil chemotaxis to several chemotactic mediators has been associated with illness severity and organ damage (6, 7).

The Toll-like receptors (TLRs) have been identified as the key receptors that recognize conserved components of invading pathogens (8). Although signaling through TLRs has been implicated as an important element of host defense, a growing body of evidence indicates that these receptors also may play a role in the pathophysiology of sepsis. Recent studies using mice with single TLR deficiencies have demonstrated the relative importance of TLR4 and TLR9 in the pathophysiology of polymicrobial sepsis (9, 10). These findings have raised the possibility that stimulation of multiple TLRs is required for an overwhelming inflammatory response. In this context, no study has yet examined the role of TLR2 in polymicrobial sepsis.

In the present study, we provide evidence that the systemic activation of TLR2 contributes to mortality in mice subjected to

severe cecal ligation and puncture (CLP), a model of acute polymicrobial septic peritonitis (11). We found that TLR2 signaling down-regulated the expression of the chemokine receptor CXCR2 on the surface of circulating neutrophils, impairing migration to the site of infection and affecting disease severity.

## Results

**TLR2 Deficiency Improves Survival in Polymicrobial Sepsis.** To explore the role of TLR2 in polymicrobial sepsis, we performed nonsevere (NS) and severe (S) septic peritonitis using CLP in WT and TLR2-deficient (TLR2<sup>-/-</sup>) mice. All of the WT and TLR2<sup>-/-</sup> mice subjected to NS-CLP survived for 7 days after CLP; however, whereas 100% of the WT mice subjected to S-CLP died within 2 days, the TLR2<sup>-/-</sup> mice had a significantly enhanced survival rate, with 40% surviving to day 2 and 35% surviving to the end of the observation period (Fig. 1A).

High levels of systemic inflammatory cytokines and neutrophil sequestration in the lung are markers and causative agents of poor prognosis in sepsis (12, 13). Six hours after S-CLP, the WT mice exhibited significant increases in serum TNF- $\alpha$ , IL-6, and CXCL2 levels (Fig. 1B–D). They also demonstrated increased myeloperoxidase (MPO) activity (a quantitative measure of neutrophil sequestration) in the lung tissue compared with the mice subjected to NS-CLP (Fig. 1E). In contrast, these markers were substantially reduced in the TLR2<sup>-/-</sup> mice subjected to S-CLP, as were the numbers of bacterial cfu in peritoneal exudates and blood (Fig. 1F).

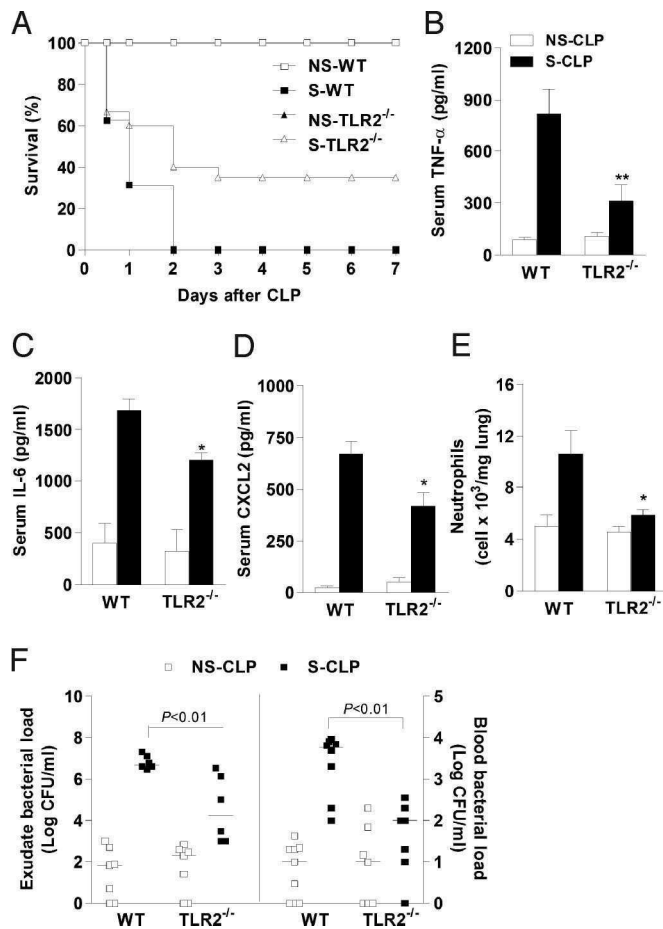
**TLR2 Deficiency Prevents Impairment of Neutrophil Migration in Severe Polymicrobial Sepsis.** To investigate the mechanism underlying the improved survival in TLR2<sup>-/-</sup> mice, we evaluated neutrophil recruitment into the infectious focus. The WT mice with S-CLP exhibited impaired neutrophil migration, with 3-fold fewer neutrophils in the peritoneal cavity, compared with the WT and TLR2<sup>-/-</sup> mice subjected to NS-CLP (Fig. 2A). In contrast, the TLR2<sup>-/-</sup> mice with S-CLP demonstrated only modest reduced neutrophil migration, comparable to that in the WT and TLR2<sup>-/-</sup> NS-CLP mice. Moreover, using intravital microscopy to visualize leukocyte–endothelial cell interactions, we found that the impaired neutrophil migration in the WT S-CLP mice was associated with a reduced number of adherent leukocytes to the postcapillary venules

Author contributions: J.C.A.-F., S.H.F., and F.Q.C. designed research; J.C.A.-F., A.F., F.O.S., F.S., and H.P.-N. performed research; J.S.S., R.T.G., and M.M.T. contributed new reagents/analytic tools; J.C.A.-F., M.M.T., and F.Q.C. analyzed data; and J.C.A.-F. and F.Q.C. wrote the paper.

The authors declare no conflict of interest.

<sup>1</sup>To whom correspondence may be addressed. E-mail: jcafelho@usp.br, shferrei@fmrp.usp.br, or fdq Cunha@fmrp.usp.br.

This article contains supporting information online at [www.pnas.org/cgi/content/full/0900196106/DCSupplemental](http://www.pnas.org/cgi/content/full/0900196106/DCSupplemental).

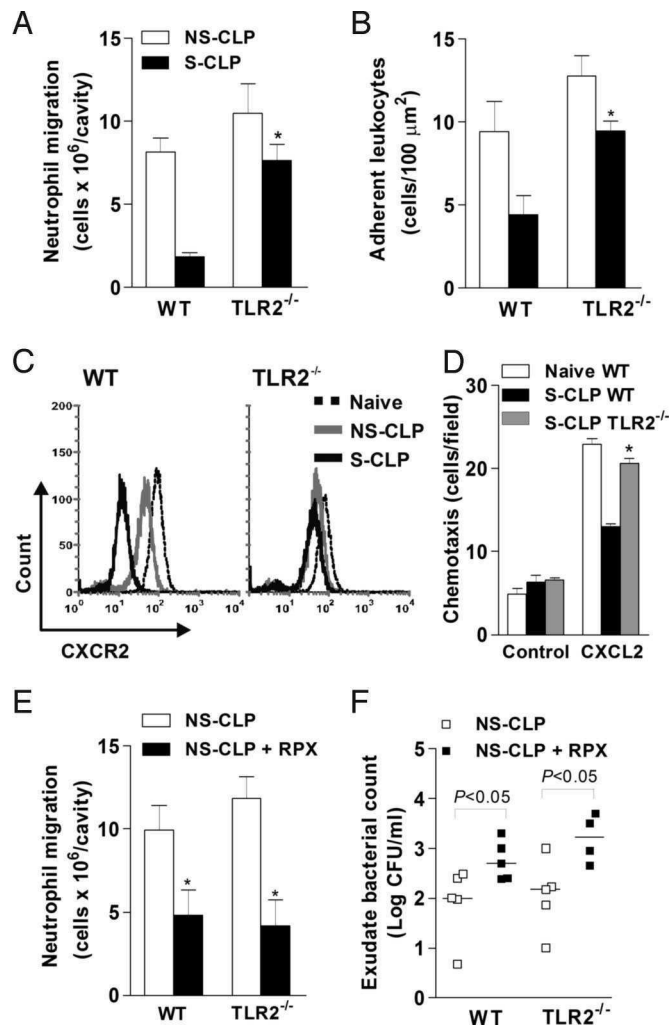


**Fig. 1.** TLR2 deficiency improves survival during septic peritonitis. (A) Survival rate after NS-CLP or S-CLP in WT or TLR2<sup>-/-</sup> mice ( $n = 20$ ).  $P < .05$ ; log-rank test. (B–D) ELISA of TNF- $\alpha$  (B), IL-6 (C), and CXCL2 (D) in serum of WT mice ( $n = 10$ ) and TLR2<sup>-/-</sup> mice ( $n = 10$ ) 6 h after CLP. (E) Neutrophil sequestration in lung measured 6 h after CLP. Data are mean  $\pm$  SEM. \* $P < .05$ , \*\* $P < .01$  relative to WT S-CLP mice. (F) Colony-forming units in peritoneal exudate and blood 6 h after CLP. Horizontal bars represent median values, and squares represent individual mice ( $n = 6$ –8 each).

of the mesentery. This reduction was not observed in the TLR2<sup>-/-</sup>–S-CLP mice (Fig. 2B).

Neutrophil recruitment is a complex process involving adhesion molecules and inflammatory mediators. Interestingly, we found no significant differences in the levels of cytokines TNF- $\alpha$  and IL-6 and in chemokines CXCL1, CXCL2, and CCL2 in the peritoneal exudate of WT and TLR2<sup>-/-</sup> mice after CLP [supporting information (SI) Fig. S1]. Moreover, the number of neutrophils in the blood were comparable in the 2 groups (data not shown). Thus, it seems unlikely that a local difference in cytokine production or circulating neutrophil level can explain the increased neutrophil migration seen in the TLR2<sup>-/-</sup> mice.

Reduction of neutrophil migration is associated with decreased CXCR2 protein expression on the membrane of circulating neutrophils (14). To address a possible role of TLR2 in the regulation of CXCR2 expression, we performed a flow cytometry analysis. Two hours after S-CLP, CXCR2 expression on neutrophils was significantly reduced in the WT mice compared with the NS-CLP group or naïve mice (Fig. 2C), and this reduction was correlated with decreased chemotaxis to CXCL2 (30 ng/mL) (Fig. 2D). Notably, CXCR2 expression and chemotaxis to CXCL2 were significantly higher in neutrophils from TLR2<sup>-/-</sup> mice compared with those from WT mice subjected to

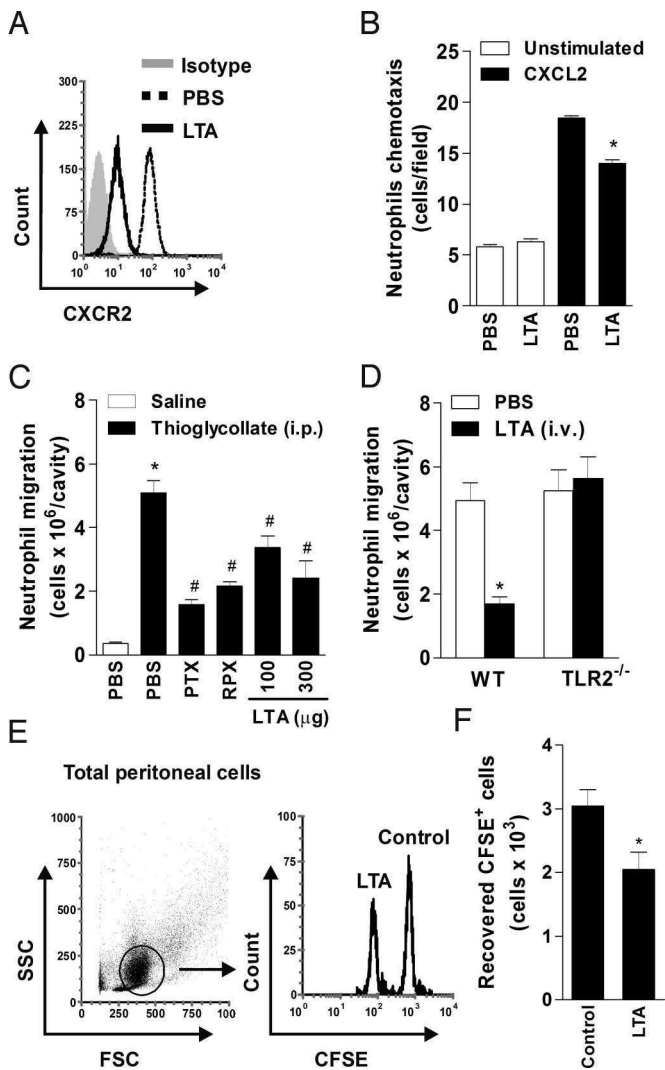


**Fig. 2.** TLR2 deficiency prevents impairment of neutrophil migration. (A) Neutrophils in peritoneal exudate of WT and TLR2<sup>-/-</sup> mice 6 h after CLP ( $n = 15$ ). (B) Adherent leukocytes in mesenteric venules 4 h after CLP as determined by intravital microscopy. (C) Flow cytometry of surface expression of CXCR2 on blood neutrophils of WT mice (Right) and TLR2<sup>-/-</sup> mice (Left) 2 h after CLP. (D) Chemotaxis of neutrophils to CXCL2 isolated from whole blood 2 h after CLP. (E and F) Neutrophil number (E) and cfu (F) in peritoneal exudate of WT and TLR2<sup>-/-</sup> mice treated with CXCR2 antagonist 6 h after NS-CLP ( $n = 10$ ). Mice were injected i.v. with PBS or RTX (30 mg/kg) 30 min before CLP. Data are mean  $\pm$  SEM. \* $P < .01$  relative to WT S-CLP mice.

S-CLP (Fig. 2C and D). This suggests that the maintenance of CXCR2 expression may explain the increased neutrophil migration and enhanced bacterial clearance seen in the TLR2<sup>-/-</sup> mice. In support of this supposition, TLR2<sup>-/-</sup> mice that received the CXCR2 antagonist repertaxin (RPX) exhibited markedly reduced neutrophil migration and abrogation of the enhanced bacterial clearance (Fig. 2E and F).

**Systemic Injection of TLR2 Agonist Suppresses Neutrophil Migration via Down-Regulation of CXCR2.**

We hypothesized that systemic activation of TLR2 down-regulates expression of CXCR2 on blood neutrophils, inhibiting their migration into the inflammatory site. To investigate our hypothesis, mice were given a single i.v. injection of the TLR2 agonist lipoteichoic acid (LTA), and after 2 h, surface CXCR2 expression and chemotaxis to CXCL2 in blood neutrophils were evaluated. The LTA injection induced a substantial reduction in the cell surface expression of CXCR2



**Fig. 3.** Systemic injection of TLR2 agonist suppresses neutrophil migration. (A) Flow cytometry of CXCR2 expression on blood neutrophils 2 h after i.v. injection of PBS or LTA (300  $\mu\text{g}/\text{mouse}$ ). (B) Chemotaxis of blood neutrophils to CXCL2 isolated 2 h after i.v. LTA injection. Data are mean  $\pm$  SEM. \* $P < .001$  relative to WT 5-CLP mice. (C and D) Neutrophils in peritoneal exudate 4 h after i.p. thioglycollate injection. (C) Mice were treated with PBS, PTX (4  $\mu\text{g}/\text{mouse}$ ), RPX (30 mg/kg), or LTA (100 and 300  $\mu\text{g}/\text{mouse}$ ) 30 min before thioglycollate injection. (D) WT and TLR2<sup>-/-</sup> mice were injected with either PBS or LTA (300  $\mu\text{g}/\text{mouse}$ , i.v.) 30 min before thioglycollate injection ( $n = 8$ ). Data are mean  $\pm$  SEM. \* $P < .001$  relative to the PBS group plus thioglycollate. (E and F) Adoptive transfer of ex vivo LTA-activated neutrophils. BM neutrophils were treated with LTA or untreated (control), labeled with 0.5 or 5.0  $\mu\text{M}$  CFSE, respectively, and infused i.v. into WT recipient mice in equal numbers. Then thioglycollate was injected i.p., and the peritoneal cells were harvested 4 h later. (E) Representative flow cytometry results of recovered CFSE<sup>+</sup> cells from an individual mouse ( $n = 5$ ). (F) Counts of recovered CFSE<sup>+</sup> cells. Data are mean  $\pm$  SEM. \* $P < .05$ .

on blood neutrophils (Fig. 3A), which was associated with decreased chemotaxis to CXCL2 (Fig. 3B).

To examine whether i.v. injection of LTA also could affect neutrophil influx into inflammatory sites, we evaluated neutrophil migration into thioglycollate-induced peritonitis 4 h after LTA i.v. injection. We further confirmed the role of G $\alpha_i$ -coupled CXCR2 in neutrophil migration induced by thioglycollate, using the CXCR2 antagonist RPX (30 mg/kg) and pertussis toxin (PTX; 4  $\mu\text{g}/\text{mouse}$ ). Neutrophil recruitment to the peritoneum was reduced in mice pretreated with PTX or RPX compared with control PBS mice (Fig. 3C). Notably, significantly inhibited

thioglycollate-induced neutrophil migration was observed after the LTA treatment (Fig. 3C). We confirmed that the inhibitory effects of LTA on neutrophil migration were mediated by TLR2 activation in the TLR2<sup>-/-</sup> mice (Fig. 3D). These findings indicate that systemic injection of LTA activates neutrophils in the circulation, promoting the down-regulation of surface CXCR2 expression and inhibiting neutrophil migration to the inflammatory site.

To investigate whether this effect of LTA is due to direct activation of neutrophils in the circulation, we incubated purified bone marrow (BM) neutrophils ex vivo in the presence or absence of LTA (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) for 1 h. We then labeled the LTA-treated and control cells with 0.5 or 5.0  $\mu\text{M}$  of the intracellular fluorescent dye carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE), respectively, to obtain CFSE<sup>high</sup> (control) and CFSE<sup>low</sup> (LTA-treated) populations (Fig. S2). A single-cell suspension, in a 1:1 ratio, was administered i.v. into recipient WT mice, followed immediately by the thioglycollate injection into the peritoneum. After 4 h, peritoneal cells were harvested, and CFSE-positive cells were analyzed by flow cytometry (Fig. 3E). As evidenced by the i.v. injection of LTA, neutrophils activated ex vivo with LTA migrated less efficiently into the peritoneal cavity compared with control neutrophils (Fig. 3F).

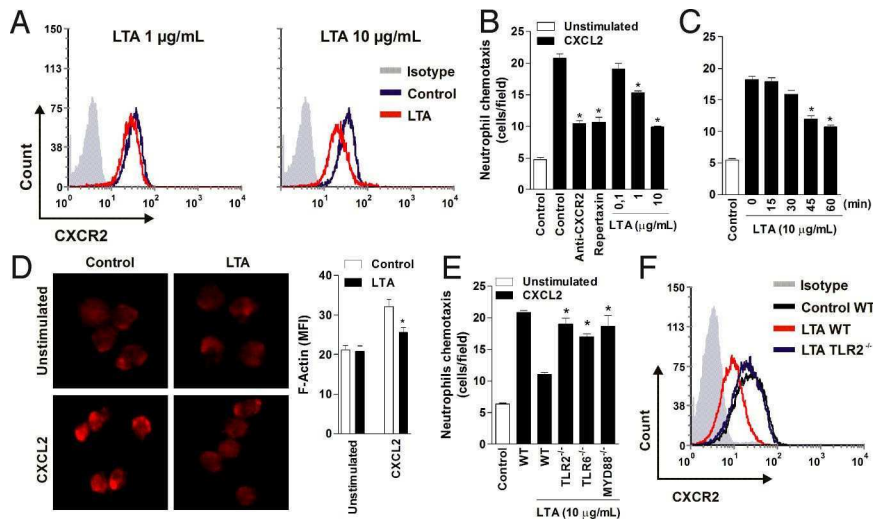
**Direct Activation of TLR2 in Neutrophils Down-Regulates CXCR2 and Impairs Chemotaxis.**

To address the direct effects of LTA and TLR2 signaling on surface CXCR2 expression of neutrophils, we incubated BM neutrophils with LTA for 1 h. Flow cytometry revealed that this LTA treatment reduced the surface expression of CXCR2 on neutrophils in a concentration-dependent manner compared with control cells (Fig. 4A). We confirmed that these changes in receptor expression were not due to changes in cellular viability, because the LTA-treated neutrophils had the same percentage of cell viability (Annexin V<sup>-</sup>/PI<sup>-</sup>) as the control cells (Fig. S3). Thus, we next determined the functional significance of the LTA-induced CXCR2 down-regulation by assessing chemotaxis and F-actin polymerization. We found a significant concentration- and time-dependent reduction in chemotaxis to CXCL2 in neutrophils treated with LTA (Fig. 4B and C), and similar results for CXCL1 (data not shown). We confirmed the ability of CXCL2 to induce neutrophil chemotaxis through CXCR2, using antibodies to CXCR2 and the CXCR2 antagonist RPX (Fig. 4B). The decreased surface expression of CXCR2 by LTA was accompanied by reduced F-actin polymerization in response to CXCL2 (Fig. 4D).

To address the role of TLR2 signaling in mediating the effects of LTA, we isolated BM neutrophils from WT, TLR2<sup>-/-</sup>, TLR6<sup>-/-</sup>, and MyD88<sup>-/-</sup> mice, incubated them with LTA (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), and evaluated the chemotaxis to CXCL2. The LTA-induced reduction of chemotaxis to CXCL2 in WT neutrophils was reversed in neutrophils lacking TLR2, TLR6, or MyD88 (Fig. 4E). The down-regulation of surface CXCR2 expression induced by LTA was inhibited in neutrophils from the TLR2<sup>-/-</sup> mice (Fig. 4F). In accordance with these findings, we confirmed significant TLR2 expression in WT BM neutrophils (Fig. S4).

**TLR2 Activation Up-Regulates GRK2 Expression in Neutrophils.**

To investigate the mechanisms through which TLR2 activation exerts its regulatory effect on CXCR2, we first used PCR to explore whether changes in the surface expression of CXCR2 reflect changes in the gene expression of this receptor. As illustrated in Fig. 5B, constitutive expression of mRNA to CXCR2 was detected in control neutrophils and was unaffected by incubation with LTA for 1 h. This finding suggests that the reduction of CXCR2 in the neutrophil surface is not due to regulation of its gene transcription. However, the inhibitory effect of LTA on chemotaxis to CXCL2 was abrogated by cycloheximide (CHX) (Fig. 5A), indicating a protein synthesis-

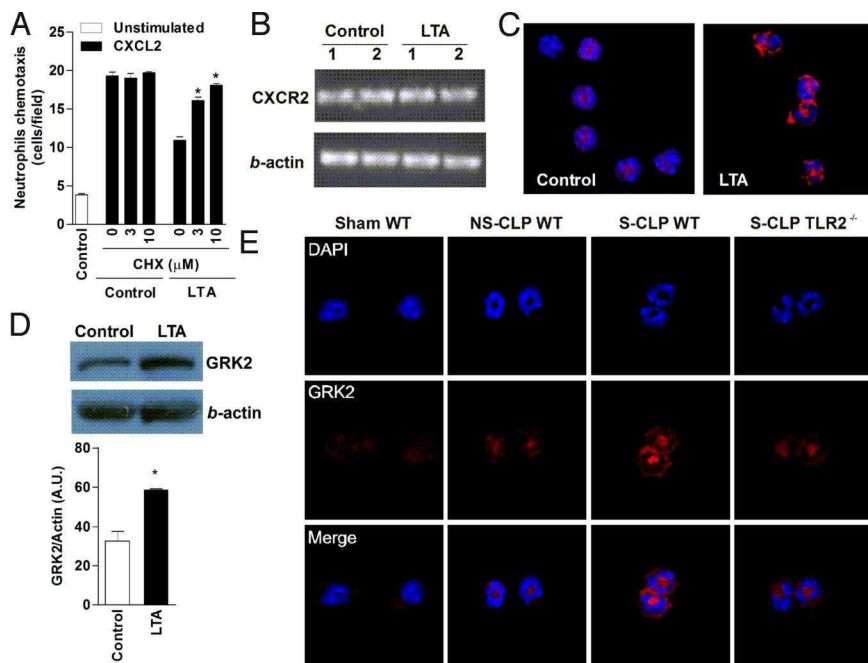


**Fig. 4.** Direct activation of TLR2 impairs chemotaxis in neutrophils. (A) Flow cytometry of CXCR2 expression on BM neutrophils treated with 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Right) or 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Left) of LTA or untreated (control) for 1 h. (B and C) Chemotaxis of BM neutrophils to CXCL2. (B) Neutrophils treated with anti-CXCR2 antibody, RPX (30 mg/kg), or LTA (0.1, 1, or 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) for 1 h. (C) Neutrophils treated with LTA (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) for different times, as indicated. Data are mean  $\pm$  SEM.  $*P < .001$  relative to the control group plus CXCL2. (D) F-actin polymerization of BM neutrophils to CXCL2 after LTA treatment. Representative images from 3 independent experiments are shown (Left). F-actin polymerization was quantified by mean fluorescence intensity (Right).  $*P < .001$  relative to the control group plus CXCL2. (E) Chemotaxis of WT, TLR2<sup>-/-</sup>, TLR6<sup>-/-</sup>, and Myd88<sup>-/-</sup> BM neutrophils to CXCL2 after LTA treatment. (F) Flow cytometry of CXCR2 expression on WT and TLR2<sup>-/-</sup> BM neutrophils after LTA treatment.

dependent mechanism of the cell surface CXCR2 loss after TLR2 activation. Because neutrophils can produce CXCR2 ligands in response to TLR agonists, a potential mechanism for LTA-induced reduced chemotaxis may be involve receptor desensitization by autocrine CXCR2 ligand signaling. After the 1-h LTA challenge, we found increased mRNA expression of CXCL1 and CXCL2; however, we did not detect any of these

proteins in cell supernatants (data not shown), providing evidence against the aforementioned autocrine mechanism.

Several studies have demonstrated a prominent role of GRK2 in the phosphorylation and internalization of chemokine receptors in leukocytes (15, 16). The ability of GRK2 to modulate a chemokine receptor is consistent with the high expression of this kinase in cells (17). We used fluorescence microscopy and



**Fig. 5.** TLR2 signaling up-regulates GRK2 expression in neutrophils. (A) CXCR2 and  $\beta$ -actin gene expression in LTA-treated neutrophils by RT-PCR. (B) Neutrophils chemotaxis to CXCL2 after treatment with CHX, a protein synthesis inhibitor, for 30 min and later with LTA (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) for 1 h or more. Data are mean  $\pm$  SEM.  $*P < .001$  relative to the WT control group plus CXCL2. (C) Representative fluorescence microscopy for GRK2 (red) in BM neutrophils after treatment with LTA (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) for 1 h. Nuclei were stained by DAPI (blue). (D) Representative immunoblot analysis of GRK2 and  $\beta$ -actin in neutrophil lysates after treatment with LTA (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) for 1 h. The graph shows data in arbitrary units of the density of GRK2 per  $\beta$ -actin band.  $*P < .01$ . (E) Representative fluorescence microscopy for GRK2 (red) in blood neutrophils isolated from septic WT and TLR2<sup>-/-</sup> mice 2 h after CLP. Nuclei were stained by DAPI (blue).

immunoblot analysis to explore whether LTA (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) stimulation increased the expression of GRK2 in neutrophils. We found significant up-regulation of GRK2 protein expression in LTA-treated neutrophils compared with control cells (Fig. 5 C and D). To extend the *in vitro* data to *in vivo*, we examined whether circulating neutrophils from septic mice expressed GRK2. Neutrophils from WT mice subjected to S-CLP demonstrated a profound increase in GRK2 protein expression compared with sham and NS-CLP mice (Fig. 5E). Notably, the GRK2 protein expression was substantially reduced in neutrophils from TLR2<sup>-/-</sup> S-CLP mice compared with those from WT mice (Fig. 5E).

## Discussion

This *in vitro* study examined the role of TLR2 on the regulation of neutrophil CXCR2 expression and the outcome of this regulation in experimental sepsis. We found that TLR2 agonist negatively regulated CXCR2 expression on the surface of isolated neutrophils by up-regulating the transcription of GRK2. Moreover, we found that peripheral blood neutrophils from severely septic mice expressed high levels of GRK2 and low levels of CXCR2. Notably, reduced expression of CXCR2 in circulating neutrophils was correlated with failure of migration to the site of infection, development of systemic inflammation, and high mortality. Thus, the present study provides a comprehensive set of data demonstrating for the first time the harmful role of TLR2 signaling in the pathophysiology of polymicrobial sepsis.

The recognition of bacteria by TLRs is important for eliminating invading pathogens. In particular, TLR2 plays a crucial role in the host defense against Gram-positive bacterial infection (18). However, the results reported here indicate that TLR2<sup>-/-</sup> mice display improved bacterial clearance and reduced mortality during severe polymicrobial sepsis as a consequence of the increased neutrophil recruitment to the infectious site. One potential explanation for this apparent discrepancy may be the diversity and magnitude of TLR stimulation between infection with a single pathogen and polymicrobial peritonitis. Therefore, we hypothesize that during an infection in which different bacterial ligands are present, the absence of signaling of one TLR does not impair the genesis of a local inflammatory response, but that the onset of the systemic inflammatory response resulting in impaired neutrophil migration depends on the activation of all TLRs by their respective agonists.

Chemokines coordinate the migration of leukocytes during inflammation via binding to specific chemokine receptors (19). CXCR2 plays a central role in the recruitment of neutrophils from the circulation into the site of inflammation (20). Impaired neutrophil migration during sepsis is correlated with down-regulation of CXCR2 expression on circulating neutrophils (14). We have identified TLR2 signaling as a crucial pathway in this phenomenon. We found that TLR2 deficiency prevented the down-regulation of CXCR2 on circulating neutrophils from mice with severe polymicrobial sepsis. Moreover, acute administration of the TLR2 agonist LTA in a single *i.v.* injection triggered a drastic reduction in the surface expression of CXCR2 on circulating neutrophils. Interestingly, this decreased CXCR2 expression was accompanied by reduced chemotaxis to CXCL2, similar to that observed on blood neutrophils in WT mice with severe sepsis. Furthermore, thioglycollate-induced peritoneal neutrophil migration, which is mediated mainly by CXCR2, was significantly inhibited by the *i.v.* injection of LTA. These findings indicate that the presence of bacterial products in the circulation promotes down-regulation of CXCR2 expression on blood neutrophils and impairs neutrophil migration. Indeed, LTA was able to down-regulate the expression of CXCR2 on the surface of isolated neutrophils *in vitro*, which was associated with reduction of chemotaxis and F-actin polymerization induced by CXCL2.

Moreover, in adoptive transfer experiments, we found that *in vitro* LTA-stimulated neutrophils transferred into naïve WT mice exhibited a significant reduced capacity to migrate into the peritoneal cavity in response to thioglycollate. Thus, direct activation of TLR2 on neutrophils is able to down-regulate chemokine receptor expression and migration.

How important is the modulation of chemokine receptor expression by TLRs? Once at the infectious focus, neutrophils no longer need to continue migrating, but they must respond by producing antimicrobial mediators to eliminate the invading pathogens. Thus, it is logical to suppose that TLRs might down-modulate neutrophil trafficking to keep these cells at the site of infection. Indeed, it has been shown that bacteria phagocytosis results in decreased surface expression of CXCR1 and CXCR2 in human neutrophils (21, 22). Extrapolating to a systemic infection context with high blood levels of TLR agonists, the down-regulation of chemokine receptors in peripheral circulating neutrophils (“wrong compartment”) may explain the drastic reduction of these cells in the infection focus.

A fundamental question that remains is how TLR activation down-regulates CXCR2 expression on neutrophils. Chemokine receptors belong to the G protein-coupled receptor family (GPCR), in which the major regulatory mechanisms are desensitization and internalization (23). GRKs are serine/threonine protein kinases that regulate receptor internalization of almost all GPCR families, including chemokine receptors (24). GRK2 has been implicated in the regulation of chemokine receptors (e.g., CCRs and CXCRs) and of innate chemoattractant receptors (e.g., fMLP and C5a receptors) (25, 26). We previously reported markedly increased GRK2 levels in neutrophils from septic patients (27), associated with decreased chemotactic responses to IL-8, LTB<sub>4</sub> and fMLP (7, 27). Recently, it has been shown that GRK2 protein levels are markedly increased by activation of TLR2 in macrophages (28). In the present study, we found that TLR2 activation substantially increased the protein expression of GRK2 in isolated neutrophils. Notably, peripheral blood neutrophils isolated from TLR2<sup>-/-</sup> mice with severe sepsis displayed reduced levels of GRK2 compared with those from WT mice. In conclusion, we have identified TLR2 as a regulator of CXCR2 expression in circulating neutrophils during severe sepsis by up-regulation of GRK2 expression.

## Materials and Methods

**Mice.** TLR2<sup>-/-</sup>, TLR6<sup>-/-</sup>, and MyD88<sup>-/-</sup> mice on the C57BL/6 background were obtained from the School of Medicine of Ribeirão Preto. All experiments were performed in accordance with the ethical guidelines of the School of Medicine of Ribeirão Preto, University of Sao Paulo.

**Sepsis Induction.** Sepsis was induced by CLP model as described previously (11). In brief, after the mouse was anesthetized, an incision was made on the abdomen. The cecum was exposed and ligated below the ileocecal junction, after which a single puncture was made through the cecum. A 30- or 18-gauge needle was used to induce NS-CLP or S-CLP, respectively. The survival rate was determined daily for 7 days after CLP induction.

**Neutrophil Migration.** Neutrophil migration was performed as described previously (10). In brief, peritoneal lavage fluids were harvested and total cell counts were performed using a Coulter ACT series cell counter. Differential cell counts were carried out on cytofluorimetry slides (Cytospin 3; Shandon Southern Products) stained by the May-Grünwald-Giemsa method.

**Bacterial Counts.** Bacterial counts were determined as described previously (29). In brief, samples of peritoneal lavage fluid and blood were harvested, plated on Muller-Hinton agar dishes (Difco Laboratories), and incubated for 24 h at 37 °C.

**Cytokine and Chemokine Determination.** Cytokine and chemokine concentrations were measured by ELISA using antibodies from R&D Systems.

**Neutrophil Isolation.** For BM neutrophils, femurs and tibias were removed and flushed with HBSS. The BM cells were suspended in HBSS and laid on top of a 2-layer Percoll (Sigma) gradient (72% and 65% in HBSS), and then centrifuged at  $1200 \times g$  for 30 min at 25 °C. Mature neutrophils recovered at the interface of the 65%–72% fractions were > 95% pure as determined by May-Grünwald-Giemsa staining and by Gr-1<sup>high</sup> expression by flow cytometry. For blood neutrophils, mice were anesthetized and blood was collected via cardiac puncture. The blood was suspended in HBSS, laid on top of a 3-layer Percoll gradient (78%, 69%, and 52%), and then centrifuged at  $1200 \times g$  for 30 min at 25 °C. The neutrophils were collected from the 69%–78% interface fractions.

**Chemotaxis Assay.** Chemotaxis was performed in a 48-well microchamber (Neuro Probe) using a 5- $\mu$ m-pore polycarbonate membrane. Neutrophils ( $1 \times 10^6$  cells/mL) were allowed to migrate toward CXCL2 (30 ng/mL) or medium alone at 37 °C with 5% CO<sub>2</sub>. After 1 h, the membrane was removed, fixed, and stained. Neutrophils that migrated through the membrane were counted under a light microscope on at least 5 randomly selected fields.

**F-Actin Assembly.** Neutrophils were incubated with CXCL2 (30 ng/mL) at 37 °C for 5 min. Cells were fixed, permeabilized, and stained with rhodamine-phalloidin (Molecular Probes). Microscopic analysis of fluorescent images was performed using an Olympus BX40-F4 epifluorescence microscope. The mean fluorescence intensity was determined from a linear measurement of individual cells' fluorescence. All cells of at least 5 randomly chosen fields of each slide were analyzed.

**Flow Cytometry Analysis.** Blood was collected via cardiac puncture. Aliquots (100  $\mu$ L) of whole blood were incubated with anti-CD16/CD32 mAbs (BD PharMingen), followed by incubation with phycoerythrin-conjugated anti-CXCR2 mAb (R&D Systems) and peridinin-chlorophyll-protein complex-conjugated anti-Gr-1 mAb (BD Biosciences). The cells were washed, depleted of red blood cells by hypotonic lysis, fixed, and analyzed by flow cytometry using a BD Biosciences FACSsort flow cytometer.

**Apoptosis Assay.** Apoptosis was determined by Annexin V apoptosis detection kit (Bender MedSystems). The cells were analyzed by flow cytometry using a BD Biosciences FACSsort flow cytometer.

**Fluorescence Microscopy.** Neutrophils were affixed on glass slides by cytospin centrifugation and then incubated with rabbit anti-mouse GRK2 Ab or isotype control (Santa Cruz Biotechnology). Then Alexa-Fluor 594-conjugated goat anti-rabbit IgG Ab (Invitrogen) was added. The cells were incubated with DAPI (Invitrogen) to stain the cell nucleus. Microscopic analysis of fluorescent images was performed using an Olympus BX-50 epifluorescence microscope.

**Adoptive Cell Transfer.** BM neutrophils were purified and incubated with LTA (10  $\mu$ g/mL) or control medium (unstimulated) for 1 h. Then LTA and unstimulated neutrophils ( $10^7$ /mL in PBS) were incubated with 5.0  $\mu$ M or 0.5  $\mu$ M carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFDA-SE; Molecular Probes), respectively, at 37 °C for 10 min. The cells were washed, and then a 1:1 ratio of LTA/unstimulated neutrophils ( $10^7$  total cells) was injected i.v. into WT recipient mice. To induce neutrophil migration, 3% thioglycollate was instilled into the peritoneum at the time of cell transfer. At 4 h postinjection, peritoneal lavage fluids were harvested, and the cells were analyzed for CFSE expression by flow cytometry using a BD Biosciences FACSsort flow cytometer.

**Statistical Analysis.** Data are expressed as mean  $\pm$  SEM. Student's unpaired *t* test was used to evaluate the differences between the WT and TLR2<sup>-/-</sup> groups. Survival rates were analyzed with the log-rank test, and bacterial counts were analyzed using the Mann-Whitney *U* test. A *P* value < .05 was considered significant.

**ACKNOWLEDGMENTS.** This work was supported by grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo and Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico.

- Nathan C (2006) Neutrophils and immunity: Challenges and opportunities. *Nat Rev Immunol* 6:173–182.
- Benjamin CF, Ferreira SH, Cunha FdQ (2000) Role of nitric oxide in the failure of neutrophil migration in sepsis. *J Infect Dis* 182:214–223.
- Crosara-Alberto DP, et al. (2002) Involvement of NO in the failure of neutrophil migration in sepsis induced by *Staphylococcus aureus*. *Br J Pharmacol* 136:645–658.
- Orinska Z, et al. (2007) IL-15 constrains mast cell-dependent antibacterial defenses by suppressing chymase activities. *Nat Med* 13:927–934.
- Alves-Filho JC, et al. (2008) The role of neutrophils in severe sepsis. *Shock* 30(Suppl 1):3–9.
- Chishti AD, Shenton BK, Kirby JA, Baudouin SV (2004) Neutrophil chemotaxis and receptor expression in clinical septic shock. *Intensive Care Med* 30:605–611.
- Tavares-Murta BM, et al. (2002) Failure of neutrophil chemotactic function in septic patients. *Crit Care Med* 30:1056–1061.
- Akira S, Takeda K (2004) Toll-like receptor signaling. *Nat Rev Immunol* 4:499–511.
- Plitas G, et al. (2008) Toll-like receptor 9 inhibition reduces mortality in polymicrobial sepsis. *J Exp Med* 205:1277–1283.
- Alves-Filho JC, de Freitas A, Russo M, Cunha FQ (2006) Toll-like receptor 4 signaling leads to neutrophil migration impairment in polymicrobial sepsis. *Crit Care Med* 34:461–470.
- Wichterman KA, Baue AE, Chaudry IH (1980) Sepsis and septic shock: A review of laboratory models and a proposal. *J Surg Res* 29:189–201.
- Cavaillon JM, et al. (2003) Cytokine cascade in sepsis. *Scand J Infect Dis* 35:535–544.
- Brown KA, et al. (2006) Neutrophils in development of multiple organ failure in sepsis. *Lancet* 368:157–169.
- Rios-Santos F, et al. (2007) 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* 175:490–497.
- Aragay AM, et al. (1998) Monocyte chemoattractant protein-1-induced CCR2B receptor desensitization mediated by the G protein-coupled receptor kinase 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:2985–2990.
- Oppermann M, Mack M, Proudfoot AEI, Olbrich H (1999) Differential effects of CC chemokines on CC chemokine receptor 5 (CCR5) phosphorylation and identification of phosphorylation sites on the CCR5 carboxyl terminus. *J Biol Chem* 274:8875–8885.
- Fan J, Malik AB (2003) Toll-like receptor 4 (TLR4) signaling augments chemokine-induced neutrophil migration by modulating cell surface expression of chemokine receptors. *Nat Med* 9:315–321.
- Takeuchi O, Hoshino K, Akira S (2000) Cutting edge: TLR2-deficient and MyD88-deficient mice are highly susceptible to *Staphylococcus aureus* infection. *J Immunol* 165:5392–5396.
- Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S (2007) Getting to the site of inflammation: The leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol* 7:678–689.
- Olson TS, Ley K (2002) Chemokines and chemokine receptors in leukocyte trafficking. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 283:R7–R28.
- Kobayashi SD, et al. (2003) From the cover: Bacterial pathogens modulate an apoptosis differentiation program in human neutrophils. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:10948–10953.
- Doroshenko T, et al. (2002) Phagocytosing neutrophils down-regulate the expression of chemokine receptors CXCR1 and CXCR2. *Blood* 100:2668–2671.
- Métayé T, Gibelin H, Perdrisot R, Kraimps J-L (2005) Pathophysiological roles of G-protein-coupled receptor kinases. *Cell Signal* 17:917–928.
- Pitcher JA, Freedman NJ, Lefkowitz RJ (1998) G protein-coupled receptor kinases. *Annu Rev Biochem* 67:653–692.
- Petra Langkabel JZMO (1999) Ligand-induced phosphorylation of anaphylatoxin receptors C3aR and C5aR is mediated by G protein-coupled receptor kinases. *Eur J Immunol* 29:3035–3046.
- Prossnitz ER, Kim CM, Benovic JL, Ye RD (1995) Phosphorylation of the N-formyl peptide receptor carboxyl terminus by the G protein-coupled receptor kinase, GRK2. *J Biol Chem* 270:1130–1137.
- Arraes SMA, et al. (2006) Impaired neutrophil chemotaxis in sepsis associates with GRK expression and inhibition of actin assembly and tyrosine phosphorylation. *Blood* 108:2906–2913.
- Loniewski K, Shi Y, Pestka J, Parameswaran N (2008) Toll-like receptors differentially regulate GPCR kinases and arrestins in primary macrophages. *Mol Immunol* 45:2312–2322.
- Godshall CJ, et al. (2002) Genetic background determines susceptibility during murine septic peritonitis. *J Surg Res* 102:45–49.

## CURRICULUM VITAE

Nome: Heitor Affonso de Paula Neto

Nascimento: 10 de maio de 1979

Naturalidade: Rio de Janeiro

### FORMAÇÃO ACADÊMICA

- Graduação em Medicina Veterinária – Universidade Federal Fluminense, março de 1999 a dezembro de 2004.
- Mestrado em Ciências (Microbiologia) – Instituto de Microbiologia – Universidade Federal do Rio de Janeiro
- Doutorado em Química Biológica – Instituto de Bioquímica Médica – Universidade Federal do Rio de Janeiro

### ORIENTAÇÃO DE ESTUDANTE

Rafael Silveira Amendola – co-orientação de iniciação científica de novembro de 2007 a março de 2010 (atualmente aluno de mestrado do Programa de Pós-graduação em Biologia da UERJ)

### ORIENTAÇÃO DE MONOGRAFIA

Rafael Silveira Amendola; co-orientação da monografia “Mecanismos Moleculares Envolvidos na Inibição da Migração de Neutrófilos Humanos pelo Lipopolissacarídeo Bacteriano” apresentada ao Departamento de Farmacologia do Instituto de Biologia da UERJ.

### COMUNICAÇÃO EM CONGRESSOS

1. Óxido nítrico inibe a migração de neutrófilos pela ativação da guanilato ciclase solúvel: potencial implicação terapêutica na sepse. VII Fórum Internacional de Sepse, 2010, Búzios.
2. Dissection of the modulatory role of nitric oxide on neutrophil migration reveals soluble guanylate cyclase as a potential therapeutic target in sepsis. Gordon Research Conferences on Gradient Sensing and Direct Cell Migration. Galveston, Texas, 2009.
3. Guanylate cyclase inhibition in sepsis restores neutrophil migration without compromising bacterial killing. XXXIII Congresso da Sociedade Brasileira de Imunologia, Ribeirão Preto, São Paulo, 2008.
4. Guanylate cyclase-cGMP-PKG signaling pathway mediates nitric oxide-dependent impairment of chemotactic responses in LPS-stimulated human neutrophils. 13th International Congress of Immunology, 2007, Rio de Janeiro.
5. Guanylate cyclase-cGMP-PKG signaling pathway mediates nitric oxide-dependent impairment of chemotactic responses in LPS-stimulated human neutrophils. 39o Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental. Ribeirão Preto, São Paulo, 2007.
6. Nitric Oxide and FasL are required for eosinophil apoptosis induction by prostaglandin E2. Nitric Oxide, Cytokines and Inflammation - an International Symposium, 2004, Rio de Janeiro.
7. Eosinofilia na asma experimental: papel dos glucocorticóides, citocinas, fatores de crescimento e IgE. Jornada de Iniciação Científica do Instituto Fernandes Figueira, 2003, Rio de Janeiro.
8. Allergen sensitization prevents upregulation of murine hematopoiesis by cyclooxygenase inhibitors. 54a. Reunião Anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência, 2002, Goiânia.
9. The effect of allergen sensitization on the modulation of murine hematopoiesis by COX inhibitors. XXXIV Congresso da Sociedade Brasileira de Farmacologia e Terapêutica Experimental, 2002, Águas de Lindóia.
10. Allergen sensitization prevents upregulation of murine hematopoiesis by cyclooxygenase inhibitors. XVI reunião anual da federação das sociedades de biologia experimental, 2001, Caxambu.
11. Allergen sensitization prevents upregulation of murine hematopoiesis by cyclooxygenase inhibitors. IX Reunião anual de Iniciação Científica da FIOCRUZ, 2001, Rio de Janeiro.
12. Role of glucocorticoids in upregulation of hematopoiesis. XVI latinamerican congress of pharmacology, 2000, Aguas de Lindoia.

### PUBLICAÇÕES

1. Paula Neto et al. *Shock*, ahead of print 13 may 2010, doi: 10.1097/SHK.0b013e3181e37ea8.
2. Alves-Filho et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 106: 4018-4023, 2009.
3. Arraes et al. *Blood*, 108: 2906-2913, 2006.
4. Elsas et al. *Brit. J. Pharmacol.*, 143:541-548, 2004.
5. Jones et al. *Nitric Oxide*, 11:184-193, 2004.
6. Lintomen et al. *Brit. J. Pharmacol.*, 135:1315-1323, 2002.

# 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](#)