

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

CLÁUDIA VALÉRIA DE ARAÚJO

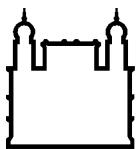
Estudo do envolvimento do receptor nuclear PPAR γ na sepse experimental

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos
requisitos para obtenção do título doutor em ciências

Orientador: Dra. Adriana Ribeiro Silva

RIO DE JANEIRO

2012



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

AUTOR: CLÁUDIA VALÉRIA DE ARAÚJO

Estudo do envolvimento do receptor nuclear PPAR γ na sepse experimental

ORIENTADOR: Dr. Adriana Ribeiro Silva

Aprovada em: 23/07/2012

EXAMINADORES:

Dr. Eduardo V. Tibiriçá - Presidente

Dra. Elvira Maria Saraiva Chequer Bou Habib - Membro

Dr. Bruno Lourenço Diaz - Membro

Dr. Cassiano Felipe Gonçalves de Albuquerque - Suplente

Dra. Carmen Penido Monteiro - Suplente e revisor

Rio de Janeiro, 23 de julho de 2012.

Dedico esta a tese a meus pais que sempre foram um exemplo de grande caráter para mim, me incentivando e me apoiando em todas as etapas da minha vida.

*“A mente quando se abre para uma nova ideia,
jamais volta a ser do tamanho original”.*

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora, Dra. Adriana Ribeiro Silva por ter acreditado no meu trabalho, por ter me dado a oportunidade de trabalhar sob sua supervisão com sugestões sempre relevantes e pelo incentivo de todas as horas. Muito obrigada também por sua amizade e por ter tornado a convivência leve e agradável a cada dia de trabalho. Todos que me conhecem sabem que sou muito grata a você.

Ao Dr. Hugo Caire de Castro-Faria-Neto e à Dra. Patrícia Torres Bozza, chefes do laboratório de Imunofarmacologia por terem me dado a oportunidade de ingressar na equipe e pelo exemplo de como se fazer ciência com ética e dedicação. Obrigada pelas sugestões importantes e discussões que muito contribuíram para o desenvolvimento desta tese e para meu amadurecimento profissional.

Ao Dr. Eduardo V. Tibiriçá, chefe do laboratório de Investigação Cardiovascular, pela colaboração científica, pelas sugestões e discussões sempre relevantes dos experimentos de microcirculação cerebral que resultou a publicação do artigo relacionado a presente tese. Meu agradecimento especial também, por ter participado do início da minha trajetória científica.

À Dra. Vanessa Estato de Freitas Almeida por sua amizade e parceria científica que muito contribuíram para o desenvolvimento desta tese e do artigo em colaboração. “Van” fico feliz por a tese ser um documento na qual ficará registrada aqui minha profunda admiração por você como uma profissional perseverante e pela pessoa maravilhosa que eu tive oportunidade de conviver ao longo destes anos. Obrigada por tudo, pelo apoio incondicional, mas principalmente por acreditar em mim sempre.

Ao amigo Alessandro do Nascimento e Fabiana Gomes pela ótima convivência, amizade e momentos de descontração. Vocês são pessoas especiais para mim. Obrigada também pelo apoio nos experimentos no laboratório de Investigação Cardiovascular, e por todas as sugestões relevantes.

Ao colega Felipe Freitas com a ajuda no Endnote®, pelas sugestões e pelos momentos de descontração.

Ao grupo Sepse do laboratório de Imunofarmacologia pelas sugestões de experimentos, pelas discussões sempre produtivas e pela convivência agradável.

À Dra. Clarissa M. Maya-Monteiro, à Dra Adriana Vallochi, à Dra. Cecília Almeida, ao Dr. Valber Frutuoso, pelas importantes discussões e sugestões durante o desenvolvimento da tese.

Aos colegas de trabalho e também de fora dele, Clarissa Campbell, Flora Magno, Isaclaudia Azevedo, Pedro Alexandre Braga, Edson Assis, Isabel Mattos, André Costa, Mariana Cunha pela ótima convivência no dia-a-dia de bancada, pela amizade e ajuda com os experimentos.

À Dra. Rachel Novaes Gomes, Dra. Adriana Vieira de Abreu, Dra. Daniele Nascimento pela contribuição com sugestões de experimentos, pelos protocolos doados, na ajuda com as dúvidas de experimentos e discussões sempre relevantes.

À Dra Patrícia Reis e ao Dr. Cassiano Albuquerque pela agradável convivência dentro e fora do laboratório, pela amizade, e também pelas sugestões relevantes que fizeram parte desta tese.

À Rose Branco, secretária do Laboratório de Imunofarmacologia, por todo o seu apoio administrativo, sua competência profissional que foram primordiais para o bom funcionamento do nosso laboratório.

A todo o pessoal do Biotério, à equipe de limpeza e à secretaria do Pavilhão Ozório de Almeida.

A todos do Laboratório de Imunofarmacologia, a equipe do pavilhão 108 e alunos de iniciação científica, pelo ótimo convívio.

Ao Dr. Guy A. Zimmerman, pela oportunidade de trabalhar com a sua equipe no Human Genetic Laboratory - University of Utah, durante o doutorado sanduíche. Muito obrigada pelas relevantes sugestões, artigos, pelas discussões de experimentos realizados em seu laboratório e que fazem parte desta tese, e por ser um exemplo de profissional brilhante e de humildade. “Thank you Guy”!

Ao Dr. Christian Yost pelos protocolos de “NETs”, direcionamento e discussões relevantes dos experimentos realizados na University of Utah.

Ao Dr. Andrew Weyrich pesquisador da University of Utah, pelas sugestões de experimentos, pelas discussões e críticas sempre construtivas e, principalmente por ter me acolhido nos Estados Unidos fazendo-me sentir parte da sua família. Minha eterna gratidão.

Aos colegas e todo corpo de funcionários do laboratório Human Genetic Laboratory - University of Utah pela ótima convivência, e principalmente ao técnico Mark Cody, pela paciência no treinamento dos experimentos realizados nos Estados Unidos.

Aos meus familiares e amigos que sempre me apoiaram, torceram por mim de longe ou de perto, e que de alguma forma contribuíram para o andamento deste trabalho.

À revisora, Dra. Carmen Penido e aos demais membros da banca por ter aceitado o convite e pela colaboração valiosa.

A todos que fazem parte do corpo de docentes e aos que trabalham no programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular do Instituto Oswaldo Cruz, pelo apoio acadêmico e técnico para a realização deste trabalho.

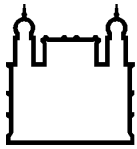
Às agências de fomento, CNPq, FAPERJ e principalmente a CAPES por todo o suporte financeiro dentro e fora do país e por proporcionar a minha participação no programa de doutorado sanduíche no exterior (PDSE).

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| Resumo..... | xi |
| Abstract..... | xii |
| Lista de abreviaturas..... | xiii |
| Lista de figuras..... | xviii |
| Lista de tabelas..... | xx |
| Capítulo 1: INTRODUÇÃO..... | 1 |
| 1.1 Sepsis: definição e epidemiologia..... | 1 |
| 1.2 Fisiopatologia da sepsis..... | 2 |
| 1.2.1 Reconhecimento de produtos microbianos e resposta inflamatória..... | 2 |
| 1.2.2 Mediadores inflamatórios – Citocinas..... | 5 |
| 1.2.3 Quimiocinas..... | 9 |
| 1.2.4 Óxido nítrico e espécies reativas de oxigênio (ROS) na sepsis..... | 10 |
| 1.2.5 Células efectoras na sepsis..... | 13 |
| 1.2.5.1 Macrófagos..... | 13 |
| 1.2.5.2 Neutrófilos..... | 13 |
| 1.2.5.2.1 Redes extracelulares formadas por neutrófilos (NETs)..... | 16 |
| 1.2.5.3 Células endoteliais..... | 18 |
| 1.2.6 Microcirculação na sepsis..... | 19 |
| 1.2.7 Microcirculação cerebral na sepsis..... | 21 |
| 1.2.8 Tratamento na sepsis..... | 22 |
| 1.2.9 Receptores ativados por proliferador de peroxissomo γ (PPAR γ)..... | 23 |
| 1.2.10 Ligantes de PPAR γ | 26 |
| 1.2.10.1 Tiazolidinedionas: estrutura química..... | 26 |
| 1.2.11 Papel do PPAR γ na sepsis..... | 26 |
| Capítulo 2: OBJETIVOS..... | 28 |
| 2.1 Objetivo geral..... | 28 |
| 2.2 Objetivos específicos..... | 28 |
| Capítulo 3: MATERIAIS E MÉTODOS..... | 29 |
| 3.1 Experimentos <i>in vivo</i> | 29 |
| 3.1.1 Animais..... | 29 |
| 3.1.2 Indução de infecção polimicrobiana pelo modelo CLP..... | 29 |
| 3.1.3 Modelo de sepsis por injeção de macerado fecal..... | 29 |
| 3.1.4 Tratamento com ligantes de PPAR γ | 30 |
| 3.1.5 Curva de sobrevivência após a indução de CLP ou após o modelo de injeção de fezes..... | 30 |
| 3.1.6 Análise do grau da severidade da sepsis - escore clínico..... | 30 |
| 3.1.7 Determinação de parâmetros celulares (leucometria) após CLP..... | 31 |
| 3.1.8 Contagem total e diferencial das células do lavado peritoneal..... | 31 |
| 3.1.9 Avaliação da carga bacteriana- contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) | 31 |

| | | |
|--------------------|--|----|
| 3.1.10 | Avaliação da glicemia dos animais submetidos à CLP..... | 32 |
| 3.1.11 | Microscopia intravital cerebral por epi-iluminação e fluorescência..... | 32 |
| 3.1.12 | Medidas hemodinâmicas de pressão arterial e frequência cardíaca..... | 33 |
| 3.2 | Experimentos <i>in vitro</i> | 33 |
| 3.2.1 | Dosagem de citocina e quimiocina..... | 33 |
| 3.2.2 | Análise de corpúsculos lipídicos..... | 34 |
| 3.2.3 | Análise de óxido nítrico..... | 34 |
| 3.2.4 | Ensaio de estresse oxidativo..... | 35 |
| 3.2.5 | Cultura de <i>E. coli</i> e ligantes de PPAR γ | 35 |
| 3.2.6 | Purificação de polimorfonucleares humanos (PMNs) por gradiente de Ficoll..... | 35 |
| 3.2.7 | Purificação de PMNs humanos por coluna magnética..... | 36 |
| 3.2.8 | Cultura de PMNs humanos incubados com <i>E. coli</i> | 36 |
| 3.2.9 | Indução na formação de NETs..... | 36 |
| 3.2.9.1 | <i>Western blotting</i> para proteína histona (H3) em PMNs..... | 38 |
| 3.2.10 | Quantificação da eliminação de bactérias associada à netose..... | 38 |
| 3.2.11 | Coleta de cérebro para ensaios de mieloperoxidase (MPO)..... | 39 |
| 3.2.12 | Ensaio de atividade MPO..... | 39 |
| 3.2.13 | Dosagem de proteínas..... | 39 |
| 3.3 | Drogas e soluções..... | 39 |
| 3.4 | Análise Estatística..... | 43 |
| Capítulo 4: | RESULTADOS | 44 |
| 4.1. | Efeito protetor do agonista PPAR γ na sobrevida de camundongos <i>Swiss</i> submetidos à CLP em diferentes vias de administração..... | 44 |
| 4.2 | Efeito do pós-tratamento com Rosiglitazona camundongo <i>Swiss</i> na sobrevida de camundongos swiss 6h após CLP..... | 45 |
| 4.3 | Efeito da Rosiglitazona na sobrevida de animais submetidos ao modelo de macerado fecal..... | 46 |
| 4.4 | Efeito da Rosiglitazona no escore clínico de severidade de sepse em camundongos <i>Swiss</i> submetidos à CLP..... | 47 |
| 4.5 | Análise da celularidade do lavado peritoneal e sangue de animais <i>Swiss</i> submetidos à CLP..... | 48 |
| 4.6 | Efeito da Rosiglitazona sobre a produção de citocinas do lavado peritoneal..... | 51 |
| 4.7 | Quantificação de UFC presentes no lavado peritoneal em animais <i>Swiss</i> submetidos à CLP..... | 53 |
| 4.8 | Avaliação da biogênese de corpúsculo lipídeos de leucócitos de animais submetidos à CLP..... | 54 |
| 4.9 | Efeito da Rosiglitazona na glicemia em animais submetidos ao CLP..... | 55 |
| 4.10 | Efeito da Rosiglitazona na microcirculação cerebral de camundongos <i>Swiss</i> | |

| | |
|--|------------|
| submetidos ao CLP..... | 56 |
| 4.10.1 Efeito da Rosiglitazona na interação leucócito-endotélio na microcirculação cerebral..... | 56 |
| 4.11 Efeito do tratamento com Rosiglitazona sobre a atividade MPO no tecido cerebral de animais após CLP..... | 59 |
| 4.12 Efeito da Rosiglitazona na densidade capilar funcional na microcirculação cerebral durante a sepse..... | 61 |
| 4.13 O efeito da Rosiglitazona na microcirculação cerebral não depende das alterações na pressão arterial e frequência cardíaca de animais sépticos..... | 63 |
| 4.14 Efeitos diretos dos ligantes de PPAR γ no crescimento bacteriano..... | 65 |
| 4.15 Efeito da Rosiglitazona na liberação de óxido nítrico na cavidade peritoneal de animais submetidos à CLP..... | 67 |
| 4.16 O tratamento com Rosiglitazona aumenta a produção de espécie reativa de oxigênio (ROS) em experimento <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> de estresse oxidativo em animais submetidos à CLP..... | 68 |
| 4.17 O tratamento com Rosiglitazona aumenta a eliminação bacteriana por PMNs humanos após estimulação com <i>E. coli</i> | 70 |
| 4.18 Rosiglitazona aumenta a formação NETs em células estimuladas com LPS..... | 71 |
| 4.19 Curso temporal dos efeitos da Rosiglitazona na formação de NETs estimuladas por LPS..... | 74 |
| 4.20 Efeito direto dos ligantes de PPAR γ na formação de NETs..... | 77 |
| 4.21 Efeito da Rosiglitazona na formação de NETs é mediado pelo receptor PPAR γ | 79 |
| 4.21.1 Efeito na formação de redes extracelulares induzidas neutrófilos em células estimuladas com LPS..... | 79 |
| 4.21.2 Efeito da Rosiglitazona na formação de NETs em células estimuladas com <i>E. coli</i> | 81 |
| 4.22 Efeito do receptor PPAR γ na liberação da proteína histona H3 em PMNs estimulados com LPS ou <i>E.coli</i> | 83 |
| 4.23 Aumento da eliminação bacteriana induzida por Rosiglitazona é mediada por netose..... | 85 |
| Capítulo 5: DISCUSSÃO..... | 88 |
| Capítulo 6: CONCLUSÕES..... | 103 |
| Capítulo7: REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 105 |
| ANEXO..... | 123 |



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

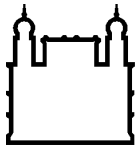
Estudo do envolvimento do receptor nuclear PPAR γ na sepse experimental

RESUMO

Tese de doutorado

Cláudia Valéria de Araújo

A regulação deficiente da resposta inflamatória do indivíduo aos produtos microbianos é crucial para a mortalidade de paciente com SIRS (síndrome da resposta inflamatória sistêmica) e sepse. Vários mediadores inflamatórios são liberados e a regulação da expressão destes mediadores é crítica para a defesa do hospedeiro, mas também pode resultar em dano tecidual, disfunção orgânica múltipla e morte. Estratégias anti-inflamatórias são investigadas no tratamento da sepse. Estudos têm focado em fatores transcricionais que possuem um interesse terapêutico, como receptor nuclear PPAR γ (receptor ativado por proliferador de peroxissomo do tipo gama). Nosso objetivo principal foi caracterizar o papel do PPAR γ na sepse experimental. Foram feitas análises de sobrevivência e parâmetros inflamatórios, como eliminação bacteriana, produção de mediadores inflamatórios e migração celular, além da avaliação da microcirculação cerebral 24 horas após a ligadura e punção cecal (CLP) em animais tratados com agonista de PPAR γ (Rosiglitazona) 15 min após a indução de sepse. Observamos um aumento da sobrevivência de camundongos submetidos à CLP e tratados com Rosiglitazona. Em animais submetidos à sepse grave, a Rosiglitazona foi igualmente eficaz em aumentar a sobrevivência dos animais e induzir uma melhora no quadro clínico. Nos animais tratados com Rosiglitazona houve um aumento nos níveis plasmáticos de mediadores anti-inflamatórios como a IL-10 e CCL2 e decréscimo de mediadores pró-inflamatórios como TNF- α , IL-6 e de corpúsculos lipídicos, sem alteração da glicemia. Houve uma diminuição plasmática da quimiocina CXCL1 nos animais tratados com Rosiglitazona quando comparados ao grupo controle. Além disso, observamos um aumento na migração de neutrófilos peritoneais de animais submetidos à CLP e o pós-tratamento com Rosiglitazona foi capaz de reverter este efeito. Observamos que a Rosiglitazona diminuiu o número de unidades formadoras de colônias (UFC) do lavado peritoneal, que se correlacionou com o aumento no metabolismo oxidativo de células fagocíticas com a diminuição da taxa de mortalidade. Em um estudo *in vitro* com *E. coli* incubadas com ligantes de PPAR γ observamos que não houve alteração do crescimento bacteriano, mostrando que a Rosiglitazona não parece ter um efeito direto sobre o patógeno. Em outro experimento *in vitro* com neutrófilos humanos incubados com LPS ou *E. coli*, a Rosiglitazona aumentou a eliminação bacteriana por estas células e levou a um aumento na formação de redes extracelulares de neutrófilos (*NETs*) por estas células. O antagonista do PPAR γ , o GW9662 foi capaz de reverter este efeito. A Rosiglitazona também foi capaz de aumentar a liberação da proteína histona em polimorfonucleares (PMNs), um importante marcador na formação de *NETs* e o GW9662 reverteu este efeito. Nos experimentos de microcirculação cerebral, a Rosiglitazona diminuiu o rolamento, a aderência dos leucócitos no endotélio vascular, assim como a rarefação capilar, aumentando a perfusão tecidual cerebral. Estes efeitos foram independentes de alterações na pressão arterial média e frequência cardíaca. Nossos estudos indicam que a Rosiglitazona atuou em diversos parâmetros da fisiopatologia da sepse, modulando a resposta inflamatória, aumentando a eliminação bacteriana, melhorando o quadro clínico e diminuindo a mortalidade em camundongos sépticos. É de extrema importância o entendimento dos mecanismos moleculares envolvidos na sepse, para que possa servir de potencial manobra ou intervenção terapêutica no futuro.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

The involvement of nuclear receptor PPAR γ in an experimental model of sepsis

ABSTRACT

Tese de doutorado

Cláudia Valéria de Araújo

The defective regulation of the inflammatory response to microbial products is crucial in mortality rate of patients with SIRS (systemic inflammatory response syndrome) and sepsis. Several inflammatory mediators are released and the regulation in expression of these mediators is critical for host defense, but can also result in tissue damage, multiple organ failure, and death. Anti-inflammatory strategies are investigated for sepsis treatment. Studies have been focusing on transcription factors with a therapeutic interest, such as the nuclear receptor PPAR γ (Peroxisome proliferator-activated receptors γ). Our main objective was to characterize the role of PPAR γ in experimental sepsis. Survival analyzes were performed, as well as the inflammatory parameters, such as bacterial clearance, inflammatory mediators productions and cellular migration. We assessed the brain microcirculation 24 hours after CLP in animals treated with Rosiglitazone. Our results have shown an increase in survival rate with Rosiglitazone treatment. In a model of severe sepsis Rosiglitazone was equally effective in increasing the survival rate accompanied by an improvement in clinical status. The Rosiglitazone treatment increased the inflammatory mediators levels, such as IL-10 and CCL2 with a decrease of pro-inflammatory mediators such as TNF- α , IL-6, as well as a decrease in lipid bodies formation. A reduction in chemokine CXCL1 was also observed in animals treated with Rosiglitazone compared to control groups. An increase of neutrophils migration was seen in the peritoneal cavity 24 hours after CLP and the Rosiglitazone post-treatment was effective into reversing this parameter. A reduced number of colony forming units (CFU) of peritoneal fluid was also observed in rosiglitazone treatment which was directly correlated with an increase in oxidative stress and survival rate. However, in our experiments we did not observed any alteration of animals blood glucose levels. In an in vitro study with E. coli incubated only with PPAR γ ligands, no changes on bacterial growth was seen, demonstrating that Rosiglitazone by itself does not have an effect on the pathogen. In another experiment with human neutrophils incubated with LPS or E. coli in the presence of Rosiglitazone, we observed an increase in the extracellular bacterial clearance mediated by netosis. The PPAR γ antagonist, GW9662, was able to reverse this effect. Rosiglitazone also enhanced the release of histone protein in PMNs, an important marker of NETs formation, and this effect was abolished by GW9662. During the assesment of cerebral microcirculation, Rosiglitazone decreased leukocyte rolling and adhesion to the vascular endothelium, as well as the capillary rarefaction, resulting with an improvement of brain perfusion. It was supposed that these effects were independent of haemodynamic changes. Finally, our studies suggested that Rosiglitazone acts on several parameters in the pathophysiology of sepsis by modulating the inflammatory response, increasing the bacterial clearance, improving clinical score, and reducing mortality rate in septic mice. In addition, it is extremely important in the understanding of molecular mechanisms involved in sepsis syndrome, thus it might serve as a potential therapeutic intervention or maneuver in the future.

LISTA DE ABREVIATURAS

- AA - Ácido araquidônico (do Inglês, *Aracdonic Acid*)
- ADP - Adenosina difosfato
- ADRP - Proteína relacionada com a diferenciação de adipócitos (do Inglês, *Adipocyte Differentiation Related Protein*)
- AIDS - Síndrome da imunodeficiência adquirida (do Inglês, *Acquired Immunodeficiency Syndrom*),
- AP-1- Proteína ativadora-1 (do Inglês, *Activator Protein-1*)
- APACHE - (do Inglês, *Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II*)
- AQP- Aquaporina (do Inglês, *Aquaporins*)
- BASES – Estudo epidemiológico da sepse no Brasil (do Inglês, *Brazilian Sepsis Epidemiological Study*)
- BHE - Barreira Hematoencefálica
- BPI - Proteína de aumento da permeabilidade bacteriana (do Inglês, *Bactericidal Permeability Increasing Protein*)
- BSA - Albumina bovina sérica (do Inglês, *Bovine Serum Albumin*)
- CARS - Síndrome da resposta antiinflamatória compensatória (do Inglês, *Compensatory Anti-inti-inflammatory Response Syndrom*)
- CBP- Proteína Ligadora de CREB (do Inglês, *CREB-Binding Protein*)
- CREB - Elemento de resposta ao cAMP (do Inglês, *cAMP-Response Element-Binding*)
- CD - *Cluster of Differentiation*
- CECAL - Centro de Criação de Animais de Laboratório da Fundação Oswaldo Cruz
- CLP - Ligadura e punção cecal (do Inglês, *Cecal ligation and puncture*)
- COX - Ciclooxigenase
- CEUA - Comitê de Ética no Uso de Animais
- CC - Quimiocina com motivo CC
- CXCR2 - do Inglês, *CXC chemokine receptor 2*
- cPLA₂ - fosfolipase A₂ citosólica (do Inglês, *Cytosolic Phospholipase A₂*)
- DCF - Densidade Capilar Funcional
- DGC – Doença granulomatosa crônica
- DHR - Dihidrorodamina
- DIC - Coagulação intravascular disseminada (do Inglês, *Disseminated Intravascular Coagulation*)
- DNA - Ácido desoxirribonucleico (do Inglês, *Deoxyribonucleic Acid*)

DAPI - 4'-6-Diamidino-2-fenilindol (do Inglês, *4'-6-Diamidino-2-phenylindole*)

DMSO - Dimetil Sulfóxido (do Inglês, *Dimethyl Sulfoxide*)

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético (do Inglês, *Ethylenediamine Tetraacetic Acid*)

ELISA - do Inglês, *Enzyme-linked Immunosorbent Assay*

EPM - Erro padrão da média

ERK - Quinases ativadas por sinal extracelular (do Inglês, *Extracellular Signal-regulated Kinases*)

ET- Redes extracelulares (do Inglês, *Extracellular Traps*)

EUA – Estados Unidos da América

G-CSF - Fator estimulador de colônia de granulócitos (do Inglês, *Granulocyte Colony Stimulating Factor*)

GM-CSF - Fator estimulador de colônia de macrófago-granulócito (do Inglês, *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF)

h – hora

HBSS – Solução salina balanceada de Hanks (do Inglês, *Hank's balanced salt solution*)

HDAC - Histona deacetilase (do Inglês, *Histone Deacetylase*)

ICAM - (do Inglês, *Intercellular Adhesion Molecule*)

IFN - Interferon

IL - Interleucina

iNOS - Óxido nítrico sintase induzida (do Inglês, *inducible nitric oxide sintase*)

i.p. – Intraperitoneal

i.v. - Intravenosa

IRA - Insuficiência renal aguda

IRAK-1 - Proteína quinase associada ao receptor da IL-1 (do Inglês, *Interleukin 1 receptor-associated kinase*)

IκB - Subunidade inibitória kappa B (do Inglês, *Inhibitory kappa B*)

IKK - IκB quinase

KC - Homóloga murina da quimiocina IL-8 humana

JNK - c-Jun N-terminal quinase (do Inglês, *c-Jun N-terminal kinase*)

LBP - Proteína ligante de LPS (do Inglês, *LPS-Binding Protein*)

LDL - Lipoproteína de baixa densidade (do Inglês, *Low-Density Lipoprotein*)

LFA - do Inglês, *Lymphocyte Function-Associated antigen*

fLNP - formil-metionil-leucil-fenilalanina

HSP70 - Proteína do choque térmico 70 (do Inglês, *Protein Heat shock 70*)

LO - Lipoxigenase

LL-37- Catelicidina (do Inglês, *Cathelicidin 37*)

LPS – Lipopolissacarídeo (do Inglês, *Lipopolysaccharide*)

LT - Leucotrieno (do Inglês, *Leucotriene*)

MAPK - Proteína quinase ativada por mitógeno (do Inglês, *Mitogen-Activated Protein K*)

CCL2- Proteína quimiótática para monócitos-1/ligante membro da família CCL2 (do Inglês, *Monocyte Chemotactic Protein-1*)

MHC - Complexo principal de histocompatibilidade

MIP - Proteína inflamatória de macrófagos (do Inglês, *Macrophage Inflammatory Protein*)

MIF - Fator inibidor da migração de macrófagos (do Inglês, *Migration Inhibitory Factor*)

min - minutos

MPO- Mieloperoxidase

mRNA - Ácido ribonucleico mensageiro (do Inglês, *Ribonucleic acid messenger*)

MyD88 - Fator de diferenciação mielóide 88 (do Inglês, *Myeloid Differentiation Factor 88*)

NADPH - Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo-Fosfato (do Inglês, *Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate*)

NF-kB - Fator nuclear kappa-B

NK – do Inglês, *Natural Killer*

NETs - Redes extracelulares formadas por neutrófilos (do Inglês, *Neutrophil Extracellular Traps*)

NO - Óxido nítrico (*Nitric Oxide*)

NcoR – Receptor nuclear co-repressor (do Inglês, *Nuclear receptor co-repressor*)

NOD - Domínio de Oligomerização Nucleotídeo (do Inglês, *Nucleotide-oligomerization domain*)

PAF - Fator de ativação plaquetária (do Inglês, *Platelet Activating Factor*)

PAF-AH - Fator de ativação plaquetária acetil hidrolase (do Inglês, *Platelet activating factor-acetylhydrolase*)

PAMP - Padrões moleculares associados a patógenos (do Inglês, *pathogen-associated molecular patterns*)

PAT – do Inglês, *Phosphinothricin N-acetyltransferase*

PBMC - Células mononucleares do sangue periférico (*Peripheral Blood Mononuclear Cell*)

PBS - Solução Salina Tamponada por Fosfato (*Phosphate buffered Saline*)

PCA - Piruvato Carboxilase (*Pyruvate Carboxylase*)

PKC - Proteína quinase C (*Protein Kinase C*)

PG - Prostaglandina (*Prostaglandin*)

15dPGJ₂ - 15 deoxi -2,14 prostaglandina J₂

PLA₂ - Fosfolipase A₂ (*Phospholipase A₂*)

PMA - *Phorbol Myristate Acetate*

PMNs – Leucócitos Polimorfonucleares (do Inglês, *Polymorphonuclear Leukocyte*)

PPAR - Receptor proliferador de Peroxissomo (do Inglês, *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor*)

PPRE - Elemento responsivo proliferador de peroxissomo (do Inglês, *peroxisome proliferator response element*)

PRR - Receptor de reconhecimento de padrões (do Inglês, *Pattern Recognition Receptor*)

PRP - Plasma rico em plaquetas

PRL - Plasma rico em leucócitos

RNS - Espécies reativas de nitrogênio (do Inglês, *Reactive Nitrogen Species*)

ROS - Espécies reativas de oxigênio (do Inglês, *Oxygen Species*)

RIG - *Gene do ácido retinóico induzível* (do Inglês, *Retinoic induced-gene*)

RXR – Receptor X retinóide (do Inglês, *Retinoid X receptor*)

SDOM - Síndrome da disfunção orgânica múltipla

SIRS - Síndrome da resposta inflamatória sistêmica (do Inglês, *Systemic Inflammatory Response Syndrome*)

SDMM- Síndrome da disfunção mitocondrial e microcirculatória

SRC-1 (do inglês, *Steroid Receptor Co-activator 1*)

STAT - Transdutor de Sinal e Ativador de Transcrição (do inglês, *Signal Transducer and Activator of Transcription*)

TBS - Solução Salina Tamponada por Tris (do inglês, *Tris Buffered Saline*)

TGF- β - Fator transformador de crescimento β (do inglês, *Transforming Growth Factor β*)

TLB - Proteína transducina do tipo β (do Inglês, *Transducine Protein β*)

LTh - Linfócito T auxiliar (do inglês, *Lymphocyte T helper*)

TLR - Receptores do tipo toll (do inglês, *Toll like receptors*)

TNF - Fator de necrose tumoral (do inglês, *Tumor Necrosis Factor*)

TOG - Creatinina e transaminase oxalacética glutâmica

TPG -Transaminase pirúvica glutâmica

TRAM - Molécula adaptadora relacionada a TRIF (do Inglês, *TRIF-related Adaptor Molecule*)

TRIF - do Inglês, *TIR domain-containing adaptor-inducing interferon- β*

TRAF - Fator associado com receptor do *TNF* (do Inglês, *Receptor-associated factor de TNF*)

TSA - do Inglês, *Trypticase Soy Agar*

TIP- Proteína de interação de porção terminal (do Inglês, *Terminal interaction protein*)

TX - Tromboxano (do Inglês, *Tromboxane*)

TZD - Tiazolidinedionas (do Inglês, *Thiazolidinediones*)

UTI - Unidade de Terapia Intensiva

UFC - Unidade Formadora de Colônia (do Inglês, *Colony Forming Unit*)

V.O. - Via oral

VCAM - Molécula de adesão vascular (*Vascular Adhesion Molecule*)

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1.2.1: Mecanismo de transdução de sinal do receptor Toll-4 decorrentes da interação da endotoxina bacteriana, o LPS..... | 4 |
| Figura 1.2.2: Corpúsculos lipídicos em células mononucleares fixadas e/ou coradas por diferentes metodologias..... | 8 |
| Figura 1.2.4: Papel do óxido nítrico (NO) na fisiopatologia da síndrome da resposta inflamatória sistêmica (<i>Systemic Inflammatory Response Syndrome - SIRS</i>)..... | 12 |
| Figura 1.2.5.2: Processo de migração de neutrófilos do sangue para o sítio infeccioso..... | 15 |
| Figura 1.2.5.2.1: Possíveis mecanismos de formação de redes extracelulares..... | 17 |
| Figura 1.2.6: A microcirculação é o motor da sepse..... | 20 |
| Figura 1.2.9: Mecanismos da inibição da expressão de genes pró-inflamatórios dependentes de PPAR γ | 25 |
| Figura 1.2.10.1: Estrutura química da Rosiglitazona e Pioglitazona..... | 26 |
| Figura 4.1: Curva de sobrevida de animais submetidos ao modelo de CLP e tratados com Rosiglitazona em diferentes vias de administração..... | 44 |
| Figura 4.2: Efeito do pós-tratamento com Rosiglitazona na sobrevida de animais 6 horas após o CLP..... | 45 |
| Figura 4.3: Efeito do tratamento com Rosiglitazona em animais após o modelo de sepse severa..... | 46 |
| Figura 4.4: Efeito da Rosiglitazona sobre o escore clínico de gravidade de camundongos <i>Swiss</i> submetidos à CLP..... | 47 |
| Figura 4.5A: Análise da celularidade de amostras do lavado peritoneal de camundongos tratados com Rosiglitazona..... | 49 |
| Figura 4.5B: Análise da celularidade de amostras do sangue de camundongos tratados com Rosiglitazona..... | 50 |
| Figura 4.6: Efeito da Rosiglitazona na produção de citocinas no peritônio de animais submetidos à CLP..... | 52 |
| Figura 4.7: Efeito do agonista de PPAR γ Rosiglitazona sobre a carga bacteriana presente na cavidade peritoneal de animais submetidos à CLP..... | 53 |
| Figura 4.8: Efeitos da Rosiglitazona sobre a biogênese de corpúsculos lipídicos no peritônio de camundongos <i>Swiss</i> submetidos à CLP..... | 54 |
| Figura 4.9: Efeito da Rosiglitazona na glicemia de animais submetidos à CLP..... | 55 |
| Figura 4.10.1A: Envolvimento da Rosiglitazona na interação leucócito-endotélio na microcirculação cerebral de animais sépticos..... | 57 |
| Figura 4.10.1B: Fotomicrografias da microcirculação cerebral em camundongos <i>Swiss</i> submetidos à CLP..... | 58 |
| Figura 4.11: Efeito do tratamento com Rosiglitazona sobre a atividade de mieloperoxidase | |

| | |
|--|-----|
| (MPO) cerebral de camundongos <i>Swiss</i> submetidos à CLP..... | 59 |
| Figura 4.12A: Efeito da Rosiglitazona na densidade capilar funcional na microcirculação cerebral..... | 61 |
| Figura 4.12B: Efeito da Rosiglitazona na microcirculação cerebral em camundongos <i>Swiss</i> submetidos à CLP..... | 62 |
| Figura 4.14: Efeito direto de ligantes de PPAR γ no crescimento de <i>E. coli</i> | 66 |
| Figura 4.15: Níveis do óxido nítrico (NO) no lavado peritoneal de animais tratados com Rosiglitazona submetidos à CLP..... | 67 |
| Figura 4.16: Efeito <i>in vitro</i> da Rosiglitazona na produção de peróxido de hidrogênio em células de animais submetido à CLP..... | 69 |
| Figura 4.17: Efeito da Rosiglitazona na eliminação bacteriana em cultura de PMNs humanos..... | 70 |
| Figura 4.18.1: Efeito da Rosiglitazona na formação de NETs e estimuladas por LPS..... | 72 |
| Figura 4.18.2: Efeito da Rosiglitazona na formação de NETs induzidas neutrófilos e estimuladas por LPS..... | 73 |
| Figura 4.19.1: Curso temporal dos efeitos da Rosiglitazona na formação de redes extracelulares induzidas neutrófilos e estimuladas por LPS..... | 75 |
| Figura 4.19.2: Efeito da Rosiglitazona na formação de redes extracelulares induzidas neutrófilos e estimuladas por LPS..... | 76 |
| Figura 4.20: Efeito direto dos ligantes de PPAR γ na formação de redes extracelulares induzidas neutrófilos..... | 78 |
| Figura 4.21.1: Efeito na formação de redes extracelulares induzidas neutrófilos em células estimuladas com LPS..... | 80 |
| Figura 4.21.2: Efeito do PPAR γ na formação de redes extracelulares induzidas neutrófilos em células estimuladas com <i>E.coli</i> | 82 |
| Figura 4.22: Efeito do receptor PPAR γ na liberação de proteínas histonas H3 em células estimuladas com LPS ou <i>E. coli</i> | 84 |
| Figura 4.23.1: Efeito da Rosiglitazona na eliminação bacteriana associada com a formação de NETs..... | 86 |
| Figura 4.23.2: Efeito da Rosiglitazona na eliminação bacteriana associada com a formação de NETs..... | 87 |
| Figura 6.1: Efeito antiinflamatório da Rosiglitazona em animais sépticos..... | 104 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1: Efeito da Rosiglitazona e GW9662 na pressão arterial média e frequência cardíaca 24 h após o CLP..... | 64 |
|--|----|

1 Introdução

1.1 Sepses: definição e epidemiologia

A Sepses é uma síndrome clínica caracterizada por inflamação sistêmica em resposta a uma infecção (1). Ela é determinada por um conjunto de efeitos tais como a taquipnéia, alterações de temperatura, taquicardia e alterações no número de leucócitos. Além disso, a sepses pode ser resultado tanto de um processo infeccioso causado por bactéria, parasitas, fungos e vírus, quanto não infeccioso, causado por traumas, queimaduras, choque hipovolêmico e pancreatite. Quando o paciente séptico apresenta um quadro clínico de hipoperfusão ou hipotensão tecidual e disfunção orgânica (como por exemplo, a acidose láctica, oligúria ou confusão mental) determina-se que evoluiu para uma sepses grave. Além disso, o quadro pode evoluir para choque séptico caracterizado por um quadro de hipotensão arterial não revertida pela expansão volêmica adequada e administração de vasoconstritores (1, 2).

Dados epidemiológicos apontam que a incidência de sepses grave nos Estados Unidos da América gira em torno de 750.000 casos/ano, acometendo três indivíduos em cada mil habitantes, resultando em 215.000 mortes/ano. A incidência para pacientes internados é estimada em 2,26 casos por 100 altas hospitalares. Dados europeus indicam uma incidência em torno de um caso por mil habitantes. Estes dados são ainda mais preocupantes se considerarmos que a sepses aumentou 91,3% nos últimos 10 anos, que a taxa de mortalidade associada se mantém inalterada neste período e que a tendência ao óbito da população que desenvolveu sepses em algum momento da vida é maior ao longo dos anos (3, 4). No Brasil, nas últimas décadas, aproximadamente 25% dos pacientes internados nas Unidades de Terapia Intensiva (UTIs) apresentam critérios diagnósticos para sepses grave e choque séptico, com taxas progressivas de mortalidade por sepses (34,7%), sepses grave (47,3%) e choque séptico (52,2%) (5). Além do mais, o estudo BASES (*Brazilian Epidemiologic Sepsis Study*), mostrou dados estatisticamente semelhantes aos da literatura mundial, levando em consideração a realidade de cinco UTIs do Sul e Sudeste do Brasil. Atualmente esse estudo está atravessando uma segunda fase, no qual mais regiões do país são abrangidas, com o objetivo de avaliar a realidade brasileira envolvendo áreas onde teoricamente os recursos são mais escassos, como o Norte e o Nordeste do país (5). De uma forma geral, do ponto de vista econômico, a sepses representa gastos volumosos para o sistema de saúde bem como perdas significativas de produtividade decorrentes de longos períodos de internação e de alta mortalidade associada (5, 6). No Brasil, os gastos com pacientes de UTI somaram 17,34

bilhões de reais, o que representa cerca de 30 a 35% dos gastos globais com a área de saúde (7).

1.2 Fisiopatologia da sepse

1.2.1 Reconhecimento de produtos microbianos e resposta inflamatória

Apesar da inflamação ser essencial à resposta do hospedeiro, a sepse envolve uma desregulação de uma resposta inflamatória normal, podendo se manifestar por hipotensão, coagulopatia e disfunção dos órgãos (1). Durante um quadro infeccioso, o organismo responde inicialmente de forma não específica, liberando mediadores inflamatórios na tentativa de eliminar o agente agressor. O sistema imune inato é a primeira linha de defesa do hospedeiro e está envolvido na detecção de diversos microorganismos invasores. Os receptores da resposta imune inata são ativados por componentes de parede celular das bactérias, como o lipopolissacarídeo (LPS), que é uma molécula que está intimamente envolvida na fisiopatologia da sepse (8). Caso a resposta inata local não elimine o agente infeccioso, ocorre a proliferação e disseminação do agente patogênico com liberação exacerbada de mediadores inflamatórios locais e sistêmicos, atingindo órgãos distais podendo culminar na falência de múltiplos de órgãos e morte (9). Essencialmente, qualquer microorganismo pode causar sepse ou choque séptico, porém as bactérias são os agentes etiológicos mais comuns (2, 10). A maioria dos casos de sepse é devido às bactérias Gram-negativas (*E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter sp*, *Pseudomonas aeruginosa* e outras). *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pneumoniae* e outras bactérias Gram-positivas são responsáveis pelos casos remanescentes. Nos pacientes imunossuprimidos, os fungos, bem como as bactérias, também podem causar sepse (6, 10).

Os componentes da parede bacteriana são os principais ativadores desta resposta do hospedeiro: as endotoxinas (LPS) dos microorganismos Gram-negativos e o ácido teicóico dos microorganismos Gram-positivos (11). O LPS é um componente da membrana externa de bactérias Gram-negativas que através da sua detecção pelas células do sistema imune inato é essencial para a defesa do hospedeiro e apresenta papel fundamental na patogênese da sepse Gram-negativa (11-13). O processo de reconhecimento é iniciado pela ligação do lipopolissacarídeo à proteína de ligação do LPS (LBP, do inglês, *LPS Binding Protein*), que liga a endotoxina ao receptor de superfície celular (CD14 e MD-2) presentes na superfície de macrófagos, monócitos e neutrófilos (14). Durante a infecção, as células do sistema imune inato reconhecem produtos microbianos, chamados de padrões moleculares associados a

patógenos (PAMPS, *pathogen-associated molecular patterns*), tais como LPS, flagelina, zimosan e peptidoglicano (15-17). O início da resposta do hospedeiro pelo reconhecimento dos PAMPs durante a sepse, envolve três famílias de receptores de reconhecimento padrão (*Pattern Recognition Receptor* - PRRs): 1) receptores do tipo Toll (*Toll like receptors*-TLRs); receptores do tipo NOD (Domínio de oligomerização de nucleotídeo - *NOD-like receptors*) e receptores do tipo RIG-I (Gene do ácido retinóico induzível - *Retinoic Induced-Gene*). A interação entre essas famílias de PRRs assegura a eficiente coordenação da resposta imune inata, quer através de sinalização sinérgicas ou cooperativas) (15, 18, 19).

Os TLRs são muito importantes para a ativação do sistema imunológico e são expressos em células que formam a primeira linha de defesa do sistema imunológico, tais como neutrófilos, células dendríticas, macrófagos e células *natural-killer*. Os TLRs induzem a expressão de diversos genes inflamatórios, a partir dos quais os produtos formados têm o objetivo de eliminar o patógeno invasor (18). No genoma humano foram identificados 10 diferentes tipos de TLRs, sendo o receptor TLR4 responsável pelo reconhecimento de moléculas da maioria de bactérias gram-negativas (11, 20).

Até o presente momento, esforço significativo tem focado na caracterização do complexo da cascata de transdução de sinal que são ativados pelos TLRs. O fator de transcrição NF- κ B (*Nuclear factor κ B*) é o regulador central na expressão da indução de mediadores pró-inflamatórios que contribuem para a resposta imune. O NF- κ B é um fator de transcrição homodimérico ou heterodimérico o qual se liga a sítio promotores de amplo espectro para diferentes genes alvos. Os dímeros de NF- κ B são mantidos inativados no citoplasma pela ligação com proteínas I κ B, que impede a sua translocação nuclear (20). A cascata de sinalização do TLR levará à fosforilação de I κ B, resultando na sua degradação e na consequente translocação do NF- κ B para o núcleo, que em seguida irá se ligar ao DNA e dando início a transcrição de genes alvos (21). A expressão de genes dependentes da indução do NF- κ B exerce um papel central na forte resposta pró-inflamatória. A expressão do gene pró-inflamatório pelo TLRs é igualmente regulado pela ativação da proteína quinase ativado por mitógeno, liderando a fosforilação de múltiplas proteínas, incluindo vários fatores de transcrição. TLRs contam com o recrutamento e ativação de moléculas adaptadoras intracelulares e cinases para a transdução de seus sinais (figura 1.2.1). Por exemplo, a molécula adaptadora MyD88 se associa todos os tipos de TLRs e é requerida na maioria dos casos para a sinalização do NF- κ B ativado por mitógeno, como na via de sinalização das proteínas quinases (MAPK - *Mitogen-Activated Protein K*) (22). As MAPK consistem em 3 principais tipos: quinase extracelular regulada por sinal, p38 e quinase c-jun- N-terminal (JNK). Cada uma dessas proteínas podem ser ativadas

pelo LPS através da fosforilação da treonina e de resíduos de tirosina no citoplasma, liderando desta forma, a produção de mediadores inflamatórios, como as citocinas e quimiocinas (23).

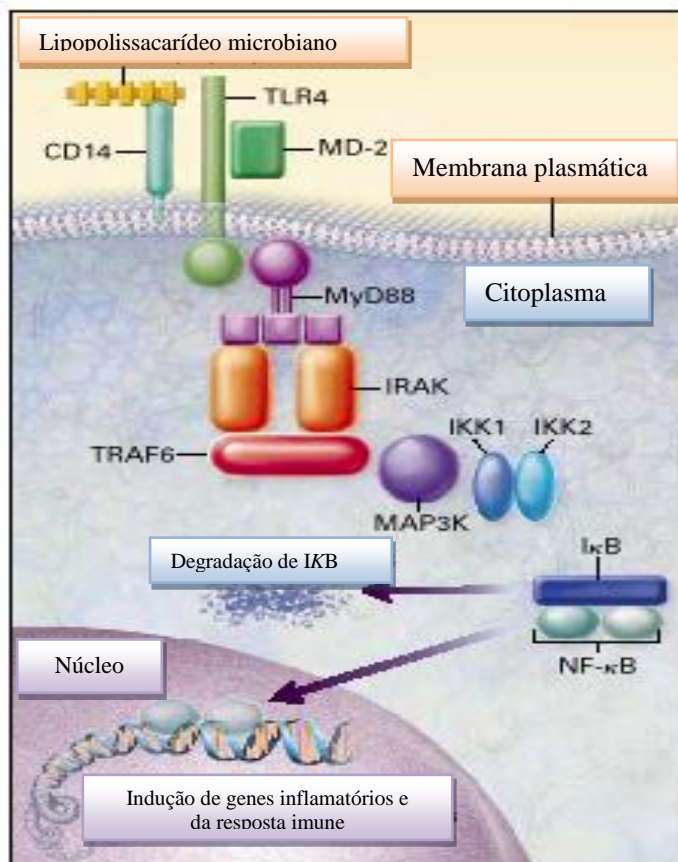


Figura 1.2.1: Mecanismo de transdução de sinal do receptor Toll-4 decorrente da interação da endotoxina bacteriana, o LPS. O reconhecimento do LPS pela célula é mediado por 3 diferentes produtos gênicos: CD14, receptores TLR-4 e MD-2. A ligação do LPS ao CD14 lidera a formação de um complexo formado por TLR4-MD-2, que por sua vez induz a dimerização do TLR4. Uma vez ativado, ocorre o recrutamento da proteína mielóide 88 (MyD88) e a associação ao receptor de interleucina-1 ligado a proteína quinase (IRAK). Em seguida, a IRAK é fosforilada e se associa a proteína adaptadora fator de necrose tumoral associado ao fator 6 (TRAF-6). A oligomerização de TRAF-6 ativa um membro de proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK3) a qual ativa direta ou indiretamente a IκB quinase (IKK1) e IκB quinase 2 (IKK2). Estas quinases fosforilam IκB, causando a sua degradação e a liberação do fator de transcrição NF-κB, o qual transloca para o núcleo e induz a transcrição de uma ampla variedade de genes inflamatórios e da resposta imune. Figura adaptada de Medzhitov & Janeway (24).

1.2.2 Mediadores inflamatórios na sepse

À medida que reconhecem produtos bacterianos, como as endotoxinas, as células do sistema imune inato como macrófagos e neutrófilos liberam vários mediadores inflamatórios, dentre as quais as citocinas. Elas atuam como efetoras ou moduladoras da resposta inflamatória, a qual por sua vez exerce um papel crucial no desenvolvimento da sepse. Apesar de as citocinas serem importantes para as funções homeostáticas, a sua produção e liberação excessiva leva ao dano tecidual e conseqüentemente, a disfunção orgânica (9).

Mediadores como TNF- α , as interleucinas (IL-1 β , IL-6, IL-8), o fator inibitório de migração de macrófagos (MIF), e mediadores lipídicos (PAF - *Platelet activating factor*, leucotrienos e prostaglandinas), tem sido fortemente associadas com a sepse (2, 11, 23). Em humanos com sepse e em animais submetidos a modelos experimentais de sepse, as citocinas são liberadas de maneira sequencial denominada “cascata de citocinas”. Neste contexto, o TNF- α é apontado como mediador primário da inflamação, e é implicado com um grande número de doenças infecciosas e não infecciosas (25). Ele está associado com as anormalidades hemodinâmicas, leucopenia e coagulopatia observados no curso da doença (23, 25, 26). Em animais, após a injeção de endotoxina bacteriana, a produção de TNF- α é ativada e pode ser rapidamente detectada no plasma, entre 60 e 90 minutos. E ainda, o TNF- α é um potente indutor da liberação de outras citocinas como a IL-1 β , IL-6 e IL-8 (11, 23). Tanto a IL-1 β assim como o TNF- α , induzem febre, sendo que a IL-1 β ainda induz a produção e liberação de IL-6 (2, 27). A IL-6 além de ser um mediador inflamatório, também funciona como um marcador da gravidade da sepse. Já foi descrito que níveis elevados de IL-6 e IL-8 são preditores no prognóstico da sepse e estão associados com a disfunção de múltiplos órgãos e a mortalidade precoce e tardia (28-30).

Outra citocina tem sido descrita como um mediador no choque séptico, o MIF que foi originalmente descrito em células T ativadas que produzem e inibiam a migração de macrófagos (31). O MIF é expresso constitutivamente em diferentes tecidos e células e, como cérebro, células da glândula hipófise anterior, adrenal, pulmão, intestino, rim pâncreas e células do sistema imune como macrófagos/monócitos, neutrófilos, eosinófilos, mastócitos, linfócitos B e T, células dendríticas, células endoteliais e fibroblastos. Diversos estímulos podem gerar a síntese e secreção de MIF como bactérias, vírus, parasitas, LPS, TNF- α , entre outros. Entre os diferentes efeitos do MIF, podemos destacar a atividade pró-inflamatória e os efeitos sobre a proliferação celular (32). Em modelos experimentais de endotoxemia, o nível aumentado desta citocina também está associada com a severidade da sepse (23). Corroborando com estes dados, em um estudo do nosso grupo com pacientes sépticos,

observou-se uma correlação entre níveis aumentados de MIF e o prognóstico de sepse, funcionando desta forma, como um importante marcador de severidade na sepse (32). Ainda neste contexto, já foi descrito que contrária a outras citocinas, como o TNF- α , IL-1- β e IL-8, que requer a ativação de fatores de transcrição, uma grande quantidade de MIF é estocada em vacúolos citoplasmáticos, sendo portanto, rapidamente disponíveis para o uso (33).

Além das citocinas, mediadores lipídicos como o PAF e eicosanóides como as prostaglandinas e leucotrienos também estão envolvidos na fisiopatologia da sepse podendo causar hipotensão, coagulação intravascular disseminada e imunossupressão (34). O PAF é um fosfolípido biologicamente ativo, implicado em diversas patologias. Ele é responsável pela ativação/agregação de plaquetas, podendo causar coagulação intravascular disseminada, trombose e dano vascular (35). O PAF também modula a liberação de histamina e serotonina das plaquetas, e regula a expressão de moléculas de adesão e quimiotaxia em neutrófilos (35). O mecanismo de ação envolve a sinalização e a translocação do fator de transcrição NF-kB para o núcleo levando a expressão de genes específicos e síntese de mediadores inflamatórios (36). Em trabalho prévio do nosso grupo foi demonstrado que a administração de enzima recombinante PAF acetil hidrolase (rPAF-AH), enzima que inibe o PAF e fosfolípidos estruturalmente semelhantes ao PAF (*PAF like*) protege animais de dano tecidual e morte após a injeção de LPS ou após à CLP. Ainda no mesmo estudo, foi demonstrado, que a atividade da PAF-AH também se encontra diminuída em humanos com choque séptico (37).

As prostaglandinas tais como a PGI₂ e PGE₂ são importantes vasodilatadores que contribuem para a hipotensão na sepse (11). Já foi descrito em modelo de CLP, que a administração de inibidores de cicloxigenase 2 (COX-2) é responsável em atenuar a produção de metabólitos de PGE, e conseqüentemente diminuir o infiltrado de neutrófilos, o edema, a produção de quimiocinas, aumentando assim, a sobrevivência dos animais (38). Já o leucotrieno (LT) apesar de estar envolvido na regulação do tônus vascular, ele não parece exercer um importante papel na hipotensão durante a sepse (11). No entanto, o LTB₄ tem sido descrito como um importante quimioatraente envolvido no recrutamento de neutrófilos para o sítio de infecção (34).

Neste contexto, estudos relatam uma correlação positiva entre e o aumento da produção de eicosanóides derivados das enzimas lipoxigenase (LO) e COX, LTB₄ e PGE₂ a formação de corpúsculos lipídicos (39-41). Já foi observado que os corpúsculos lipídicos de eosinófilos, neutrófilos e macrófagos constituem sítios intracelulares de araquidonato esterificado tanto em lípidios neutros quanto em diferentes classes de fosfolípidios (42-46). Em seguida, foi descrita a presença de enzimas envolvidas na liberação do ácido araquidônico (AA), incluindo fosfolipase A2 citosólica (cPLA2) e MAPK, em corpúsculos lipídicos (42, 47, 48). Sendo

assim, o araquidonato livre, poderia, então, ter acesso a enzimas formadoras de eicosanóides, como a 5-LO e COX, que se encontraram colocalizadas nestes domínios citoplasmáticos (39, 40). A evidência sobre o papel dos corpúsculos lipídicos na compartimentalização da síntese de mediadores lipídicos foi fornecida pela técnica *EicosaCell* (49, 50), desenvolvida por colaboradores do nosso grupo. Esta técnica permite a fixação destes mediadores como LTC₄, LTB₄ e PGE₂, tornando possível localizar os corpúsculos como locais de síntese de eicosanóides (49, 51, 52).

Por muito tempo, estas organelas foram representadas como depósitos inertes de gordura e sítios de transporte de lipídios. Atualmente, dados indicam que os corpúsculos lipídicos são estruturas altamente dinâmicas e funcionalmente ativas. Em leucócitos, estas estruturas aumentam em número e tamanho durante processos inflamatórios e infecciosos, além de desempenhar funções como organelas especializadas, incluindo envolvimento na sinalização e ativação celular, na regulação do metabolismo e tráfego lipídico, bem como no controle da síntese e secreção de mediadores inflamatórios (53). Dentre as proteínas presentes nos corpúsculos lipídicos destacam-se as proteínas da família PAT (*Phosphinothricin N-acetyltransferase*), consideradas essenciais para o estoque e metabolismo de lipídios. Dentre estas proteínas destacam a perilipina, a adipofilina ou proteína relacionada com a diferenciação de adipócitos (do Inglês, *Adipose differentiation-related protein* - ADRP) e a proteína de interação de porção terminal de 47 kDa (do Inglês, *Terminal Interaction Protein* - TIP47) (54). Estas proteínas parecem estar diretamente envolvidas na organização estrutural e biogênese destas organelas (54-57).

A visualização dos corpúsculos lipídicos pode ser feita através da coloração de com tetróxido de ósmio, Oil Red-O ou com a marcação com a sonda fluorescente BODIPY™ 493/503. O aspecto dos corpúsculos marcados por diferentes componentes colorações encontram-se ilustrados na figura 1.2.2.

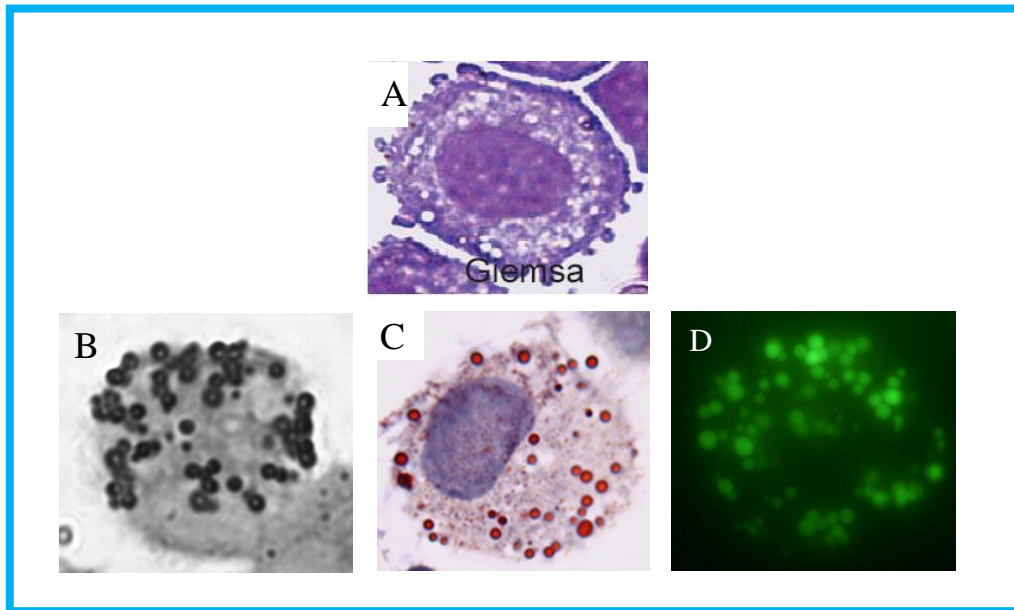


Figura 1.2.2: Corpúsculos lipídicos em células mononucleares fixadas e/ou coradas por diferentes metodologias. Os corpúsculos lipídicos foram visualizados por microscopia de luz (A-C) ou fluorescência (D) após coloração com May-Grunwald-Giemsa (A), ósmio (B), oil red O (C) e BODIPY™ 493/503 (D). Adaptado de Bozza e cols e D’Avila e cols (46, 58).

A resposta inflamatória sistêmica na sepse lideram alterações fisiológicas sistêmicas com consequências graves. Desta maneira, o organismo desenvolveu mecanismos imunoreguladores para modular a amplitude da resposta imunológica e assim prevenir o dano ao hospedeiro. Esta fase contra-regulatória da sepse é denominada síndrome da resposta anti-inflamatória compensatória (CARS). Já foi descrito que moléculas liberadas durante a CARS limitam a expressão de mediadores inflamatórios e consequentemente, a inflamação sistêmica [(revisado por Reddy (59)]. Neste contexto, a IL-10 se mostrou uma importante molécula imunomoduladora. Esta citocina é produzida por diferentes tipos celulares (células dendríticas, linfócitos T, linfócitos B, monócitos/macrófagos e neutrófilos) (60, 61). A importância da IL-10 na resposta imune inclui a regulação inibitória dos receptores de superfície celular como o CD40, CD80, CD86 e MHCII (62), inibe o estresse oxidativo dos neutrófilos (63) e a produção de IL-2, IL-6 e IFN- γ em células T e células NK (*natural killer*) (64). Já foi demonstrado que o pré-tratamento com IL-10 é capaz de melhorar a sobrevivência de camundongos submetidos à CLP. Por outro lado, o tratamento em camundongos com anti-IL-10 levou a uma diminuição da sobrevivência após o CLP (26, 64). E ainda, neutrófilos de camundongos deficientes IL-10 apresentam redução da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) quando comparados com os neutrófilos obtidos de animais selvagens

deficientes, mostrando a importância da IL-10 na regulação inibitória na produção de ROS (63).

1.2.3 Quimiocinas

Uma subfamília de citocinas igualmente importantes na resposta imune contra infecções são as quimiocinas. As quimiocinas são moléculas envolvidas na migração leucocitária para diferentes sítios no organismo. Elas pertencem à superfamília das citocinas e são pequenas moléculas proteicas de 8 a 15 kDa que possuem diversas atividades biológicas. A definição das quimiocinas se deve a sua sequência de 4 resíduos de cisteína na porção amino-terminal. Elas são subdivididas em quatro subfamílias distintas de acordo com o posicionamento de resíduos de cisteína próximo ao N terminal e à presença e/ou do número de aminoácidos entre estes resíduos: CXC, CC, C e CX3C, sendo X um aminoácido qualquer (65, 66). A família denominada CXC ou família α possui um resíduo de aminoácido não conservado, entre as duas cisteínas na região N-terminal conservada. Nas CC ou família β , as duas cisteínas encontram-se em justaposição. Já a família C ou γ , existe apenas um único resíduo de cisteína na região conservada. A quarta família, denominada CX3C possui 3 resíduos não conservados, entre as duas cisteínas (67, 68). Existe uma relação promíscua entre esses receptores e as quimiocinas. Uma única quimiocina pode se ligar a vários receptores, bem como um único receptor pode promover a sinalização por diferentes quimiocinas. Além do mais, também ocorre a interação entre quimiocinas e receptores de diferentes famílias como por exemplo, a CCL que se liga a CXCR (69).

As quimiocinas também podem ser divididas em dois grupos: constitutivas ou induzidas, dependendo da sua expressão. As quimiocinas constitutivas são expressas primariamente em órgãos linfoides secundários onde terão papel importante para direcionar os leucócitos aos órgãos alvos. As quimiocinas induzidas ou inflamatórias tem um papel muito importante em direcionar as células para o foco inflamatório e estas são expressas em altas concentrações quando são induzidas através de estímulos inflamatórios como, por exemplo, TNF- α , IL-1 β e/ou LPS (65, 70, 71). As quimiocinas e seus receptores não são simples moléculas quimiotáticas. Com o avanço das pesquisas foram descritos outros papéis além da função quimiotática. As quimiocinas também estão envolvidas no desenvolvimento, regulação e ativação celular. As quimiocinas atuam em inúmeros processos incluindo a angiogênese/angiostase, diferenciação e ativação celular, injúria tecidual, crescimento tumoral e metástase, na diferenciação e no balanço da resposta imune Th1/Th2, sobre ativação e migração de células T regulatórias (69, 72, 73). Além disso, as quimiocinas participam da

interação entre a resposta imune inata e adquirida, sendo esta interação fundamental para uma resposta dinâmica, duradoura e regulada da homeostase do organismo (74, 75).

As quimiocinas estão envolvidas em várias doenças, como aterosclerose, asma, câncer, dengue, AIDS, artrite reumatóide e sepse. Na sepse, algumas quimiocinas são produzidas, tais como MIP-1 α , CCL2 e IL-8 (76). A IL-8 ou CXCL8 é uma quimiocina produzida por neutrófilos, macrófagos, células endoteliais e células T. Esta quimiocina não é produzida constitutivamente, sendo induzida portanto, por citocinas pró-inflamatórias como o TNF- α e IL-1 β (77). A proteína murina CXCL1 induz os mesmos efeitos biológicos da CXCL8 humana, tais como quimiotaxia de neutrófilo e aumento da expressão de moléculas de adesão (CD11b/CD18) por estas células, sendo denominada proteína homóloga funcional da CXCL8 humana (78). O recrutamento de leucócitos para os tecidos é um fenômeno essencial em resposta à infecção e para a eliminação de agentes infecciosos. As quimiocinas são envolvidas na migração de leucócitos, mas afetam a biologia destas células de muitas maneiras (79). A CCL2 é uma proteína da família CC com atividade nos monócitos, células T, células NK, basófilos e mastócitos (80-82). A CCL2 tem sido implicado em diversas patologias como aterosclerose, artrite reumatóide e esclerose múltipla (83, 84) e sepse (85). Em modelo agudo de peritonite, a neutralização da CCL2 diminui a produção de IL-13 e IL-12 e em contraste, aumenta a produção de TNF- α e IL-10 (86). Ainda neste estudo, o pré-tratamento de camundongos com CCL2 aumentou a taxa de letalidade e foi associada com o prejuízo na eliminação bacteriana, assim como reduziu a migração de leucócitos após CLP (86). Nakano e colaboradores (87) mostrou que o tratamento com CCL2 recombinante é capaz de aumentar a eliminação bacteriana protegendo camundongos infectados com *Pseudomonas aeruginosa* ou *Salmonella typhimurium* (87). Foi descrito pelo nosso grupo que o CCL2 regula positivamente a IL-10, mas controla negativamente o MIF durante a sepse peritoneal, sugerindo assim, um importante papel imunoregulador da CCL2 no controle do equilíbrio entre a produção de citocinas pró e anti-inflamatórias durante a sepse (88).

1.2.4 Óxido nítrico e espécies reativas de oxigênio (ROS) na sepse

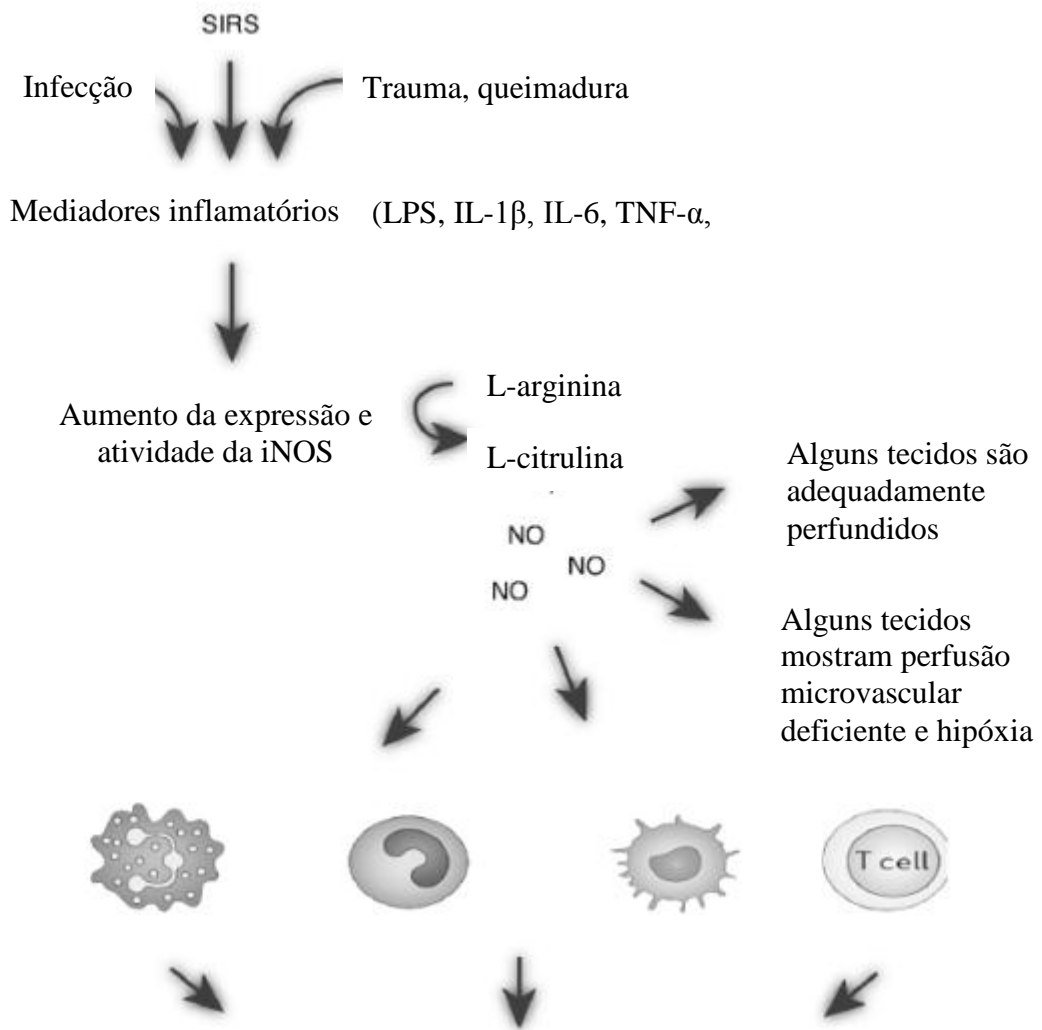
O óxido nítrico (NO) é o principal fator na regulação na homeostase microvascular sob condições normais. Ele é um mediador sintetizado por uma família de enzimas denominadas NO sintase (NOS). Existem 3 isoformas conhecidas de NOS: a neuronal (nNOS ou tipo I), a induzível (iNOS ou tipo II) e a endotelial (eNOS ou tipo III). Duas destas isoformas (nNOS e eNOS) são cálcio dependentes e constitutivamente expressas, enquanto que a iNOS é cálcio independente e a sua expressão é induzida por LPS e citocinas (TNF- α , IL-1 β e IFN- γ). O NO

é produzido pela maioria dos tipos celulares, tais como célula endoteliais, macrófagos e neutrófilos (89-92) e tem meia vida extremamente curta, sendo rapidamente degradado em nitrito (NO_2) e nitrato (NO_3). A combinação do NO com a com ânions superóxidos (O_2^-), o qual é derivado da NADPH oxidase, resulta na produção de espécies reativas de nitrogênio, como o peróxido nitrito (ONOO^-), um potente agente antioxidante que pode iniciar a peroxidação de proteínas, lipídeos e nitração de resíduos de tirosina (90, 93).

Na sepse e choque séptico, o NO possui um papel controverso e ainda é motivo de grande discussão. Isso porque ele pode atuar tanto de maneira benéfica como deletéria para o organismo do hospedeiro (90). Estímulos inflamatórios tais como, LPS, IL-1 β , MIF ou IL-6 são conhecidos por alterar a homeostase microvascular devido à produção de óxido nítrico pela iNOS (94, 95). Já foi descrito que o NO na sepse possui um importante modulador da migração de neutrófilos, embora ainda existam dados conflitantes com relação aos efeitos estimulatórios e inibitórios do NO na migração destas células (96).

Na fase inicial da sepse, a produção de NO junto com o estresse oxidativo, exerce um importante papel no *clearance* de bactérias (97, 98). O peróxido nitrito é um importante elemento na resposta imune, principalmente por se um agente antimicrobiano potente. O mecanismo proposto para as ação microbicida do NO envolve a quebra da fita de DNA, levando à inibição da replicação do DNA e inibição de funções mitocondriais dos microrganismos (90).

Na fase tardia da sepse, a produção de NO está envolvido com as alterações vasculares que ocorrem no curso da doença. Uma produção exarcebada do mediador resulta em intensa vasodilatação, hipotensão, hiporreatividade vascular, aumento da permeabilidade vascular, trombose da microcirculação e depressão do miocárdio (10, 99, 100) (ver tabela 1). Este fenômeno é observado tanto na sepse experimental quanto humana (101). Já está descrito que os mecanismos responsáveis pela hiporreatividade vascular, além da produção aumentada de NO, contam também com a ativação dos canais de potássio e depleção dos níveis de vasopressina circulante (102). Todas estas alterações hemodinâmicas podem contribuir para a síndrome da disfunção orgânica múltipla (SDOM) e morte do paciente séptico (95, 103). Os efeitos deletérios do NO na fisiopatologia da sepse estão descritos na figura 1.2.4.



Alterados níveis de citocinas, estresse oxidativo aumentado e a produção de NO nítrico lideram a SDOM e eventualmente ao choque séptico.

Figura 1.2.4: Papel do NO na fisiopatologia da síndrome da resposta inflamatória sistêmica (*Systemic Inflammatory Response Syndrome - SIRS*). Sob condições normais o óxido nítrico regula a homeostase vascular. No entanto, sob a influência de estímulos inflamatórios (LPS, IL-1 β , IL-6, TNF- α , MIF) induzem o aumento na expressão da iNOS, aumento na produção/liberação de NO levando alterações na homeostase microvascular que pode levar a um quadro de hipóxia tecidual, SDOM e eventualmente o choque séptico. Figura adaptada de Fortin e cols. (91)

1.2.5 Células efectoras na sepse

1.2.5.1 Macrófagos

Macrófagos e neutrófilos são células que participam ativamente do sistema imune inato frente à infecção. Os macrófagos residentes nos tecidos são as primeiras células a reconhecerem componentes microbianos através dos receptores expressos em suas superfícies. A ligação da bactéria a estes receptores estimula a fagocitose e a captura dos patógenos para as vesículas intracelulares, onde são destruídos. A ativação de alguns destes receptores, como por exemplo os TLR, causa a secreção de diversas quimiocinas e citocinas, como a IL-1 β , TNF- α , IL-8 entre outras, que irão contribuir para o recrutamento de neutrófilos para o sítio de infecção (104).

Os macrófagos ativados também são potentes células efectoras na sepse. Esses macrófagos produzem espécies reativas de oxigênio (ROS e NO), ambos dotados de potente atividade antibacteriana, além de sintetizarem peptídeos antibacterianos e proteases que podem ser secretadas para eliminar patógenos extracelulares. Modificações adicionais nos macrófagos ativados ajudam a amplificar a resposta imune: o número de moléculas MHC de classe II, de moléculas CD40 e de receptores de TNF- α na superfície do macrófago aumenta, tornando a célula mais eficiente na apresentação do antígeno a células T e mais responsiva ao ligante CD40 e ao TNF- α . O TNF- α produzido pelo macrófago atua em sinergismo com o IFN- γ produzido por células Th1 na indução de NO (91, 105). Desta forma, a ativação de macrófagos durante um processo inflamatório, ajuda na amplificação desta resposta, que se for exacerbada, poderá levar a consequências deletérias para o hospedeiro, causando dano tecidual.

1.2.5.2 Neutrófilos

O recrutamento de neutrófilos para o sítio de infecção é um elemento crucial na resposta do sistema imune inato. Estas células são recrutadas em resposta principalmente, às citocinas como IL-1 β , TNF- α , mediadores lipídicos e quimiocinas. Os neutrófilos migram para os tecidos através de 4 processos: marginação, rolamento (do inglês *rolling*), aderência e transmigração através da parede dos vasos em direção a gradientes quimiotáticos. Os neutrófilos originam-se da medula óssea e são liberados na circulação como células maduras, onde circulam brevemente antes de serem eliminados no baço, fígado ou na própria medula óssea (69). Sob condições homeostáticas, este processo é modulado pelo fator estimulador de

colônia de granulócitos (G-CSF) e em menor grau pelo fator estimulador de colônia de macrófago-granulócito (GM-CSF). No entanto, quando os neutrófilos alcançam o local da infecção, estas células possuem a sua meia vida estendida por mediadores inflamatórios (TNF- α e IL-1 β), quimiocinas (CXCL8) e igualmente pelo G-CSF (106).

A fase da marginação e rolamento dos neutrófilos envolve o movimento destas células na superfície luminal dos vasos sanguíneos. Os efetores primários desta interação são as L-selectinas, constitutivamente expressas nos leucócitos circulantes e E-selectinas, P-selectinas cuja expressão é aumentada nas células endoteliais após a ativação por quimiocinas e mediadores inflamatórios tais como o TNF- α (70). A adesão dos leucócitos nas células endoteliais é mediada por moléculas que aumentam a afinidade entre as células. As integrinas possuem um papel relevante na adesão firme dos neutrófilos. A integrina $\alpha_1\beta_2$ também conhecida por CD11a/CD18, são expressas na maioria dos leucócitos e são moduladas por componentes microbianos, citocinas inflamatórias e quimiocinas. Estas integrinas interagem com moléculas de adesão na superfície das células endoteliais, tais como as ICAM (do inglês *intercellular adhesion molecule-1*) e VCAM (do inglês *vascular adhesion molecule*) (107).

A transmigração (diapedese), o estágio final da migração dos neutrófilos, se caracteriza pela passagem dos neutrófilos pelo endotélio através das junções estreitas das células endoteliais e das células infectadas ou lesadas. Este processo é regulado por um amplo espectro de moléculas quimiotraentes incluindo tanto componentes microbianos como o formil-metionil-leucil-fenilalanina (fMLP), LPS, quanto componentes derivados do hospedeiro como citocinas (TNF- α , IL-1), componentes do complemento (C3a, C5a), mediadores lipídicos (LTB₄, PAF, PGs) e quimiocinas (CXCL8), liberados pelas células residentes e pelas células recrutadas ao foco infeccioso, como mostra a figura 1.2.5.2.

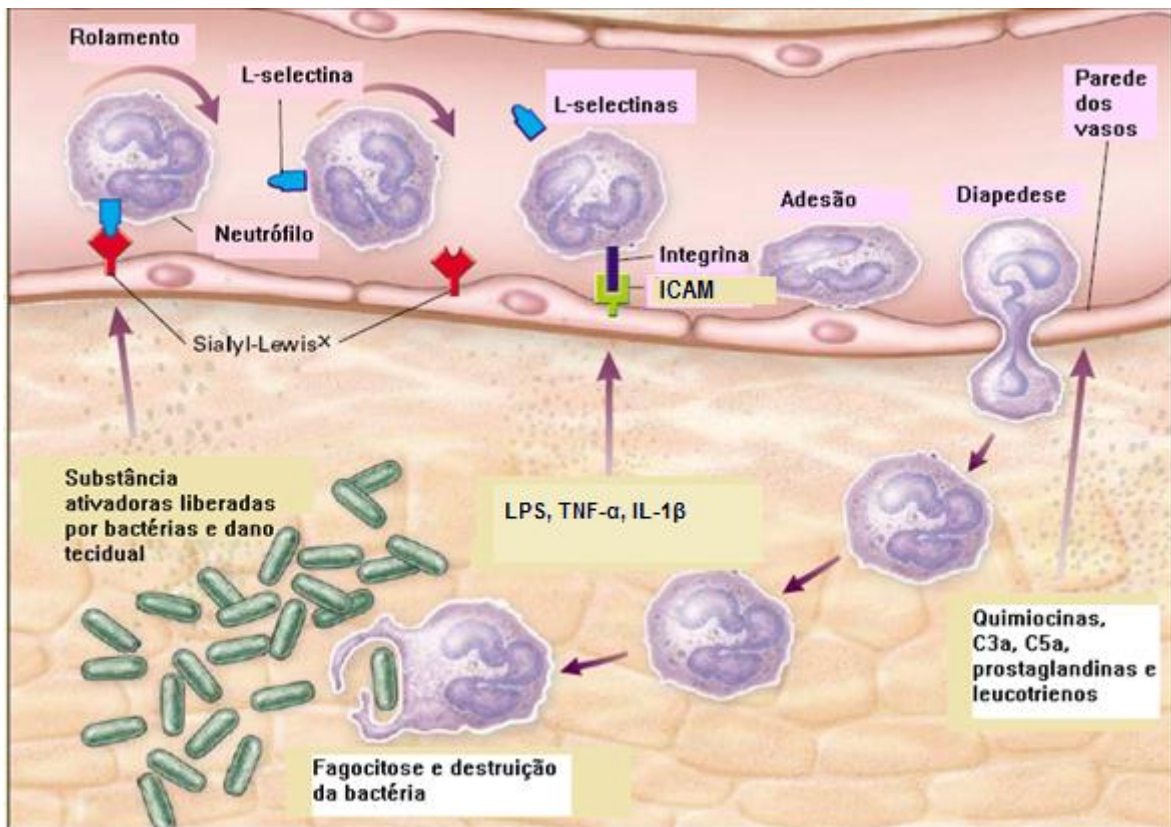


Figura 1.2.5.2 Processo de migração de neutrófilos do sangue para o sítio infeccioso. Consistem na marginação, rolamento, adesão, diapedese até o foco infeccioso. Adaptado de Mackay 2001 (108). LPS - lipopossacarídeo; TNF- α - Fator de necrose tumoral- α ; IL-1 β - interleucina 1; ICAM – *Intercellular Adhesion Molecule*.

Embora o número de neutrófilos circulantes possa aumentar durante a sepse, essas células apresentam alterações nas funções de quimiotaxia, fagocitose e na atividade microbicida desencadeadas pela fagocitose, como por exemplo, a liberação de ROS (109). Fatores liberados durante a sepse resultam em marcado aumento da rigidez da membrana celular de neutrófilos. Como resultado desta deformabilidade, os neutrófilos são sequestrados nos leitos capilares especialmente nos pulmões. A oclusão dos capilares por estas células limita o fluxo sanguíneo, resultando em isquemia, o que contribui para os efeitos microcirculatórios e para falência múltipla orgânica observados na sepse (110, 111). Ainda neste contexto, Benjamin e colaboradores (96) demonstraram que na sepse grave induzida por CLP ocorre a falência de migração neutrofílica para o foco infeccioso, o aumento no número de bactérias no fluido peritoneal e no sangue e, conseqüentemente, uma alta taxa de mortalidade. Embora os mecanismos envolvidos na inibição da migração de neutrófilos na sepse grave ainda não estejam bem elucidados, evidências sugerem a participação de citocinas pró-inflamatórias neste processo. Sabe-se que essas citocinas estimulam a indução sistêmica da enzima iNOS e

produção de NO, o qual participa na inibição da migração de neutrófilos. Em estudo do mesmo grupo foi demonstrado que animais deficientes para iNOS submetidos à sepse grave não apresentam inibição da migração de neutrófilos. Entretanto, esses animais deficientes apresentaram alta mortalidade, reforçando que o NO participa da falência de neutrófilos e da atividade microbicida dessas células (112).

1.2.5.2.1 Redes extracelulares formadas por neutrófilos (do inglês, *Neutrophil Extracellular Traps*- NETs)

Há algum tempo atrás se pensava que os neutrófilos empregavam somente duas estratégias antimicrobianas: 1) a fagocitose que envolve o englobamento e eliminação de micróbios em compartimentos especializados chamados fagolisossomos e 2) a degranulação que consiste na liberação do conteúdo granular para o meio extracelular [revisado por (113, 114)]. No entanto, Brinkman e cols descreveram um novo mecanismo antimicrobiano denominado netose (115). A netose também ocorre em meio extracelular, quando o DNA associado a proteínas é projetado para fora dos neutrófilos formando as redes extracelulares formadas (NETs), responsáveis por capturar e eliminar o patógeno invasor de maneira eficiente. A netose é um novo tipo descrito de morte celular, diferente de necrose ou apoptose [revisado por Guimarães-costa (114)]. Durante a netose, não ocorre fragmentação de DNA e nem exposição de fosfatidilserina na membrana externa da célula, característica de apoptose e necrose. É descrito que o envelope nuclear intacto diferencia a netose da necrose e da apoptose. De fato, a associação de NET-DNA não foi detectado em sobrenadantes de cultura de neutrófilos necróticos ou apoptóticos (116).

Dentre as proteínas que compõem as NETs estão as defensinas, catelicidinas (LL-37), mieloperoxidase (MPO) (117), proteína de aumento da permeabilidade bacteriana (BPI), elastases e catepsina G (118-120) e todas são associadas à cromatina descondensada e às histonas. Trabalhos mostram que as NETs são efetivas contra vários tipos de patógenos, dentre os quais estão as bactérias gram-negativas (*Salmonella typhumurium*, *Shigella flexneri* e *E. coli*) (121), bactérias gram-positivas (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*) (122-125), assim como o fungo *Candida. albicans* (126) e protozoários (*Leishmania amazonensis*) (127). E ainda, estas estruturas podem ser induzidas quando neutrófilos são estimulados por PMA, LPS e IL-8 (115). No entanto, o mecanismo pelo qual estas estruturas são formadas ainda não está completamente esclarecido. Na verdade, há uma discussão se a formação das NETs é um processo ativo ou controlado, ou se é um evento precoce de morte celular programada. Neste contexto, Brinkman e cols (115) forneceram

evidências que as NETs são formadas ativamente, portanto não são consequência de um mecanismo de desintegração celular.

Estudos sugerem 3 diferentes mecanismos para a formação das redes extracelulares: o primeiro mecanismo descreve que a formação de NETs ocorre devido à estimulação direta da célula pelo patógeno (116). O segundo, aponta que a presença de LPS das bactérias induz a ativação de plaquetas via TLR4 expressos por estas células, modulando a formação de NETs pelos neutrófilos (121, 128-132). O terceiro e último mecanismo envolve DNA mitocondrial e também descreve que a formação dessas redes extracelulares também pode ser atribuída a outros tipos de granulócitos, como os eosinófilos, por exemplo. Os eosinófilos estimulados com LPS liberam estruturas tipo NET (*NET-like*) extravasando o DNA mitocondrial para o espaço extracelular (133) (figura 1.2.5.2.1).

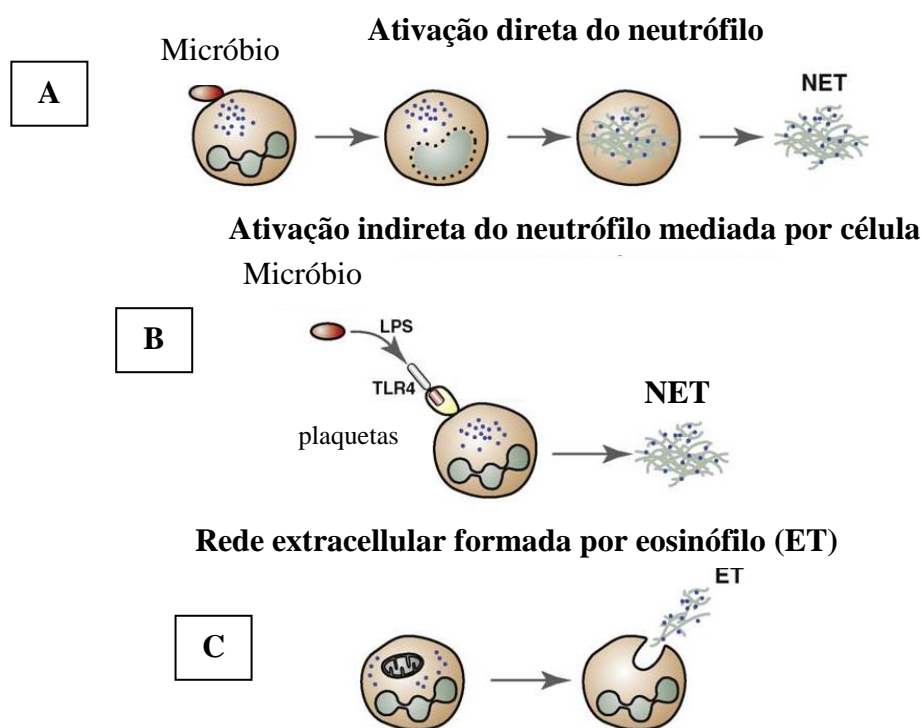


Figura 1.2.5.2.1: Possíveis mecanismos de formação de redes extracelulares. (A) neutrófilos estimulados com micróbios ou farmacologicamente com phorbol meristato acetato (PMA) induzem a descondensação nuclear e apoptose resultando em formação de NETs. (B) ativação indireta dos neutrófilos mediado por célula. O lipopolissacarídeo (LPS) modula a ativação de plaquetas (via TLR4) e conseqüentemente, a ativação de neutrófilos com a liberação de NETs. (C) os eosinófilos quando ativados por antígenos microbianos liberam o DNA mitocondrial formando as redes extracelulares (*extracelular traps-ET*). Figura retirada de Papayannopoulos e cols. (113).

Existem algumas discussões envolvendo a formação de redes extracelulares e o dano tecidual. Alguns estudos apontam que as NETs não funcionam só como armadilhas, confinando o patógeno dentro do sítio de infecção inicial (126), como também minimizam o dano ao tecido adjacente, modulando desta forma, a resposta inflamatória [(revisado por Papayannopoulos (113)]. Em contrapartida, em estudo recente de Gupta e cols (134) mostraram que durante a formação dessas redes extracelulares há uma interação de células endoteliais com neutrófilos; e que esta interação explica, em parte, o dano endotelial e a diminuição da perfusão tecidual observado na sepse. De maneira interessante, Tillak e cols. (135) mostra a associação entre a resposta imune inata e adaptativa envolvendo as NETs. Neste estudo, foi descrito que a formação de NETs por neutrófilos humanos estimulados com PMA são capazes de primar diretamente as células T por reduzir o seu limiar de ativação, aumentando assim a resposta imune adaptativa, em um mecanismo que envolve a participação de TLR9.

Embora a formação das NETs sejam um mecanismo eficaz no combate a patógenos invasores, as bactérias dispõem de manobras para driblar a ação das mesmas. Por exemplo, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é um dos produtos-chaves do metabolismo oxidativo para o disparo na formação destas redes extracelulares. No entanto, as bactérias produzem uma catalase bacteriana que consome todo H_2O_2 produzido pelos neutrófilos, suprimindo desta forma, a formação de NETs. Outra estratégia é a produção de nucleases bacteriana (DNAse) que digere as NETs e libera as bactérias associadas a elas. E ainda, a parede celular bacteriana funciona como uma cápsula protetora que pode reduzir a afinidade de ligação das NETs ao micróbio [(revisado por Papayannopoulos (113)].

1.2.5.3 Células endoteliais

As células endoteliais possuem um importante papel na homeostasia, regulando o tônus vascular, o controle da circulação de nutrientes entre o espaço intra e extravascular e a preservação do fluxo sanguíneo pela regulação da coagulação (136). Quando ativadas pelo LPS ou pelas citocinas durante a sepse, adquirem uma função pró-coagulante e pró-trombótica; com a liberação de tromboplastina, do inibidor do ativador do plasminogênio e do PAF. E ainda, ocorre a diminuição da produção de trombosmodulina, uma proteína que possui a função de modular este efeito pró-coagulante (136). Neste contexto, as células endoteliais quando ativadas, produzem mediadores inflamatórios, tais como as interleucinas (IL-1, IL-6 e CXCL2), PAF, PGI_2 , endotelina (peptídeo vasoconstritor, capaz de aumentar o tônus vascular) e NO [(revisado por (137, 138)]. Como descrito anteriormente, a produção exacerbada de NO é a causa da hipotensão resistente a vasopressores característica do choque

séptico. Além do mais, à resposta do hospedeiro a sepse pode promover um aumento recrutamento de leucócitos para o foco infeccioso, causando lesão endotelial, que por sua vez contribui para a ampliação da reação inflamatória, com formação de edema, disfunção microcirculatória e orgânica (137, 138).

1.2.6 Microcirculação na sepse

Na sepse, o monitoramento do fluxo sanguíneo microcirculatório tem ganhado relevância, não somente como um parâmetro de prognóstico, mas também como a possibilidade de ser utilizado como orientação terapêutica. Atualmente, a disfunção microcirculatória tem sido chamada de “motor da sepse” (139, 140). Uma matriz complexa de fatores patogênicos observados na sepse afetam os componentes da circulação sistêmica; tais como as células endoteliais, leucócitos, plaquetas, a cascata de coagulação, as células musculares lisas e ainda, os controles neurais e endócrinos, o que torna a compreensão da fisiopatologia da sepse um grande desafio (141, 142). Dentre as características da disfunção na microcirculação na sepse se encontra a irregularidade e heterogeneidade na distribuição do fluxo sanguíneo. Já foi mostrado que em certos leitos vasculares, ou unidades microcirculatórias tornam-se hipoperfundidas, enquanto que outras do mesmo tecido se mostram normais ou ainda, de maneira anormal, hiperperfundidas, sugerindo que o dano na microcirculação possa ocorrer de maneira difusa, o que torna complicado delimitar as fases clínicas da sepse (103, 143-145). Este fenômeno é explicado pela disfunção na expressão da iNOS. Como o NO não é expresso de forma homogênea no sistema orgânico, áreas com pouca iNOS apresentam uma menor vasodilatação e se tornam pouco perfundidas (145).

Vários outros fatores exercem um papel no controle da microcirculação na sepse. As células musculares lisas que circundam as arteríolas e regulam a perfusão local perdem a sua sensibilidade adrenérgica e, conseqüentemente, o tônus vasomotor (146). Ocorre também, a diminuição da capacidade das hemácias de se ajustarem ao diâmetro dos vasos, que por serem maiores do que o diâmetro dos capilares aumentam a chance de formação de trombozes microvasculares. Além do mais, os leucócitos ativados pela resposta inflamatória geram espécies reativas de oxigênio que podem prejudicar a função do glicocálix e a coagulação, levando adiminuição da perfusão tecidual (147). Ainda neste contexto, a camada interna que circunda as vênulas se tornam extremamente tortuosas, com uma acentuada redução do diâmetro do vaso e diminuição do fluxo sanguíneo. Este estreitamento no diâmetro do vaso foi possivelmente causado em consequência da adesão dos leucócitos às células endoteliais. Este evento é chamado de estenose da adesão de leucócitos (*Leukocyte Adhesion Stenosis*), ou

shunting funcional que começa em uma fase muito precoce da sepse, cerca de 30 minutos a uma hora (144). Como descrito anteriormente, a ativação dos leucócitos e das células endoteliais é a resposta imune primária do hospedeiro contra a invasão bacteriana (144). No entanto, estes fatores impedem a perfusão tecidual normal, levando a hipóxia e um quadro denominado recentemente por síndrome da disfunção mitocondrial e microcirculatória (SDMM). Em um momento tardio, as condições hemodinâmicas deficientes somadas à ativação do processo inflamatório podem levar a um quadro de falência orgânica múltipla e morte (figura 1.2.6) (103, 140, 148, 149).

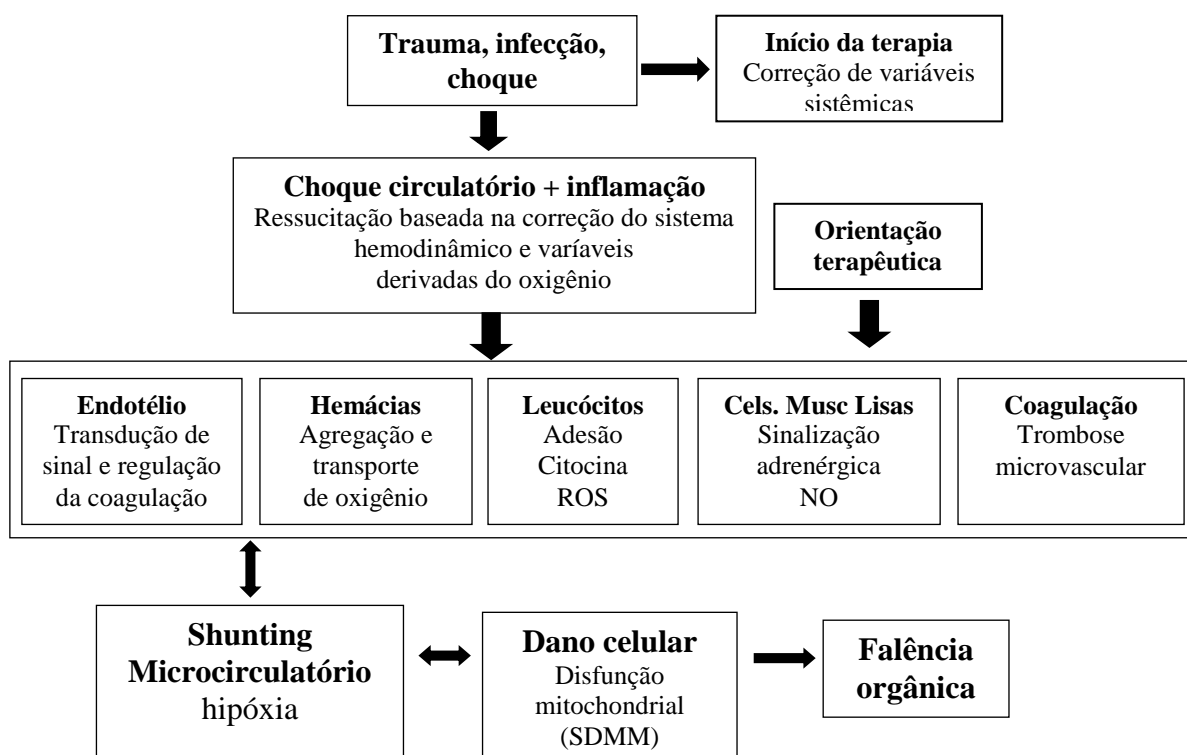


Figura 1.2.6: A microcirculação é o motor da sepse. A falência microcirculatória pode ser iniciada por vários estímulos nocivos como trauma, infecção e choque. Neste momento se inicia o tratamento que é baseado na correção de variáveis sistêmicas, como a volemia. No entanto, a disfunção microcirculatória pode persistir e permanecer indetectada, levando a uma condição denominada síndrome da angústia mitocondrial e microcirculatória (SDMM). O tempo e a terapia contribuem para a sua definição e natureza. Sem correção, diferentes componentes celulares e inflamatórios de uma microcirculação desregulada interagem e aumentam a severidade, contribuindo para a disfunção respiratória das células do parênquima, resultando em dano celular e falência orgânica. Figura modificada de Ince (140).

1.2.7 Microcirculação cerebral na sepse

A microcirculação cerebral é altamente regulada pela barreira hematoencefálica (BHE). Trata-se de uma barreira física e metabólica (150) localizada na interface entre o tecido cerebral e o sangue (151) impedindo a passagem e a troca de íons e moléculas orgânicas entre o plasma sanguíneo e o tecido nervoso e desempenhando um papel vital na proteção do cérebro (152). O endotélio capilar cerebral que forma a BHE é contínuo, ao contrário do endotélio presente em outros tecidos corporais que possui a característica de permeabilidade (153). Portanto, o dano endotelial acarretado por mediadores inflamatórios têm sido implicado como uma causa provável da disfunção da integridade da BHE (154).

Durante a sepse, o cérebro é um dos primeiros órgãos afetados, mas os mecanismos associados com a encefalopatia séptica ainda não estão completamente esclarecidos (155). A encefalopatia séptica é uma severa e frequente complicação associada com o aumento na mortalidade e morbidade na sepse. Ela não está associada somente com a disfunção cerebral aguda, mas também com déficits cognitivos a longo prazo (156-158).

Um dos cenários fisiopatológicos é um processo inflamatório que começa com ativação endotelial cerebral (143, 159), que devido as alterações na barreira hematoencefálica, facilita a migração de leucócitos e mediadores inflamatórios (tais como, citocinas e quimiocinas) no parênquima cerebral. O aumento da permeabilidade na BHE tem sido extensivamente documentado, em diversos modelos experimentais de sepse utilizando animais, como também em pacientes, utilizando imagens de ressonância magnética (160). Mediadores inflamatórios são capazes de alterar o metabolismo celular, induzindo o estresse oxidativo e disfunção mitocondrial (161), resultando em alterações na neurotransmissão (adrenérgica, serotoninérgica e gabaérgica) e apoptose (162). Além disso, as lesões cerebrais também podem aumentar a liberação de citocinas. É descrito que o TNF- α é um mediador chave produzido pelo cérebro durante a infecção, que está diretamente relacionado com o edema cerebral observado na sepse, por regular a proteína aquaporina 4 (APQ4) e interferir com entrada de água para dentro do cérebro (163). E ainda, em modelos de animais foi mostrado que o LPS pode levar a alterações nos níveis de heme oxigenase-1, bem como a superregulação de IL-1 β , IL-6 e iNOS no hipotálamo e hipocampo (164). Neste contexto, foi relatado que fatores adicionais contribuem para este processo neuroinflamatório, tais como a liberação de aminoácidos excitatórios, hiperglicemia, exposição a agentes farmacológicos neurotóxicos, alterações na hemodinâmica e hipoxemia (157). De fato, um trabalho publicado por Comim e cols (165) mostraram que na sepse induzida por CLP em ratos, a produção de citocinas e quimiocinas é um evento precoce e isto parece participar tanto da disfunção do

sistema nervoso central quanto das alterações na permeabilidade cerebral, reforçando o envolvimento da resposta inflamatória cerebral no dano cognitivo associado à sepse.

1.2.8 Tratamento na sepse

Segundo Dellinger e cols. (166), o objetivo fundamental do tratamento do paciente séptico é a manutenção de um suporte cardiorrespiratório e metabólico, que permita manter o paciente vivo até a sua recuperação integral. O controle definitivo do agente infeccioso é imperativo no tratamento, sendo a primeira prioridade. Sendo assim, as principais terapias aplicadas para o tratamento da sepse e choque séptico incluem: a) controle do agente infeccioso b) reversão do choque (reposição da volemia e aminas vasoativas), suporte (ventilação mecânica, nutrição precoce), c) medidas adicionais (proteína C ativada, corticóides, controle da glicemia) e d) avaliação hemodinâmica da perfusão tecidual.

A reposição volêmica deve ser feita em pacientes com sepse grave que possuem hipotensão e hipoperfusão tecidual. Recomenda-se a administração precoce de cristalóide (soro fisiológico ou solução de Ringer). Em caso de hipotensão arterial persistente após reposição volêmica adequada, deve-se administrar uma amina vasopressora. Se o débito cardíaco estiver reduzido após a reposição volêmica, sugere-se a utilização de uma amina inotrópica, como por exemplo a dopamina ou adrenalina (166). No entanto, a terapia com estas classes de drogas devem ser utilizadas com cautela e sob condições de monitoramento da microcirculação. Isto porque o seu efeito na microcirculação ainda é bastante controverso. Alguns estudos experimentais mostram que administração de vasopressina, por exemplo, pode melhorar a microcirculação renal (167), enquanto outros estudos mostram que a administração deste vasopressor pode causar colapso na microcirculação intestinal (168). Levando em consideração que a microcirculação pode ser afetada por diversas causas na sepse, drogas com múltiplo sítios de ação podem fornecer uma eficiente estratégia terapêutica na monitoração da microcirculação na sepse. Neste contexto, a terapia com a proteína C ativada (PCA) se mostra bastante eficiente. O uso da PCA reduz a mortalidade em 6% nos pacientes com sepse grave e choque séptico com alto risco de morte (escore APACHE II > 25 pontos). Deve ser utilizada precocemente, mas está contraindicada em pacientes com trombocitopenia grave ou sangramentos ativos (169). Além disso, a PCA inibe a expressão da iNOS, inibindo a hipotensão causada pela endotoxina (170), assim como reduz a ativação dos leucócitos e consequentemente a liberação de espécies reativas de oxigênio por estas células (171).

Com relação ao diagnóstico, somente é recomendada a obtenção das culturas bacterianas antes do início da antibioticoterapia, se essas culturas não forem causar um atraso significativo no início da administração do antibiótico (166). Em pacientes com sepse grave ou choque séptico, caso tenha que se iniciar a antibióticoterapia antes da conclusão do diagnóstico, recomenda-se que a escolha inicial seja de um antibiótico de amplo espectro (que possa cobrir todos os possíveis patógenos), já que esses pacientes são de alto risco (166). Trabalhos mostram que a falha para iniciar a antibioticoterapia apropriada está relacionada com o aumento de morbidade e mortalidade (172). Atualmente, existem outras abordagens terapêuticas aplicadas à sepse, dentre as quais podem-se destacar o uso de hemoderivados (manutenção da concentração de hemoglobina) (166), a utilização de hemodiálise (173) e ainda, o tratamento com anti-inflamatórios corticosteróides. Os corticosteróides exercem seu mecanismo de ação inibindo o fator de transcrição NFkB, e conseqüentemente, a expressão de genes pró inflamatórios.

1.2.9 Receptores ativados por proliferador de peroxissomo γ (PPAR γ)

Os PPAR (*Peroxisome Proliferator-Activated Receptors*) são membros de uma superfamília de fatores transcricionais que, após ativação por seus ligantes, regulam o metabolismo de lipídios e lipoproteínas, controle de glicemia e participação nos processos inflamatórios, estando também implicados na fisiopatologia da aterosclerose, inflamação, obesidade, diabetes e resposta imune (174-176). Inicialmente os PPARs foram descritos em virtude de seu papel central na proliferação de peroxissomos (organelas plasmáticas responsáveis pelo metabolismo de H₂O₂). Atualmente, diversas outras funções têm sido atribuídas a esses receptores, tais como regulação do metabolismo de lipídios e lipoproteínas, controle de glicemia e participação nos processos inflamatórios (174, 177). Já foram descritos 3 isotipos de PPAR em mamíferos: o PPAR α , PPAR β/δ e o PPAR γ (178). O PPAR α é encontrado no fígado, músculo, coração, endotélio e rins. Tem como principais ligantes endógenos os ácido graxos livres, e exógenos os fibratos, fármaco utilizado para tratamento no controle da hiperlipidemia . Os receptores PPAR α são envolvidos na oxidação de ácidos graxos livres, na transcrição de fatores com atividade anti-inflamatória e no metabolismo de lipoproteínas. O PPAR β/δ é expresso em fígado, intestino, músculo e tecido adiposo e está envolvido na regulação do metabolismo de colesterol (179). O receptor PPAR γ é expresso principalmente no tecido adiposo, mas também é expresso pelo endotélio vascular, por macrófagos, monócitos e plaquetas. Existem ainda 3 isoformas do PPAR γ , o PPAR γ 1 que é expresso na maioria dos tecidos (178); o PPAR γ 2 que é expresso no tecido adiposo (180) e

PPAR γ 3 que é encontrado no adiposo, cólon, nos macrófagos e células T (181). O PPAR γ é capaz de regular a transcrição gênica através de diferentes mecanismos. A regulação direta da transcrição gênica mediada por PPAR γ se inicia com sua ativação através de ligantes lipídicos, o que causa alterações conformacionais na molécula e permite que a mesma se dimerize com outro receptor nuclear, o receptor de ácido 9-cis-retinóico (receptor X de retinóides; RXR). Este complexo recruta outras moléculas co-ativadoras e se torna capaz de se ligar à região promotora de genes responsivos, chamada PPRE (*PPAR γ Responsive Element*), promovendo a transcrição de genes que codificam proteínas envolvidas no processo inflamatório (figura 1.2.9). O PPAR γ também é capaz de transreprimir certos genes de modo independente de sua ligação direta com o DNA. Este efeito é particularmente importante na inibição de genes pró inflamatórios, havendo cinco possíveis mecanismos implicados. O primeiro deles se dá através da ligação direta do complexo PPAR γ /RXR com outros fatores de transcrição; este fenômeno de interação direta é observado entre PPAR γ e as subunidades p50 e p65 de NF- κ B em macrófagos de camundongos (182). O segundo mecanismo envolve a ligação do heterodímero ativado PPAR γ /RXR com moléculas co-ativadoras necessárias para a ação de fatores de transcrição responsáveis pela expressão de proteínas pró-inflamatórias, tais como CBP (*CREB-binding protein*) e/ou p-300, necessários para a atividade de AP-1 (*Activator Protein-1*), STAT-1 (*Signal Transducer and Activator of Transcription 1*), e NF- κ B (183). O terceiro mecanismo foi demonstrado por Pascual e cols (184), o qual descreve um fenômeno chamado sumoilação do PPAR γ . O PPAR γ pode transreprimir os genes pró-inflamatórios dependentes de NF- κ B pela inibição da degradação de um complexo proteossomal formado pelo receptor nuclear co-repressor (Nco-R)+histona deacetilase3 (HDAC3)+proteína transduscina do tipo β 1 (TLB1/TLBR1), todos responsável pela ativação do NF- κ B no sítio promotor. O quarto mecanismo pelo qual o PPAR γ é capaz de transreprimir genes se dá através da inibição de MAP quinases. Este mecanismo foi postulado uma vez que animais heterozigotos deficientes em PPAR γ apresentam uma diminuição nos níveis de fosforilação de JNK e p-38 quando expostos a estímulos específicos (181). O quinto e último mecanismo o PPAR γ inibe a translocação da proteína quinase C α (PKC α) atenuando a ativação da NADPH oxidase e consequentemente a produção de ROS pelos macrófagos (185) (para maiores detalhes ver figura 1.2.9). Diversos ligantes de PPAR γ já foram caracterizados. Dentre os ligantes endógenos conhecidos estão uma fração da LDL (*Low Density Lipoprotein*) oxidada chamada Hexadecil azeloil fosfatidilcolina (AzPC) (186), o ácido lisofosfatídico, liberado por plaquetas ativadas (187) e durante o processo de oxidação da LDL (188), e a 15deoxi-2,14 prostaglandina J2 (15dPGJ₂), metabólito derivado da PGD₂

sintetizada pela enzima COX-2. Ligantes exógenos incluem a classe de drogas hipoglicemiantes Tiazolidinedionas (Glitazonas) e o antagonista sintético GW9662.

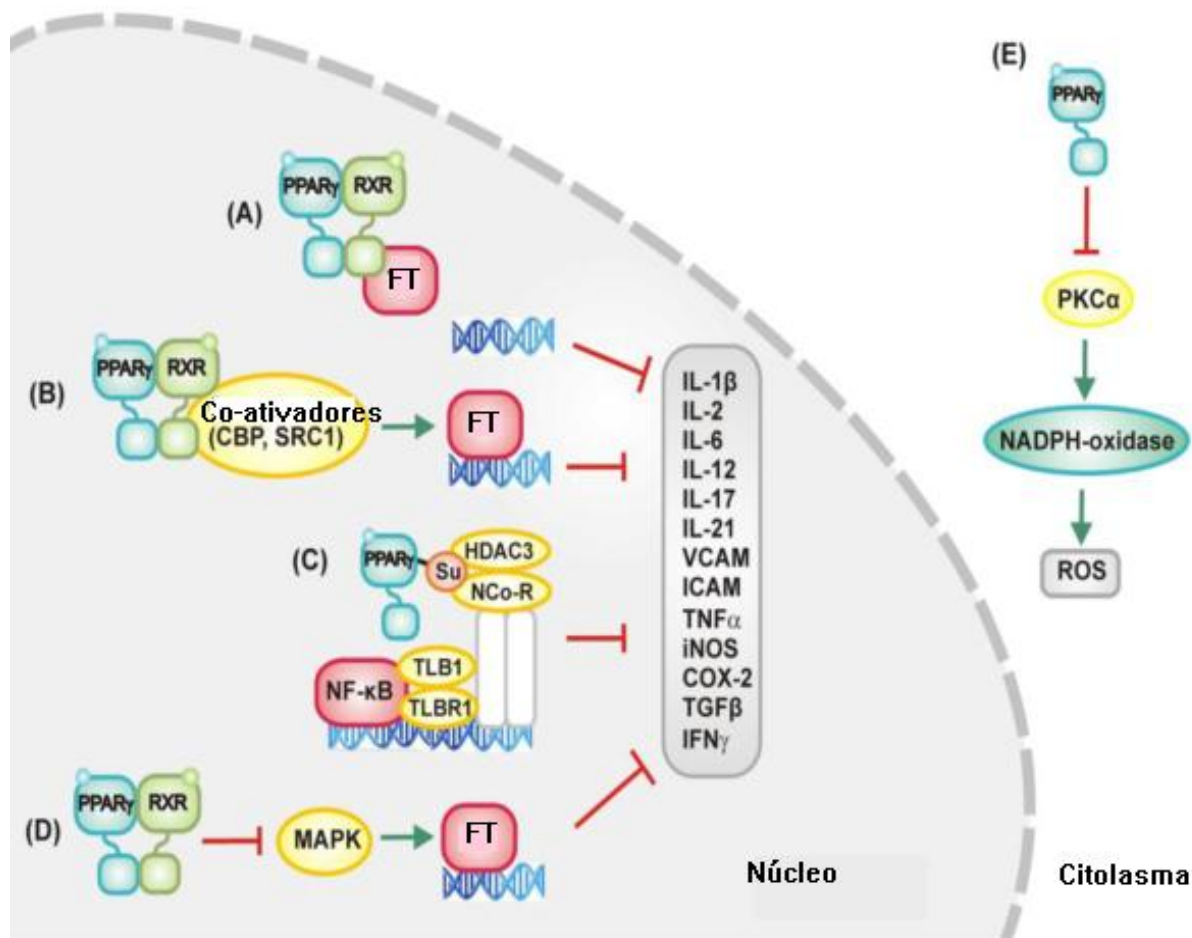


Figura 1.2.9: Mecanismos da inibição da expressão de genes pró-inflamatórios dependentes de PPAR γ . Em presença do agonista, o PPAR γ (A) se associa diretamente com fatores de transcrição pró-inflamatórios (FT), tais como o NF- κ B, STAT, e AP-1 e inibe a expressão de genes pró-inflamatórios; (B) sequestra fatores transcripcionais co-ativadores, tais como o CBP (*CREB binding protein*) e SRC-1 (*Steroid Receptor Co-activator 1*) inibindo a sua ligação com FT pró-inflamatórios, diminuindo a expressão de genes pró-inflamatórios; (C) em resposta a sumoilação (Su), o PPAR γ inibe a degradação do complexo (NcoR)+(HDAC3)+(TLB1/TLBR1), o qual por sua vez, permitiria a expressão dos genes pró-inflamatórios regulados pelo o NF- κ B. (D) além desses 3 mecanismos de transrepressão, o PPAR γ inibe a MAPK (*Mitogen-Activated Protein K*) a qual é necessária para a indução da expressão de genes pró-inflamatórios. (E) Finalmente, a expressão do PPAR γ inibe a translocação da PKC α (*Ca Protein Kinase*), consequentemente inibindo a ativação da NADPH oxidase. Em C e E, a formação do heterodímero RXR (*Retinoid X receptor*) não é necessária. Figura adaptada de Schmidt e cols. (177).

1.2.10 Ligantes de PPAR γ

1.2.10.1 Tiazolidinedionas: estrutura química

As Tiazolidinedionas ou glitazonas incluem a Pioglitazona, Rosiglitazona, Troglitazona e Ciglitazona. Estas drogas que tem sido descritas como agonistas de PPAR γ e são sensibilizadoras da ação da insulina. Elas representam 21% das prescrições médicas para pacientes com Diabetes *Mellitus* tipo 2 nos Estados Unidos e 5% na Europa (189). Apresentam, como característica de sua estrutura química, um anel diona, que confere atividade anti-hiperglicêmica que, entretanto, depende da presença da insulina. O restante da molécula difere entre drogas do grupo e é responsável pela especificidade farmacodinâmica e farmacocinética (190). Atualmente, os fármacos do grupo disponíveis no mercado são a Pioglitazona e a Rosiglitazona (figura 1.2.10.1).



Figura 1.2.10.1: Estrutura química da Pioglitazona e Rosiglitazona. Figura modificada de Gomes M. (191).

1.2.11 Papel do PPAR γ na sepse

Tem sido proposto que o PPAR γ exerce um papel crucial no controle da resposta inflamatória, sendo portanto um alvo terapêutico promissor para o tratamento da sepse (181). O PPAR γ inibe a expressão do fator de transcrição NF-kB, inibindo portanto a expressão de citocinas inflamatórias como o TNF- α , IL-12 (182), a expressão de moléculas de adesão (VCAM-1 e ICAM-1) (192), a expressão da COX-2 induzível, assim como a iNOS (193-195).

Levando em consideração as propriedades anti-inflamatórias do PPAR γ , Collin (196) demonstrou pela primeira vez em modelo de endotoxemia em ratos, que o agonista endógeno do PPAR γ reduziu o dano hepático pela diminuição das transaminases plasmáticas. Desde então, uma série de outros trabalhos vem mostrando os efeitos dos ligantes de PPAR γ em diferentes modelos de sepse. Estudos *in vivo* tem mostrado que a administração de agonistas

de PPAR γ , como a Rosiglitazona após a injeção de LPS são capazes de inibir a injúria pulmonar assim como o infiltrado de neutrófilos para o pulmão e intestino, resultando em aumento na sobrevivência de 55% desses animais (197). Neste estudo, os efeitos observados foram atribuídos a redução da atividade do fator de transcrição NF-kB e do aumento da expressão da proteína citoprotetora, a proteína de choque térmico 70 (*Heat shock protein – HSP70*). Ainda neste contexto, foi descrito que a duração e extensão da ativação do NFK-B está associado diretamente com a severidade da resposta inflamatória na sepse, e consequentemente com o aumento na taxa de mortalidade dos animais (197). De maneira interessante, em um modelo de sepse polimicrobiana induzido pelo CLP, em que camundongos tratados com agonistas de PPAR γ , como Ciglitazona e 15d-PGJ₂, a hipotensão induzida pela sepse foi revertida, assim como a produção e liberação de citocinas pró-inflamatórias, e o aumento do infiltrado de neutrófilos no pulmão, colón e fígado. E ainda, estes efeitos anti-inflamatórios dos agonistas de PPAR γ estavam relacionados mais um vez com a regulação da via do NFK-B e proteína AP-1 (198). Em outro modelo de peritonite causado pela administração de carragenina, Napimoga e cols (199), mostraram que o efeito anti-inflamatório do 15DPGJ₂ em reduzir a migração e adesão de neutrófilos no sítio da inflamação, era dependente da produção de NO no mesentério e que o antagonista específico do PPAR γ , GW9662 foi capaz de reverter este efeito protetor.

Em trabalho recente de Kaplan e cols (200), em um modelo de sepse polimicrobiana em ratos foi reforçada a relevância do PPAR γ em regular determinados fatores de transcrição e, consequentemente, modular a resposta inflamatória durante a sepse. De maneira interessante, o estudo mostrou que o tratamento com um inibidor de MAPK, o PD98059 foi capaz de restaurar a expressão e ativação do PPAR γ , perdidas durante a sepse, efeito este que foi atribuído pelo menos em parte pela inibição da fosforilação do PPAR γ pela ERK-1/2, levando a uma melhora no dano pulmonar dos animais sépticos.

De uma forma geral, embora existam trabalhos que descrevam algumas propriedades anti-inflamatórias dos agonistas do PPAR γ em modelos experimentais, até o presente momento não há nenhum trabalho que elucide o mecanismo de ação molecular pelo qual o PPAR esteja envolvido no controle da infecção e aumento da sobrevivência. A partir disso, o objetivo geral do nosso trabalho é estudar o mecanismo de ação do PPAR γ na sepse experimental em um modelo de CLP contribuindo para o maior entendimento dos aspectos moleculares envolvidos e propor novas estratégias terapêuticas.

2.1 Objetivo geral

O presente estudo tem como objetivo caracterizar o papel do receptor PPAR γ em modelos de sepse experimental.

2.2 Objetivos específicos

1. Investigar os efeitos da Rosiglitazona na sobrevida, na resposta inflamatória e no escore clínico de animais submetidos a modelos de sepse experimental;
2. Estudar os efeitos da Rosiglitazona na microcirculação cerebral de animais sépticos;
3. Estudar o envolvimento da Rosiglitazona na eliminação bacteriana, na produção de NO e ROS em animais submetidos à CLP;
4. Verificar se a Rosiglitazona e o antagonista de PPAR γ GW9662 possuem efeitos diretos no crescimento bacteriano;
5. Analisar o envolvimento da Rosiglitazona na eliminação bacteriana em experimento *in vitro* com culturas de neutrófilos humanos estimulados com *E. coli*;
6. Caracterizar o efeito da Rosiglitazona e GW9662 na indução da formação de redes extracelulares formadas por neutrófilos humanos (NETs) estimulada por LPS ou *E. coli* e na eliminação bacteriana mediada por NETs.

3 Materiais e métodos

3.1 Experimentos *in vivo*

3.1.1 Animais

Foram utilizados camundongos da linhagem *Swiss Webster* machos pesando entre 20 e 40 gramas fornecidos pelo Centro de Criação de Animais de Laboratório (CECAL) da FIOCRUZ. Os animais foram mantidos em isoladores ventilados (Gabinete Biotério mod. EB-273, Insight, Brasil) no biotério do Pavilhão Ozório de Almeida até o momento do experimento, com livre acesso a água e ração, sendo submetidos a um ciclo de 12 h de claro/escuro. Os animais receberam uma dose de vermífugo (Vetbrands) por via oral (gavagem) e foram utilizados uma semana após o tratamento. Os protocolos utilizados nesta tese foram aprovados pelo comitê de Ética no Uso de animais da Fundação Oswaldo Cruz (CEUA-FIOCRUZ, licença nº 0260-05 e nº L-034/08).

3.1.2 Indução de sepse polimicrobiana pelo modelo CLP

Os animais foram anestesiados através de injeção i.p. de cloridrato de cetamina (100 mg/kg, Cristália) e xilazina (10 mg/kg, Syntec) 5 minutos antes da cirurgia. Após o procedimento anestésico, a tosa e a assepsia local, o ceco dos animais foi externado e ligado com linha de algodão (3.0) abaixo da válvula ileocecal, de maneira a não obstruir o trânsito intestinal. A ligadura cecal foi seguida de uma única perfuração local com uma agulha de 18G (BD). Uma pequena quantidade de material fecal foi extravasada pelo orifício da punção antes da recolocação do ceco na cavidade abdominal. O abdômen foi suturado com agulha de nylon (3.0) e após o procedimento cirúrgico, os animais receberam uma reposição volêmica com 1 mL de solução salina estéril por via subcutânea. O controle negativo deste modelo foi constituído por animais sham (falsos) operados, nos quais o abdômen foi apenas aberto e suturando em seguida, para descartar a influência do procedimento anestésico e cirúrgico na análise dos resultados.

3.1.3 Modelo de sepse por injeção de macerado fecal

Animais foram eutanasiados em câmara de CO₂ e suas cavidades peritoneais foram abertas para a retirada de fezes do intestino grosso (incluindo o ceco). Em seguida, as fezes foram coletadas com auxílio de um rodo apropriado para cultura de células e pesadas. O

modelo foi padronizado retirando-se 5 mg de fezes para cada 1g de peso corporal. Após a pesagem, foi adicionado ao material fecal 0,5 mL de salina e em seguida foi centrifugado a 800 g por 10 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi recolhido e injetado um volume de 0,5 mL na cavidade abdominal de cada animal. Após 15 minutos desse procedimento, os animais foram tratados com Rosiglitazona (0,5 mg/kg, i.v.) ou DMSO (controle). Após 6 h da indução de sepse severa, os animais foram tratados com antibiótico Imipenem (10 mg/kg) por cavidade, em um volume de injeção de 0,2 mL. O grupo controle foi injetado 0,5 mL de salina estéril na cavidade de cada animal.

3.1.4 Tratamento com ligantes de PPAR γ

Os animais foram tratados com o agonista de PPAR γ , Rosiglitazona (0,5mg/kg, i.v. ou i.p.) e/ou com antagonista GW9662 (1mg/kg, i.v. ou i.p.) 15 minutos após CLP. Em experimento de análise de sobrevida a Rosiglitazona também foi administrada 6 h após a cirurgia. Os animais submetidos à CLP receberam injeção i.v ou i.p. de veículo DMSO como controle do tratamento. Todas as análises foram feitas 24 h após o CLP.

3.1.5 Curva de sobrevida após a indução do CLP ou após o modelo de injeção de macerado fecal

Após a indução do CLP ou o modelo de sepse induzido por injeção de macerado fecal (descritos nos itens 3.1.2 e 3.1.3, respectivamente), foi feito o tratamento com ligantes de PPAR γ descrito no item anterior e as análises de mortalidade dos animais foram efetuadas durante o período de 0 a 144 h.

3.1.6 Análise do grau da severidade da sepse - escore clínico

Os animais foram submetidos à CLP e tratados de acordo com item 3.1.4. Após 24 h, os animais tiveram o escore clínico avaliado. Para fazer o escore, foram analisados os seguintes parâmetros: piloereção, taxa de respiração, alteração nas fezes, lacrimação/alteração nas pálpebras, abdômen contraído, força ao agarrar um objeto, alteração de temperatura corporal, alerta (escape ao toque), exploração do ambiente e atividade locomotora. Para cada parâmetro apresentado, o animal recebia um ponto e na ausência do parâmetro ele não pontuava. Em seguida, os pontos eram somados para a classificação clínica do animal, sendo de escore de 0 significa que o animal não apresenta nenhuma alteração clínica, e o escore menor ou igual a 3

significa uma sepse leve, entre 4 e 7 significa uma sepse moderada e entre 8 e 11 significa uma sepse grave (Reis PA, dados não publicados).

3.1.7 Determinação de parâmetros celulares (leucometria) após CLP

Após a indução de sepse, os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂. A cavidade peritoneal foi aberta e lavada com 3 mL de PBS (1x), de onde foram obtidas alíquotas do lavado peritoneal para a contagem total e diferencial de células. O sobrenadante livre de células foi armazenado em freezer -80°C para posterior dosagem de citocinas pelo método de ELISA.

3.1.8 Contagem total e diferencial das células do lavado peritoneal

A contagem total de células do lavado peritoneal foi efetuada em câmeras de Neubauer em microscópio óptico (Olympus, aumento de 10x), após a diluição de 40X das mesmas em solução de Turk. A análise diferencial de leucócitos foi realizada sob objetiva de imersão em citoesfregaços preparados em citocentrífuga (Cytospin-Shandon-450 rpm por 5 minutos), corados pelo método Panótico Rápido (Laborclin). Foram contadas 100 células consecutivas por citoesfregaço em microscópio de luz, com objetiva (aumento de 100x) de imersão em óleo. A quantidade de cada tipo celular foi calculada a partir da porcentagem encontrada com relação ao número total de células. Para obtenção dos sobrenadantes, os lavados peritoneais foram centrifugados a 900 g durante 10 minutos e armazenados a -80°C para análises futuras.

3.1.9 Avaliação da carga bacteriana - contagem de unidades formadoras de colônias

Os animais foram submetidos à CLP e 15 minutos após tratados com Rosiglitazona e/ou GW 9662 ou respectivos veículos. Após 24 h, as cavidades peritoneais dos animais foram lavadas com 3 mL de salina estéril em fluxo laminar. Em seguida foram coletadas alíquotas do lavado peritoneal e feitas diluições de 1:100 e 1:1000 em PBS e 20 µL dos lavados foram plaqueados em placa de TSA (*Trypticase Soy Agar*) e incubadas na estufa a 37°C por 24 h para posterior contagem manual de unidades formadoras de colônias (UFC). Os resultados foram expressos em número de unidades formadoras de colônia por mL.

3.1.10 Avaliação da glicemia dos animais submetidos à CLP

Os níveis de glicose dos animais foram medidos 24 h após o CLP na ausência e na presença do tratamento com Rosiglitazona. Para tanto, foi retirada uma gota de sangue venoso da veia caudal dos animais e a glicemia foi medida por um monitor (One Touch Ultra2, Johnson & Johnson Medical S.A.). As medidas normais de glicose em camundongos *Swiss sadios* é em torno de 120 mg/dL.

3.1.11 Microscopia intravital cerebral por epi-iluminação e fluorescência

Após 24 h do procedimento CLP descrito no item 3.1.2., foram realizados os experimentos de microscopia intravital. Os animais foram mantidos sob anestesia com doses suplementares de 1 mg/kg, i.v., através de catéter na veia jugular direita. A visualização da microcirculação cerebral foi realizada através de uma craniotomia no osso parietal direito com o auxílio de uma broca, permitindo a exposição da membrana *pia mater*. Esta janela craniana permite a observação dos vasos sanguíneos desta rede vascular que é mantida sob o feixe de luz (201).

Foi realizada a administração i.v. de fluoresceína dextran (FITC-dextran 150, Sigma[®]), e as imagens da microcirculação foram feitas através do software *Archimed 3.7.0* (Microvision, França). A contagem de capilares foram feitas com o auxílio do software *Saisam 5.1.3* (Microvision, França). Serão feitas imagens seriadas com oculares de 10x e objetivas de 10x (Olympus BX150WI, EUA) com duração de 1 minuto para cada campo e calculadas por número de capilares por mm². Somente foram computados os capilares perfundidos continuamente, representando a densidade capilar média funcional.

Para marcação dos leucócitos circulantes, foi feita a administração i.v. de 0,3 mg/kg de rodamina 6G (Sigma[®]) e os leucócitos com a fluorescência associada foram visualizados através da microscopia descrita acima. A interação leucócito-endotélio foi avaliada através da determinação do número de leucócitos aderidos à parede venular por um período de 30 segundos. O rolamento de leucócitos foi definido quando sua velocidade dentro do vaso era inferior à dos eritrócitos circulantes. Foram analisados vasos da membrana *pia mater* com diâmetros variando de 50 a 120 µm e, devido à grande variabilidade de diâmetros dos vasos deste leito vascular, a adesão leucocitária foi expressa em número de células/min.

3.1.12 Medidas hemodinâmicas de pressão arterial e frequência cardíaca

A pressão arterial e a frequência cardíaca foram monitoradas continuamente nos animais submetidos à CLP tratados ou não, através de cateter colocado na artéria carótida esquerda, conectado a um transdutor de quartzo, por sua vez conectado a um sistema de aquisição automática de dados hemodinâmicos Biopac (MP 150, Biopac Systems, EUA).

3.2 Experimentos *in vitro*

3.2.1 Dosagem de citocinas e quimiocinas

Os sobrenadantes de lavado peritoneal foram estocados a -80°C para dosagens de citocinas tais como TNF- α , IL-6, IL-10, e da quimiocina CCL2 e CXCL1, pelo método ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*). Foram utilizados anticorpos monoclonais específicos (Duo set kit – R&D Systems). Para essas análises foi utilizado o protocolo da Pharmingen, no qual placas de 96 poços (Nunc) foram revestidas com anticorpos de captura. As placas foram cobertas com papel alumínio e incubadas *overnight* a 4°C . No dia seguinte, após 3 lavagens com PBS/Tween, os sítios inespecíficos foram bloqueados pela adição de PBS/BSA 1%. Após 1 h as placas foram lavadas por 4 vezes com PBS/Tween novamente e, em seguida, foram adicionadas proteínas recombinantes em diferentes concentrações (curvas-padrão), bem como as amostras de lavado peritoneal. Novamente as placas foram incubadas *overnight* a 4°C . No último dia após a rinsagem, o anticorpo de detecção foi adicionado também diluído em PBS/BSA 1% +Tween 20 a 0,05 %. Após 1 h de incubação a temperatura ambiente, adicionou-se avidina-peroxidase (diluição 1:200, R&D). Após 30 minutos, as placas foram lavadas com solução de lavagem e em seguida, adicionou-se a solução de TMB (3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina, Sigma). A reação foi paralisada com a adição solução de ácido sulfúrico (Próquimios) 0,4 N (50 μL /poço) e a leitura foi feita no comprimento de onda de 405 nm em espectrofotômetro (Spectra Max, Molecular Devices®).

| Citocina | Anticorpo de captura | Curva de citocina recombinante | Anticorpo de detecção |
|-----------------------|----------------------|--------------------------------|-----------------------|
| IL-6 (R&D, dual set) | 2 µg/mL | (1000 pg/mL) | 0,2 µg/mL |
| IL-10 (R&D, dual set) | 2 µg/mL | (2000 pg/mL) | 0,2 µg/mL |
| TNF (R&D, dual set) | 1 µg/mL | (2000 pg/mL) | 0,25 µg/mL |
| CXCL1 (R&D, dual set) | 2µg/mL | (1000 pg/mL- 15,6pg/mL) | 0,2µg/mL |
| CCL2 (R&D, dual set) | 0,2µg/mL | (500 pg/mL- 7,8pg/mL) | 0,05µg/mL |

3.2.2 Análise de corpúsculos lipídicos

Citoesfregaços de lavado peritoneal de animais submetidos à CLP tratados com ligantes de PPAR γ , Rosiglitazona e/ou GW9662, ou veículo foram fixados em 3,7% de formaldeído em HBSS sem Ca⁺⁺ e Mg²⁺ (pH 7,4). Em seguida, os citoesfregaços foram enxaguados com água destilada para remoção do excesso de formaldeído. A marcação de corpúsculos lipídicos foi feita com solução de cacodilato 0,1M (pH 7,4) e corados em 1,5% de ósmio por 30 minutos. Logo após 24 h, os citoesfregaços foram enxaguados novamente em água, imersos em 1,0% de tiocarbohidrazida por 5 minutos, enxaguados, novamente em 0,1mL de solução de solução de cacodilato e repousando em 1,5% de ósmio por 3 minutos. Seguido novamente de enxague em água, as lâminas foram secas para visualização. A morfologia das células fixadas foi observada e os corpúsculos lipídicos foram contados por microscopia de luz, com objetiva de imersão de óleo (aumento de 100x), contando 50 leucócitos consecutivos em cada lâmina.

3.2.3 Análise de óxido nítrico

A produção de NO foi estimada pelo acúmulo de nitrito (NO₂), um produto estável da oxidação do NO, usando o reagente de Griess. A reação de Griess quantifica a presença de nitrito por espectrofotometria, pois ocorre a formação de um composto de coloração rosada quando o nitrito é tratado com o reagente de Griess. As amostras foram então colocadas em placa com 96 poços e em seguida foram adicionados 100 µL do reagente de Griess (Sigma). O reagente foi também adicionado à curva padrão. Foram utilizados 100 µL da diluição em cada poço. A leitura da absorbância foi realizada em leitor de microplacas, com comprimento de onda de 540nm (Spectramax 190 – molecular Devices – EUA). A produção do NO foi quantificada através da comparação à curva-padrão.

3.2.4 Ensaio de estresse oxidativo

A atividade de peróxido de hidrogênio no sangue foi medida após 15 minutos de incubação a 37^o C com PMA (Phorbol Myristate Acetate), em seguida, mais 15 minutos de incubação com dihidrorodamina 123 (DHR) a 37^oC, na ausência e na presença de catalase bovina. Em seguida, foi adicionada uma solução de lise de hemácias comercial. O sangue foi centrifugado e o sobrenadante descartado. As células foram lavadas duas vezes para remover o excesso de fluorescência e ressuspensas em solução tampão (PBS). Todas as amostras foram analisadas por citometria de fluxo no FACScalibur[®]. E os dados foram analisados no programa FCS Express 3.0.

3.2.5 Cultura de *E. coli* e ligantes de PPAR γ

Colônias isoladas de *E. coli* foram colocadas para crescer por 16 h em 3 mL de meio Luria Bertani na estufa a 37^oC. A densidade de bactérias no meio após incubação foi determinada através de leitura espectrofotométrica a 660 nm. Triplicatas de amostras contendo 10⁵ bactérias suspensas em 1 mL de PBS estéril foram incubadas com Rosiglitazona (0,1-10 μ M) ou GW9662 (0,1-10 μ M) por 1 h na estufa a 37^oC. Após a incubação, alíquotas de 20 μ L de amostras 100x diluídas foram plaqueadas em ágar Luria Bertani e novamente incubadas na estufa a 37^oC por 24 h. A contagem de UFC foi realizada manualmente.

3.2.6 Purificação de Polimorfonucleares por gradiente de Ficoll

Os polimorfonucleares (PMNs) foram isolados de sangue venoso de pacientes saudáveis com anticoagulante citrato ou EDTA. O sangue total foi centrifugado a 150 g por 20 minutos a 20^oC para se obter o plasma rico em plaquetas (PRP). Em seguida foi descartado o PRP e adicionados as células situadas no fundo do tubo (*pellet*) contendo células da linhagem branca e vermelho uma mistura de NaCl (0,9%) e Dextran 70 (6%) (Sigma[®]), para se obter o plasma rico em leucócitos (PRL). Em seguida, a suspensão celular foi centrifugada em gradientes Ficoll (AmerSham Pharmacia) a 1200 g por 30 minutos a 4^o C. Após a centrifugação, foi possível observar 3 bandas deste gradiente: a primeira banda correspondeu as células mononucleares, a segunda as células da linhagem vermelhas e a terceira correspondeu ao gradiente Ficoll. O *pellet* de células correspondeu aos PMNs. A pureza dos PMNs encontrada

foi de 90 a 95% que foi determinada por contagem diferencial em cito esfregaço, observados em microscopia óptica.

3.2.7 Purificação de polimorfonucleares humanos por coluna magnética

O protocolo de purificação de PMNs humanos foi aprovado segundo a comissão de ética da Universidade de Utah e de acordo com a declaração de *Helsinki*, na qual descreve os princípios éticos para a pesquisa médica envolvendo seres humanos. Os PMNs foram isolados de sangue venoso de pacientes saudáveis com anticoagulante citrato ou EDTA a 20 mM. Em seguida, as células foram purificadas por imunoseleção positiva, utilizando micro partículas revestidas (*beads* - Miltenyi Biotec, EUA) com anticorpo anti-CD15 e deixadas em repouso por 15 minutos a 4°C. Após o tempo de incubação, as células foram separadas por coluna magnética por um separador de células (auto-MACS sorter -Miltenyi Biotec) e ressuspensos em meio 199. A pureza de PMNs obtida com este sistema é cerca de 95%.

3.2.8 Cultura polimorfonucleares humanos incubados com *E. coli*

Os PMNs foram purificados por gradiente de Ficoll como descrito no item 3.2.6, e em seguida foram colocadas em placa de 26 poços, contendo meio de cultura M199 (Lonza Biologics®, Suíça). Foram plaqueadas aproximadamente 10^6 células por poço. Em seguida as células foram tratadas com Rosiglitazona nas concentrações (0,5-50 μ M) e incubadas por 1 h a 37°C. Após o tempo de incubação, as células foram estimuladas com *E. coli* por 1 h. Seguindo o tempo de estimulação, o sobrenadante foi recolhido e o número de UFC foi analisado.

3.2.9 Indução da formação de NETs

Após a purificação dos PMNs humanos, 2×10^6 /mL células foram colocadas em diferentes tubos com meio 199 e em seguida receberam dois diferentes estímulos para cada grupo separadamente: LPS sorotipo 0111:134 (Sigma®) na concentração de 0,1 - 100 ng/mL ou *E. coli* (10^6 bactérias/mL). Como controle as células foram tratadas com veículos DMSO ou etanol, ou tratadas com Rosiglitazona (0,5 μ M) na presença e na ausência do antagonista GW9662 (0,5 μ M) ou apenas com GW9662 separadamente. Em seguida, as células foram colocadas em lâminas previamente revestidas com Poli-L-lisina (1mg/mL, Sigma®) e incubadas por 1 h a 37° C em estufa com 5% CO₂. Decorrido tempo de incubação e

estimulação, as células foram retiradas da estufa e lavadas com PBS 1X para retirar o excesso de meio. Para a visualização da formação das NETs, as preparações das lâminas foram incubadas com uma mistura corantes de DNA fluorescentes: o *Syntox orange* que é um corante impermeável que marca em vermelho o DNA extracelular, e um corante permeável, o *Syto green* que marca em verde o DNA nuclear (Molecular Probes, EUA). A visualização das imagens foi feita em microscopia confocal (FV 300 1x81 - Olympus, Center Valley, EUA) com objetivas de 20x e 60x. A captura das imagens foi realizada no programa *FluoView software* (Olympus, Center Valley, EUA).

3.2.9.1 *Western blotting* para proteína histona H3

Após a visualização e captura de imagens das NETs, as preparações das lâminas foram lavadas com PBS 1X para a retirada dos corantes fluorescentes de DNA. Em seguida, as mesmas foram tratadas com DNase (2,5 U/mL) por 15 minutos para degradar o material nuclear extracelular, e em seguida foram tratadas com EDTA para interromper a reação. Após 5 minutos de tratamento, os sobrenadantes das lâminas foram removidos e colocados em tubo 1,5 mL e centrifugados a 300 g por 2 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi recolhido, colocado em tubo estéril, adicionado tampão de amostra (*lamelli buffer*) e congelados a -80 C para posterior ensaio de *Western blotting*.

No dia do ensaio de *Western blotting* foi utilizado o protocolo segundo o manual fabricante *Odyssey system*TM (Li-Cor, Biociences, EUA), em qual consiste o uso de membrana de nitrocelulose especial para fluorescência, anticorpos policlonais e marcadores de peso molecular igualmente fluorescentes. Um volume de sobrenadante diluído em tampão de amostra correspondente a 10 µg de proteínas totais foi aplicado em cada poço. Aplicou-se o padrão de peso molecular (*Odyssey system*TM - Li-Cor, Biociences). Em seguida, as amostras foram submetidas à eletroforese (em gel de acrilamida 4-20%, *Mini-Protean TGX precast Gels*[®]- BioRad) com a aplicação de 25 V por uma h e meia e em seguida, transferidas para membrana de nitrocelulose (*Odyssey system*TM - Li-Cor, Biociences, EUA) previamente permeabilizadas em metanol 100%, utilizando tampão de transferência. A transferência foi realizada a 100V por 90 minutos em sistema semi-seco (Amersham Biosciences). Após a transferência, a membrana foi incubada por 1 h com solução bloqueadora (*Odyssey system*TM - Li-Cor, Biociences, EUA) a 4°C. Posteriormente, a mesma foi incubada *overnight*, protegida da luz, com anticorpo policlonal anti histona H3 de coelho (*Cell signaling Technology*[®]), diluído em solução bloqueadora na proporção de 1:1000. Após este tempo, a membrana foi lavada com solução TBS/T. As proteínas de interesse foram identificadas pela incubação por

uma hora da membrana com anticorpos secundários anti-coelho conjugados com fluoróforo e diluídos em solução bloqueadora na proporção de 1:10000, protegendo da luz. A detecção das bandas foi feita através de escaneamento das membranas e captura de imagens com software *Odyssey Infrared Imaging system*®.

3.2.10 Quantificação da eliminação de bactérias associada a netose

Os PMNs humanos foram incubados por 30 minutos a 37°C na presença ou na ausência de inibidores de fagocitose, como a citocalasina B e D (Sigma) na concentração de 10 µM para cada tratamento. Seguida a incubação e tratamento, as células foram estimuladas com LPS (0,1µg/mL) de sorotipo 0111:134 (Sigma®) e colocadas em placa de 24 poços pré-revestidas com Poli-L-lisina (1mg/mL, Sigma®). Em seguida, as placas foram incubadas a 37° C por 1 h para permitir a formação de NETs. Após o tempo de incubação, as culturas foram tratadas ou não com DNase (2,5 U/mL- Promega, Madison, WI) por 15 minutos e em seguida estimuladas com bactérias *E. coli* (2x10⁶ células/mL) na presença dos seguintes tratamentos: DMSO (0,01%) ou etanol (0,001%), ou Rosiglitazona (0,5 µM) e/ou GW 9662 (0,5 µM) a 37° C por 1 h. Após o tempo de incubação, as células aderidas em cada poço foram soltas do fundo com um rodo apropriado para culturas de células. Foram feitas 5 diluições seguidas de 1:10 para cada estágio e as culturas foram colocadas em placas de agar com 5% de sangue de ovelha e deixadas em estufa *overnight*. Após 24 h de incubação, o número de UFC da eliminação bacteriana total (mediada por fagocitose e netose), da eliminação bacteriana pela induzida pela fagocitose e finalmente, por netose foram contadas e comparadas com as culturas de bactérias na ausência de PMNs.

3.2.11 Coleta de cérebro para ensaios de mieloperoxidase (MPO)

Animais submetidos à CLP e tratados com ou Rosiglitazona ou veículo na presença ou ausência de GW9662 foram submetidos à inalação com isoflurano 6 h após o estímulo. Após parada respiratória total, a cavidade torácica dos animais foi aberta e a aurícula esquerda foi seccionada. Um sistema de perfusão contendo um escalpe acoplado a um frasco de solução salina com gotejador pendurado em local elevado foi posicionado no ventrículo esquerdo. Após perfusão com aproximadamente 50 mL de solução salina, foram coletadas amostras de cérebro para ensaio de atividade de MPO. As amostras de tecido foram imersas em nitrogênio líquido e em seguida foram armazenadas a -80° C até o momento do ensaio.

3.2.12 Ensaio de atividade mieloperoxidase

Após descongelado, o cérebro foi pesado e homogeneizado em solução de homogeneização (Sigma® - 100 µL de solução para cada 5 mg de tecido) no gelo. O homogenato foi centrifugado a 4000 RPM por 15 minutos a 4°C e em seguida o sobrenadante foi coletado e novamente centrifugado a 12000 RPM por 15 minutos a 4°C. Em placas de fundo chato (Falcon) foram adicionados 50 µL de solução de homogeneização + 50 µL de sobrenadante do homogenato + 50 µL de solução de o-dianisidina (0,68 mg/mL), sendo realizada a duplicata de cada amostra. A placa foi então incubada a 37°C por 15 minutos e em seguida foram adicionados 50 µL de solução de peróxido de hidrogênio (0,006%). Após mais 10 minutos de incubação a 37°C determinou-se a densidade ótica no comprimento de onda de 460 nm espectrofotômetro (Spectra Max, Molecular Devices®).

3.2.13 Dosagem de proteínas pelo método do ácido bicincônico

As proteínas do tecido cerebral foram quantificadas utilizando-se a técnica de BCA (*bicinchonic acid*, Thermo Scientific). As amostras de homogenato do tecido foi aplicadas (10 µL/poço) em uma placa de 96 poços de fundo em U (Nunc). Em seguida, diluiu-se a curva padrão (de 2 a 0,01562 mg/mL), que foi construída através de diluições seriadas a partir da albumina de soro bovino (BSA) fornecida pelo fabricante. Adicionou-se o reagente de trabalho (70 µL/poço), que foi preparado misturando-se 50 partes do reagente A e uma parte do reagente B. A placa de fundo em U foi incubada na estufa a 37°C por 30 minutos. Após o término da reação, o resultado foi lido em espectrofotômetro a 562 nm.

3.3 Drogas e soluções

Preparo de Rosiglitazona (Cayman Chemical)

As alíquotas de Rosiglitazona foram preparadas em DMSO (0,01%) e em alguns experimentos etanol (0,01%) e armazenadas a 20°C. Para o preparo das doses de tratamento, as alíquotas de Rosiglitazona foram descongeladas e diluídas em salina estéril e utilizadas imediatamente após este procedimento. A manipulação da droga foi realizada dentro da cabine de biossegurança para manutenção de sua esterilidade.

Preparo do GW9662 (Cayman Chemical)

As alíquotas de GW9662 foram preparadas em etanol estéril a 0,01%, e em cabine de segurança para manutenção da sua esterilidade e após a evaporação do etanol, as alíquotas foram armazenadas a -20° C. No momento do experimento, as alíquotas foram ressuspensas em mesma concentração de etanol e utilizadas imediatamente após este procedimento.

Preparo de solução salina tamponada por fosfato (PBS) pH = 7,4

PBS 10x:

- Na₂HPO₄ (Sigma Aldrich) 1,6 g
- NaCl (Merck) 80 g
- KH₂PO₄ (Sigma Aldrich) 2 g
- KCl (Merck) 2 g
- Água MilliQ (Millipore) q.s.p. 1L

Os sais foram dissolvidos em água MilliQ num volume de aproximadamente 800 mL. Em seguida, o pH foi corrigido no pHmêtro (Jenway) até alcançar 7,4 e o volume restante foi completado com água MilliQ.

PBS 1x:

- PBS 10x 100 mL
- Água MilliQ 900 mL

Solução de Turk

- Ácido acético glacial (Química) 10 mL
- Cristal violeta (Sigma®) 50 mg
- Água MilliQ q.s.p. 500 mL

Conjunto Panótico Rápido (Laborclin)

Constituído por Panótico rápido nº1 (solução de triarilmetano a 0,1%), Panótico rápido nº 2 (solução de xantenos a 0,1%) e Panótico rápido nº 3 (solução de tiazinas a 0,1%).

Preparo de soluções para Western Blotting

Tampão de amostra 4 x/Laemmli Buffer (0,25%):

| | |
|---|--------|
| • Solução de Tris base (Merck) 1 M pH 6,8 | 25 mL |
| • Água MilliQ | 15 mL |
| • SDS 8% | 8g |
| • Glicerol 100% (Invitrogen) | 40 mL |
| • B- mercaptoetanol (Sigma®) | 20 mL |
| • Azul de Bromofenol (Sigma®) | 250 mg |

Tampão de corrida 10x:

| | |
|-----------------------------|------------|
| • Tris base (Merck) | 30 g |
| • Glicina (ICN Biomedicals) | 144 g |
| • SDS (Sigma®) | 10 g |
| • Água MilliQ | q.s.p. 1 L |

Tampão de corrida 1x:

| | |
|-------------------------|--------|
| • Tampão de corrida 10x | 100 mL |
| • Água MilliQ | 900 mL |

Tampão de transferência 10x:

| | |
|-----------------------------|------------|
| • Tris base (Merck) | 30,3 g |
| • Glicina (ICN Biomedicals) | 144 g |
| • Água MilliQ | q.s.p. 1 L |

Tampão de transferência 1x :

| | |
|-------------------------------|--------|
| • Tampão de transferência 10x | 100 mL |
| • Metanol (Merck) | 200 mL |
| • Água MilliQ | 700 mL |

Solução salina tamponada por Tris (TBS) pH = 7,4

TBS 10x

| | |
|---------------------|-------|
| • Tris HCl (Merck) | 28 g |
| • Tris base (Merck) | 2,5 g |

- NaCl (Merck) 87,6 g
- Água MilliQ q.s.p. 1 L

TBS 1x

- TBS 10x 100 mL
- Água MilliQ 900 mL

TBS/ Tween®

- TBS 1X 1000 mL
- Tween® 20 (Sigma®) 500 µL

Preparo de soluções para o ensaio de mieloperoxidase

Solução de homogeneização:

- PBS EDTA 5 µM 100 mL
- Brometo de cetildimetil amônio (Sigma®) 0,5 g

Solução de o-dianisidina (0,68 mg/mL):

- o-dianisidina (Sigma®) 1 tablete de 10 mg
- Água MilliQ 14,7mL

A solução foi preparada imediatamente antes do uso.

Solução de peróxido de hidrogênio (0,006%):

- Peróxido de hidrogênio 30% (Merck) 1 µL
- Água MilliQ 5mL

A solução foi preparada imediatamente antes do uso.

Soluções para ELISA

Tampão de lavagem:

- PBS 1x 1L
- Tween® 20 500µL

Tampão de bloqueio:

- PBS 1x 100mL
- BSA (Sigma®) 1 g

Tampão de bloqueio + Tween® 20 :

- PBS 1x 100 mL
- BSA 1 g
- Tween® 20 50 µL

Streptavidina-peroxidase:

- Streptavidina-peroxidase (R&D) 25 µL
- Tampão de bloqueio+ Tween® 20 5 mL

A solução foi preparada imediatamente antes de seu uso.

Solução de parada (H₂SO₄ 0,4N):

- H₂SO₄ (Merck) 10,65 mL
- Água MilliQ q.s.p. 1L

3.4 Análise Estatística

Os resultados foram representados como média e erro padrão da média (EPM) e avaliados estatisticamente através da análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste *t* de Student-Neuman-Keuls (SNK) no software GraphPad Instat. Os valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos. As curvas de sobrevivência foram expressas como percentagem de camundongos vivos, observados num período de 0-144 h. Para a curva de sobrevivência foi utilizado o teste estatístico Mantel-Cox-logrank, no qual $P \leq 0,05$ foram consideradas significativas.

4. Resultados

4.1. Efeito protetor do agonista PPAR γ na sobrevida de camundongos Swiss submetidos à CLP em diferentes vias de administração

Para analisarmos papel do agonista do PPAR γ em um modelo de sepse clinicamente relevante, os animais foram submetidos ao modelo de CLP e tratados com o agonista de PPAR γ , a Rosiglitazona. Para verificar se existem diferenças na eficácia do tratamento causadas pela via de administração, tratamos os animais com Rosiglitazona na dose de 0,5 mg/kg por via i.v. ou i.p. 15 minutos após o procedimento cirúrgico. No grupo controle, foi injetado veículo por via i.v. A curva de mortalidade foi observada por um período de 144 h. Após uma semana de acompanhamento, registrou-se uma sobrevida de 30% para o grupo controle, em contraste com uma sobrevida de cerca de 50% dos animais tratados com Rosiglitazona i.p. e de 80% dos animais tratados por via i.v. O grupo de animais *sham* tiveram 100% de sobrevivência (figura 4.1).

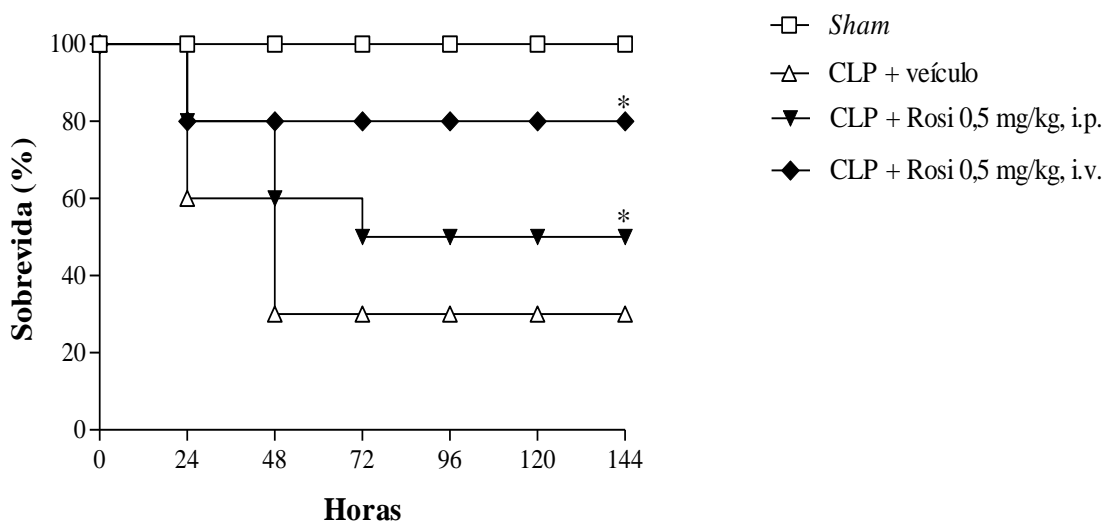


Figura 4.1: Curva de sobrevida de animais submetidos ao modelo de CLP e tratados com Rosiglitazona em diferentes vias de administração. Camundongos Swiss foram submetidos à CLP e 15 minutos depois tratados com Rosiglitazona (Rosi; 0,5 mg/kg, i.v. ou i.p.) ou veículo (controle) por via i.v. . A curva de sobrevida foi analisada por um período de 7 dias. Os dados representam 3 experimentos com um n=10 animais por grupo. (*) representa a significância estatística quando comparados ao grupo controle (CLP+veículo) (p<0,05).

4.2 Efeito do pós-tratamento com Rosiglitazona na sobrevida de camundongos *Swiss* 6 horas após o modelo CLP

Para analisarmos se o tratamento com Rosiglitazona seria capaz de melhorar a sobrevida dos animais em um modelo de sepse clinicamente relevante, animais foram tratados com Rosiglitazona (0,5 mg/kg) por via i.v. ou i.p. 6 h após o procedimento CLP. A sobrevida foi avaliada em um período de 7 dias.

Os camundongos tratados com salina e submetidos à CLP tiveram uma taxa de sobrevida de 20%. Porém, o pós-tratamento com Rosiglitazona por ambas as vias de administração, em animais sépticos foi capaz de melhorar a sobrevida dos animais de forma relevante, com taxa de sobrevida de 70% em ambas as vias de administração. Os animais *sham* operados foram usados como controle (figura 4.2).

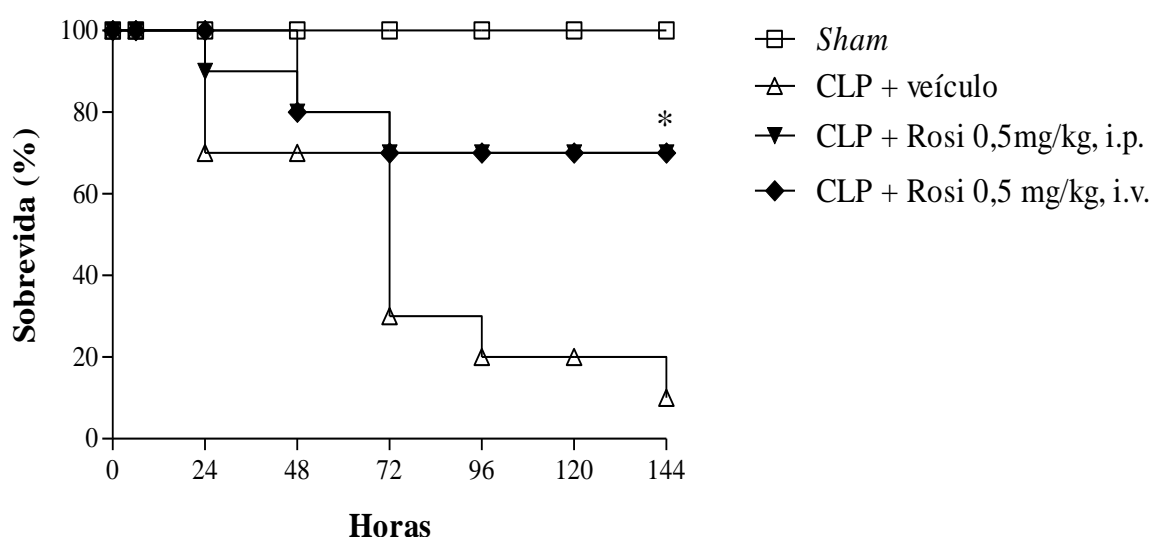


Figura 4.2: Efeito do pós-tratamento com Rosiglitazona na sobrevida de animais 6 h após o modelo CLP. Camundongos *Swiss* foram submetidos à CLP e 6 h depois tratados com Rosiglitazona (Rosi; 0,5 mg/kg, i.v. ou i.p.) ou veículo (controle). A curva de sobrevida foi analisada por um período de 7 dias. Os dados representam 3 experimentos com um n=10 animais por grupo. (*) representa a significância estatística quando comparados ao grupo controle (CLP + veículo) ($p < 0,05$).

4.3 Efeito da Rosiglitazona na sobrevida de animais submetidos ao modelo de macerado fecal

Nesta parte do estudo avaliamos se o tratamento com Rosiglitazona seria capaz de melhorar a sobrevida dos animais em um modelo de sepse severa. Para tanto utilizamos um modelo de injeção de fezes. Animais foram tratados com Rosiglitazona (0,5 mg/kg) ou veículo por via i.v. 15 minutos após o procedimento. A sobrevida foi avaliada em um período de 0 a 144 h. Os camundongos *Swiss* tratados com salina e submetidos ao modelo de injeção de fezes tiveram uma taxa de sobrevida de 5%. Porém, o tratamento com Rosiglitazona em animais sépticos foi capaz de melhorar a sobrevida dos animais, com taxa de sobrevida de 50%. Os animais controles observou-se uma sobrevivência de 100% foram usados como controle (figura 4.3).

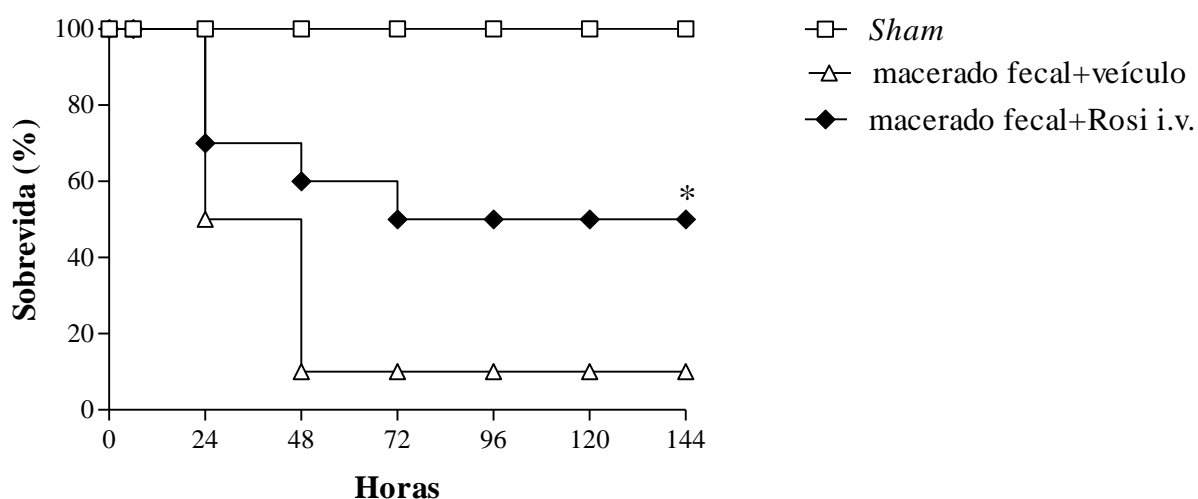


Figura 4.3: Efeito do tratamento com Rosiglitazona na sobrevida de animais em modelo de sepse severa. Camundongos *Swiss* foram submetidos ao modelo de macerado fecal e 15 minutos depois foram tratados com Rosiglitazona (Rosi; 0,5 mg/kg, i.v.) ou veículo (controle). A curva de sobrevida foi analisada por um período de 0 a 144 h. Os dados representam 3 experimentos com um n=10 animais por grupo. (*) representa a significância estatística quando comparados ao grupo (CLP + veículo) ($p < 0,05$).

4.4 Efeito da Rosiglitazona no escore clínico de severidade de sepse em camundongos *Swiss* submetidos à CLP

Para avaliar a gravidade da sepse nos animais, fizemos um escore ou pontuação dos sinais clínicos 24 h após o CLP. Quanto maior o escore, mais doente o animal se encontra e maior a gravidade da sepse. Os animais *sham* e os *sham* tratados com Rosiglitazona ou GW9662, tiveram um escore clínico de zero, mostrando que a manipulação cirúrgica dos animais, o anestésico e o tratamento com agonista e antagonista de PPAR γ por si só, não afetaram o quadro clínico dos animais. No entanto, 24 h após o CLP, os animais que receberam veículo já apresentavam um escore que indicava sepse moderada, assim como o grupo CLP tratados com GW9662. Todavia, o tratamento com Rosiglitazona foi capaz de reduzir significativamente esse escore. Nos animais submetidos à CLP e tratados com GW9662 e Rosiglitazona, observamos uma reversão da proteção conferida pela Rosiglitazona (Figura 4.4).

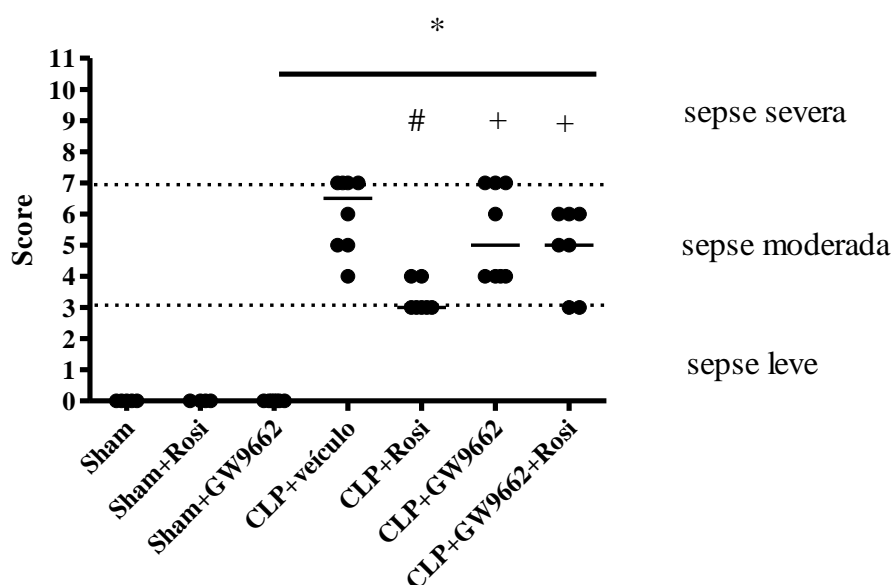


Figura 4.4: Efeito da Rosiglitazona sobre o escore clínico de gravidade de camundongos *Swiss* submetidos à CLP. Camundongos *Swiss* foram submetidos à CLP tratados os não com Rosiglitazona ou GW9662 e 24 h depois foi feita a análise do escore clínico. Dados representados como média (n= 10/grupo). (*) representa diferença estatística em relação aos grupos *sham*, *sham*+Rosi e *sham*+GW9662. (#) representa a significância em relação ao grupo CLP e (+) com relação ao grupo CLP+Rosi (p<0,05).

4.5 Análise da celularidade do lavado peritoneal e sangue de animais *Swiss* submetidos à CLP

Os neutrófilos são células possuem um papel crucial na defesa contra infecções bacterianas, incluindo a sepse. Estas células envolvidas na eliminação de microorganismos por causa do seu amplo estoque de enzimas proteolíticas e sua rápida produção de espécies reativas de oxigênio (109).

Fomos investigar o papel da Rosiglitazona na resposta inflamatória induzida pela infecção microbiana induzida pelo CLP e analisamos o perfil de leucocitário de amostras de lavados peritoneais e sangue periférico dos animais. Para tal, camundongos *Swiss* foram operados e tratados com Rosiglitazona (0,5 mg/kg) por via i.v. 15 minutos após o procedimento cirúrgico, enquanto o grupo controle recebeu veículo. Após 24 h, os animais tiveram amostras de sangue e lavado peritoneal recolhidas para contagem de leucócitos totais e determinação da contagem diferencial. As análises da celularidade do lavado peritoneal mostrado na figura 4.5A, demonstraram um aumento significativo no número de leucócitos totais nos animais submetidos à CLP tratados com veículo quando comparados com o grupo *sham*. Este aumento correspondeu ao aumento do número de neutrófilos, não havendo diferença significativa nas células mononucleares entre os grupos. O tratamento com Rosiglitazona foi eficaz em reduzir o número de leucócitos totais, assim como o número de neutrófilos no lavado peritoneal quando comparados com o grupo CLP+veículo. A figura 4.5B mostra que houve um aumento no número de leucócitos circulantes no sangue periférico dos animais submetidos à CLP+veículo comparados ao grupo *sham*. No entanto, o tratamento com Rosiglitazona não alterou o perfil do número destas células de forma significativa quando comparados com o grupo *sham*.

A

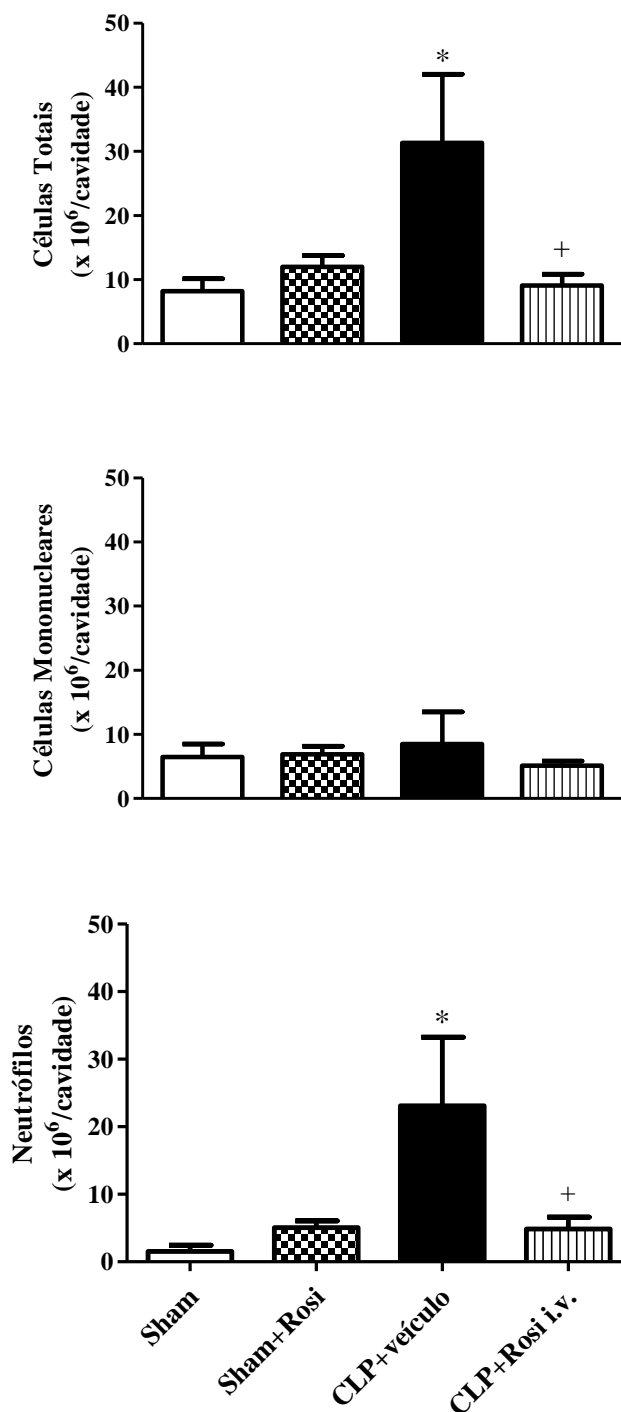


Figura 4.5A: Análise da celularidade de amostras do lavado peritoneal de camundongos tratados com Rosiglitazona. Camundongos *Swiss* submetidos à CLP receberam tratamento com Rosiglitazona (Rosi; 0,5 mg/kg i.v.) ou veículo no controle, 15 minutos após a operação. 24 h após o procedimento, o lavado peritoneal recolhido para a análise da celularidade. Os dados representam a média \pm E.P.M. (n=10/grupo). (*) $p < 0,05$ em relação ao grupo *sham* e (+) representa a diferença estatística quando em relação ao grupo CLP+veículo.

B

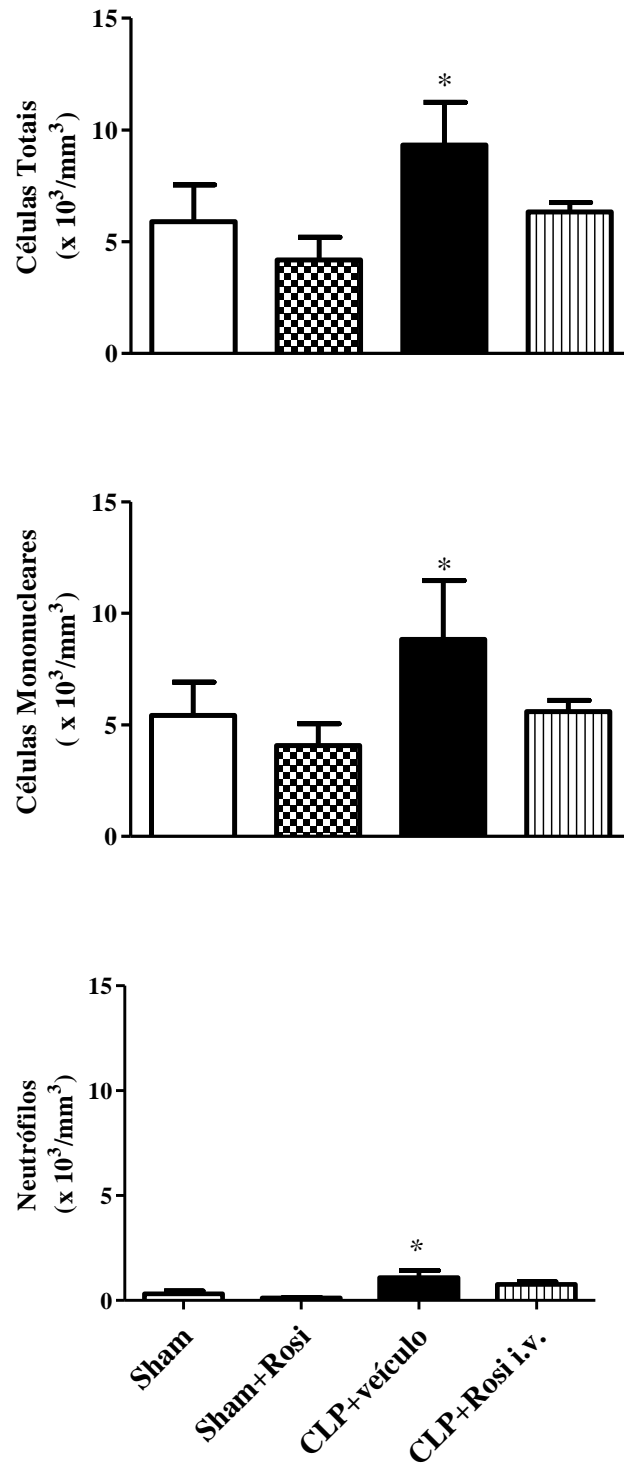


Figura 4.5B: Análise da celularidade de amostras do sangue de camundongos tratados com Rosiglitazona. Camundongos *Swiss* submetidos à CLP receberam tratamento com Rosiglitazona (Rosi; 0,5 mg/kg i.v.) ou veículo no controle, 15 minutos após a operação. Vinte e quatro horas após o procedimento, amostras de sangue foram recolhidas para a análise da celularidade. Os dados representam a média \pm E.P.M. (n=10/grupo). (*) $p < 0,05$ em relação ao grupo *sham*.

4.6 Efeito da Rosiglitazona sobre a produção de citocinas do lavado peritoneal

Estudos prévios tem demonstrado um relevante papel de quimiocinas e citocinas pró- e anti-inflamatórias na patogênese da sepse. Macrófagos, neutrófilos e outras células da resposta imune inata quando reconhecem produtos bacterianos através de receptores expressos em suas superfícies, liberam vários mediadores inflamatórios, entre esses as citocinas e quimiocinas. Estes mediadores atuam promovendo ativação celular e maior recrutamento de leucócitos para o tecido (9). Desta forma, resolvemos investigar se o tratamento com Rosiglitazona poderia alterar o padrão de produção de algumas citocinas importantes na sepse. Os animais foram submetidos à CLP tratados com Rosiglitazona ou veículo (grupo controle) 15 minutos após o procedimento cirúrgico. Após 24 h, o lavado peritoneal coletado, centrifugado para a retirada do lavado livre de células, e quimiocinas como CCL2, CXCL1 e citocinas como IL-10, IL-6 e TNF- α foram dosadas através do método ELISA.

Os animais que receberam veículo e foram submetidos à CLP tiveram, como esperado, produziram mais TNF- α , IL-6, e IL-10. O tratamento com Rosiglitazona foi capaz de reduzir a produção de TNF- α e de IL-6 e aumentou os níveis de IL-10, quando comparado com animais que receberam veículo e foram submetidos à CLP (figura 4.6 A, B e C, respectivamente). Além disso, após o CLP observamos um aumento na secreção da quimiocina CCL2, mas não na produção de CXCL1 quando comparados com o grupo sham e *sham*+Rosiglitazona. O tratamento com Rosiglitazona nos animais submetidos à CLP foi capaz de induzir um aumento na secreção destas quimiocinas quando comparado ao grupo CLP+veículo (figura 4.6 D e E).

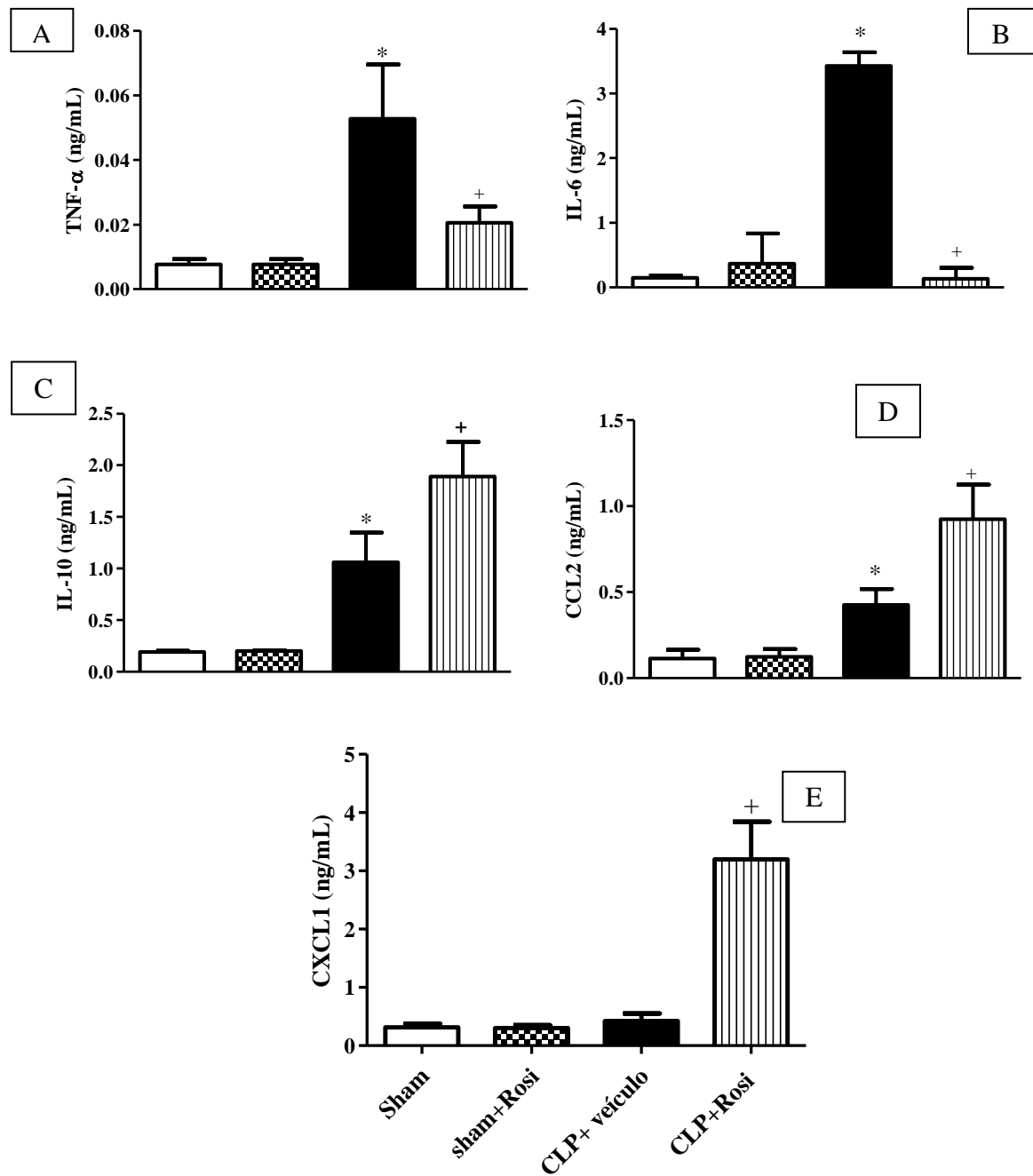


Figura 4.6: Efeito da Rosiglitazona na produção de citocinas no peritônio de animais submetidos à CLP. Camundongos *Swiss* foram submetidos à CLP e foram tratados com Rosiglitazona (Rosi; 0,5 mg/kg , i.v.) ou veículo, no grupo controle, 15 minutos após a operação. Vinte e quatro horas após o procedimento, o lavado peritoneal foi recolhido. Nos lavados livres de células foram determinados a produção de TNF- α (A), IL-6 (B), IL-10 (C) CCL2 (D) e CXCL1 (E). Os dados representam 3 experimentos com lavados de 10 animais em cada grupo. Os resultados representam a média \pm E.P.M (n=10/por grupo). (*) $p < 0,05$ em relação ao grupo *sham* e *sham+Rosi*, enquanto que o (+) representa a diferença estatística quando comparados ao grupo CLP+veículo.

4.7 Quantificação de UFC no lavado peritoneal de animais *Swiss* submetidos à CLP

Nestes experimentos, investigamos o efeito do tratamento com Rosiglitazona na carga bacteriana presente na cavidade peritoneal de animais submetidos à CLP. Para isso, camundongos *Swiss* operados e tratados com Rosiglitazona (0,5 mg/kg, i.v.) ou veículo nos animais controles, 15 minutos após o procedimento cirúrgico. Vinte e quatro horas após, tiveram amostras de lavado peritoneal recolhidas para determinação das UFC. Como podemos observar na figura 4.7 A e B, o tratamento Rosiglitazona levou a redução na carga bacteriana presente no lavado peritoneal, quando comparadas ao grupo de animais CLP+ veículo.

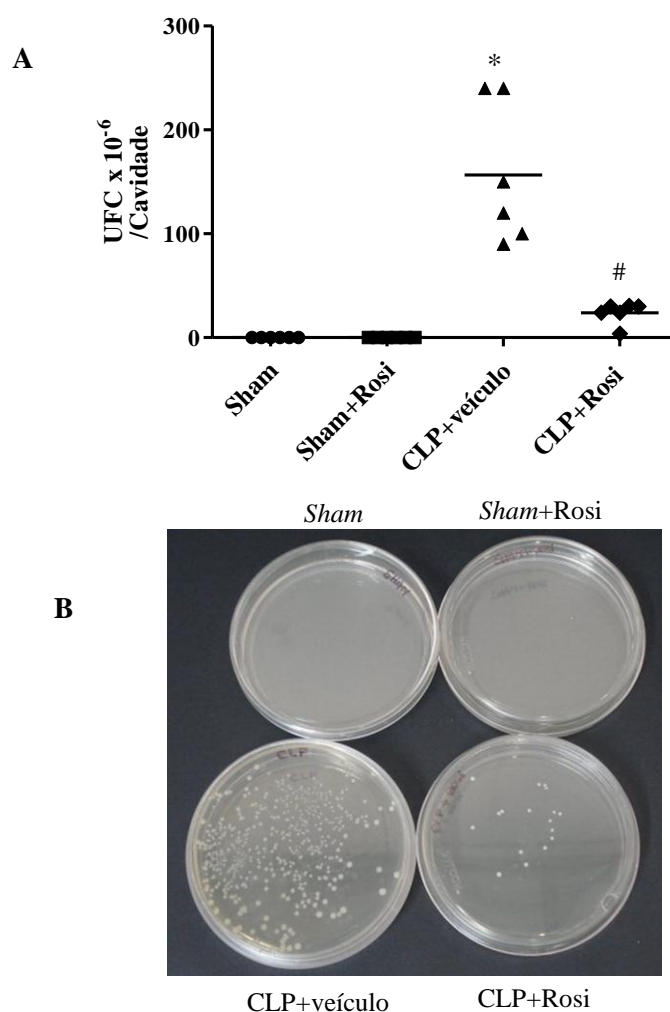


Figura 4.7 - Efeito do agonista de PPAR γ Rosiglitazona sobre a carga bacteriana presente na cavidade peritoneal de animais submetidos à CLP. Camundongos *Swiss* submetidos à CLP e tratados com Rosiglitazona (Rosi; 0,5 mg/kg, i.v.) ou veículo no controle, 15 minutos após a cirurgia. Vinte e quatro horas após a indução de sepse, alíquotas do lavado peritoneal foram plaqueadas para análise de UFC. (A) Contagem manual de UFC (B) Foto representativa do gráfico exposto, de pelo menos, 4 animais por grupo. Os dados representam 3 experimentos com um n=10 animais para cada grupo. (*) p< 0,05 em relação ao grupo *sham*; (+) p< 0,05 em relação ao grupo CLP + veículo.

4.8 Avaliação da biogênese de corpúsculo lipídicos em leucócitos de animais submetidos à CLP

Os corpúsculos lipídicos são inclusões citoplasmáticas ricas em lipídeos presentes na maioria de células eucarióticas e são considerados marcadores estruturais de células inflamatórias em várias patologias, e estão presentes na maioria das células eucarióticas (202). Nos leucócitos, a sua produção se mostra regulada durante processos inflamatórios, e por componentes microbianos, como o LPS (39).

Investigamos a biogênese de corpúsculos nos leucócitos de animais 24 h após o CLP, tratados ou não com Rosiglitazona (0,5mg/kg, i.v.) 15 min após o procedimento cirúrgico. Foi observado um aumento do número de corpúsculos lipídicos de células recolhidas do lavado peritoneal após o CLP quando comparados com o grupo *sham*. O tratamento com Rosiglitazona foi eficaz em reduzir efetivamente os números destas organelas quando comparados com o grupo CLP+veículo, mostrando uma importante atividade anti-inflamatória da Rosiglitazona (figura 4.8).

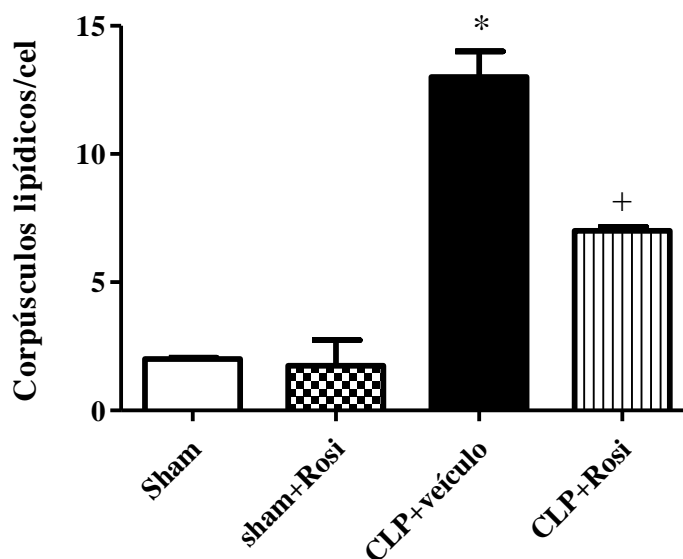


Figura 4.8: Efeitos da Rosiglitazona sobre a biogênese de corpúsculos lipídicos no peritônio de camundongos *Swiss* submetidos à CLP. Camundongos *Swiss* submetidos à CLP foram tratados com Rosiglitazona (Rosi; 5 mg/kg) ou veículo 15 min após CLP. Após 24 h, a biogênese dos corpúsculos lipídicos foi analisada de células peritoneais destes animais. Dados de 3 experimentos distintos representados como média \pm E.P.M. (n=10/grupo). (*) $p < 0,05$ em relação ao grupo *sham* e (+) com relação ao grupo CLP+veículo.

4.9 Efeito da Rosiglitazona na glicemia em animais submetidos à CLP

As Tiazolidinedionas (TZD), popularmente conhecidas como glitazonas, são drogas amplamente utilizadas no tratamento do diabetes tipo 2 (DM tipo 2), resultando em melhora de parâmetros glicêmicos e metabólicos dos pacientes (191). Desta forma, foi avaliado em nosso estudo, se a Rosiglitazona poderia interferir nas glicemia de animais submetidos à CLP. Para tanto, animais foram submetidos à CLP e 24 h após a sua glicemia foi avaliada dos mesmos. No grupo CLP tratados com veículo observamos uma redução da glicemia quando comparados com os animais *sham* e *sham*+Rosiglitazona. No entanto, o tratamento com Rosiglitazona em animais submetidos à CLP+veículo não observamos alteração da hipoglicemia induzida pelo CLP (figura 4.9).

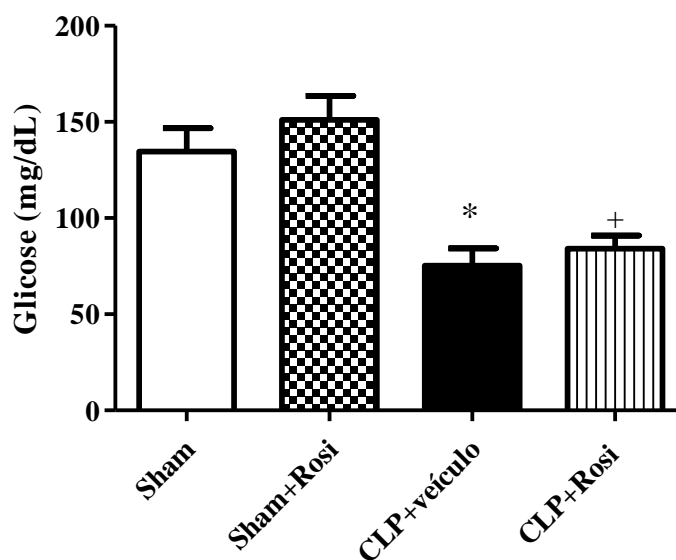


Figura 4.9: Efeito da Rosiglitazona na glicemia de animais submetidos à CLP. Os animais foram submetidos à CLP e receberam tratamento com Rosiglitazona (Rosi; 0,5mg/kg) ou veículo (grupo controle) por via i.v., 15 minutos após a cirurgia. Vinte e quatro horas após o procedimento, amostras de sangue caudal foram recolhidos para a dosagem glicose. (*) $p < 0,05$ com relação ao grupo *sham* e *sham*+Rosi e (+) $p < 0,05$ com relação ao grupo CLP+veículo.

4.10 Efeito da Rosiglitazona na microcirculação cerebral de camundongos *Swiss* submetidos à CLP

4.10.1 Efeito da Rosiglitazona na interação leucócito-endotélio na microcirculação cerebral

A microcirculação regula o balanço entre a demanda de oxigênio e o suprimento deste para as células do parênquima, além de ter um importante papel na regulação da hemodinâmica corporal. Alterações microcirculatórias podem exercer um papel crucial na patogênese da sepse relacionada com a disfunção orgânica (203). Já foi demonstrado em modelo experimental com animais, que em infecção cerebral causada por *Staphylococcus aureus* e o tratamento com agonistas de PPAR γ atenuam a inflamação e limitam a disseminação bacteriana (204).

Tendo base nestas informações resolvemos investigar se a Rosiglitazona reduz a resposta inflamatória em animais submetidos à CLP, tanto modulando a interação celular leucócito-endotélio, assim como a densidade capilar funcional, melhorando desta forma, a microcirculação cerebral.

Nesta parte do estudo, foram analisados tanto o rolamento (*rolling*), quanto a aderência de leucócitos no endotélio vascular, da microcirculação cerebral de animais após CLP. Para isto, animais foram submetidos à CLP e 24 h após a sua microcirculação cerebral foi acessada por microscopia intravital e a interação leucócito-endotélio analisada por 30 segundos. Como observado, o grupo de animais submetidos à CLP houve um aumento nesses dois parâmetros quando comparados com o grupo *sham* tratados com veículo ou com Rosiglitazona (figuras 4.10.1A e 4.10.1B). O tratamento com Rosiglitazona diminuiu tanto o *rolling* quanto a adesão na microcirculação cerebral (figuras 4.10.1A e 4.10.1B). No entanto, o tratamento com GW9662 aboliu o efeito protetor da Rosiglitazona como mostra nas figuras 4.10.1A e 4.10.1B.

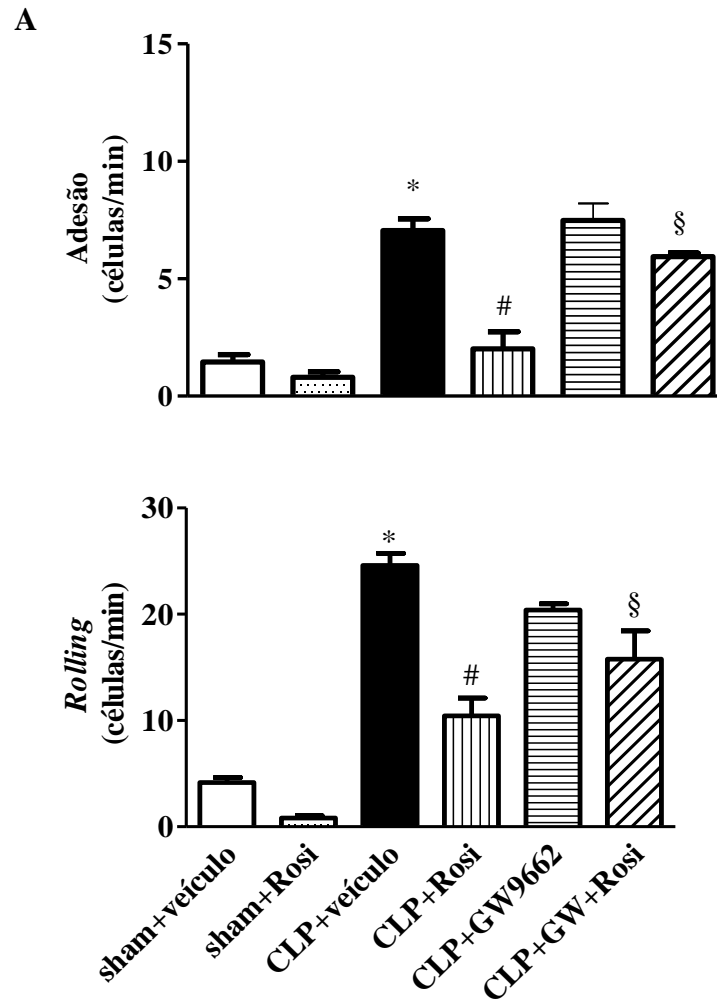


Figura 4.10.1A: Envolvimento da Rosiglitazona na interação leucócito-endotélio na microcirculação cerebral de animais sépticos. Camundongos *Swiss* foram submetidos à CLP e 24 h após foi observada a interação leucócito-endotélio por 30 segundos em microscopia intravital. Os dados foram expressos como média \pm EPM (n=8/grupo). * $p < 0,05$ vs. *sham* + veículo e *sham*+Rosi; # $p < 0,05$ vs. CLP + veículo; § $p < 0,05$ vs. CLP + Rosi.

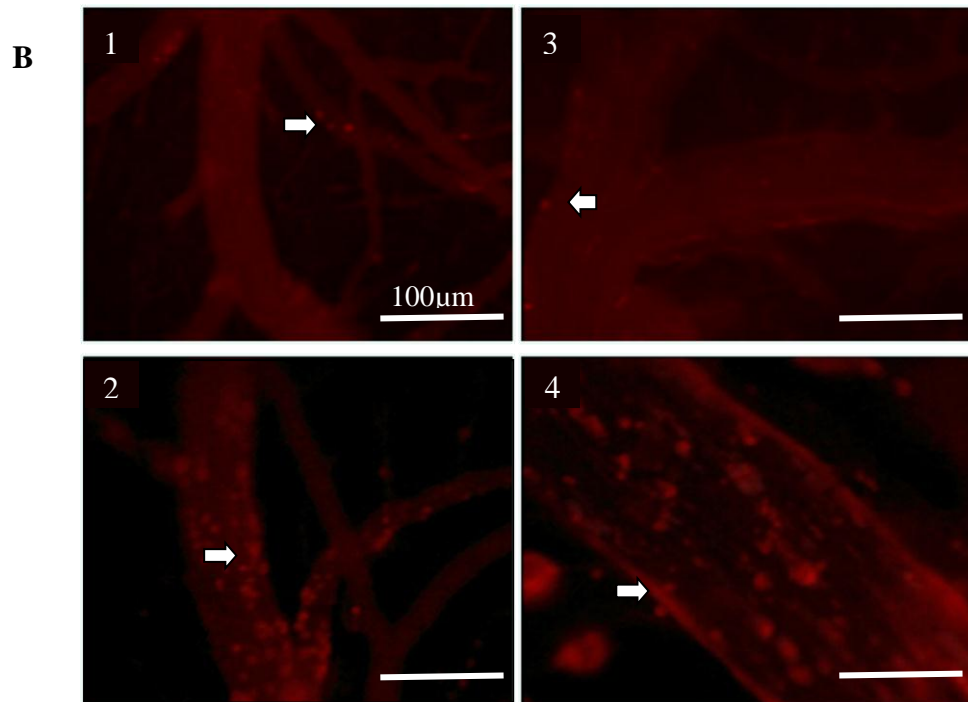


Figura 4.10.1B: Fotomicrografias da microcirculação cerebral em camundongos *Swiss* submetidos à CLP. As imagens representam os leucócitos aderidos e em rolamento marcados com rodamina (como indicado pela seta) do grupo *sham* tratados com Rosiglitazona (1), grupo CLP tratados com veículo (2), grupo CLP tratados com Rosiglitazona (3) e do grupo CLP tratados com GW9662 + Rosiglitazona (4). A interação leucócito-endotélio foi observada durante 30s em 4 campos distintos. Ampliação de 200x. As imagens são representativas de 3 experimentos diferentes (n=8/grupo).

4.11 Efeito do tratamento com Rosiglitazona sobre a atividade de mieloperoxidase no tecido cerebral de animais após CLP

Para avaliar os efeitos da sepse na microvasculatura cerebral e no infiltrado de leucócitos no tecido, foi feita a medida da atividade da mieloperoxidase (MPO), um importante marcador de ativação de neutrófilos. Observamos que houve um aumento na atividade da MPO 24 h após CLP. O tratamento com Rosiglitazona (0,5 mg/kg) diminuiu este efeito quando comparados com o grupo CLP+veículo, correlacionando com o dado anterior referente à diminuição do *rolling* e da adesão de leucócitos no endotélio vascular cerebral (figura 4.11).

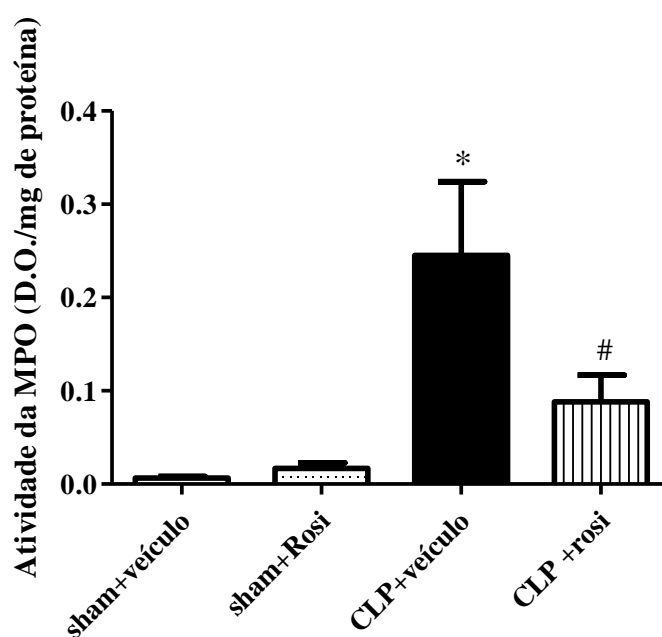


Figura 4.11: Efeito do tratamento com Rosiglitazona sobre a atividade de mieloperoxidase (MPO) cerebral de camundongos Swiss submetidos à CLP. Camundongos Swiss foram submetidos à CLP e 15 min após tratados com Rosiglitazona (Rosi; 5 mg/kg, i.v.) ou veículo. Vinte e quatro horas depois do procedimento cirúrgico foram coletadas amostras de tecido cerebral perfundido, para o ensaio de MPO. Dados representados como média \pm E.P.M. (n= 8). * $p < 0,05$ vs. *Sham* + veículo; # $p < 0,05$ vs. CLP + veículo.

4.12 Efeito da Rosiglitazona na densidade capilar funcional na microcirculação cerebral durante a sepse

Um fluxo sanguíneo adequado nos capilares é um pré requisito para a perfusão normal de um órgão e sua função. A principal função dos capilares é permitir a troca de nutrientes entre os tecidos e o sangue. A densidade capilar funcional (DCF) é definida como o número de capilares perfundidos espontaneamente e que são responsivos à vasodilatação (203).

Nesta parte do trabalho resolvemos investigar se a Rosiglitazona poderia interferir com um aumento na DCF, levando portanto à melhora na perfusão tecidual cerebral. Para isto, animais foram submetidos à CLP e 24 h após a sua microcirculação cerebral foi acessada por microscopia intravital e o número de capilares perfundidos foram contados por 1 min cada campo (4 campos diferentes), totalizando um período de 4 min. Os animais submetidos à CLP tiveram uma diminuição significativa no número de capilares perfundidos (rarefação capilar) quando comparados com o grupos controles (*sham*+veículo e *sham*+Rosi), respectivamente. O tratamento com Rosiglitazona após CLP reverteu a rarefação capilar quando comparado com o grupo CLP que recebeu o veículo. O efeito protetor da Rosiglitazona foi completamente abolido na presença do antagonista GW9662, enquanto que o GW9662 por si só não teve nenhum impacto na densidade capilar cerebral de animais sépticos (figuras 4.12A e 4.12B).

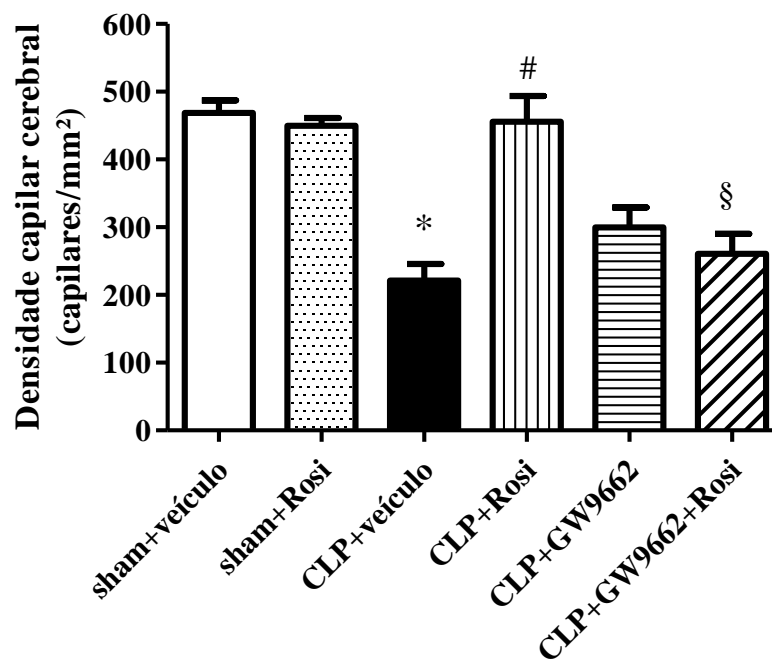


Figure 4.12A: Efeito da Rosiglitazona na densidade capilar funcional na microcirculação cerebral. Camundongos Swiss foram submetidos à CLP e 24 h após foi observada a microcirculação cerebral por microscopia intravital. Os dados foram expressos como média \pm E.P.M. (n=8/grupo). * $P < 0.05$ vs. *Sham* + veículo e *sham*+Rosi; # $P < 0.05$ vs. CLP + veículo; § $p < 0,05$ vs. CLP + Rosiglitazona.

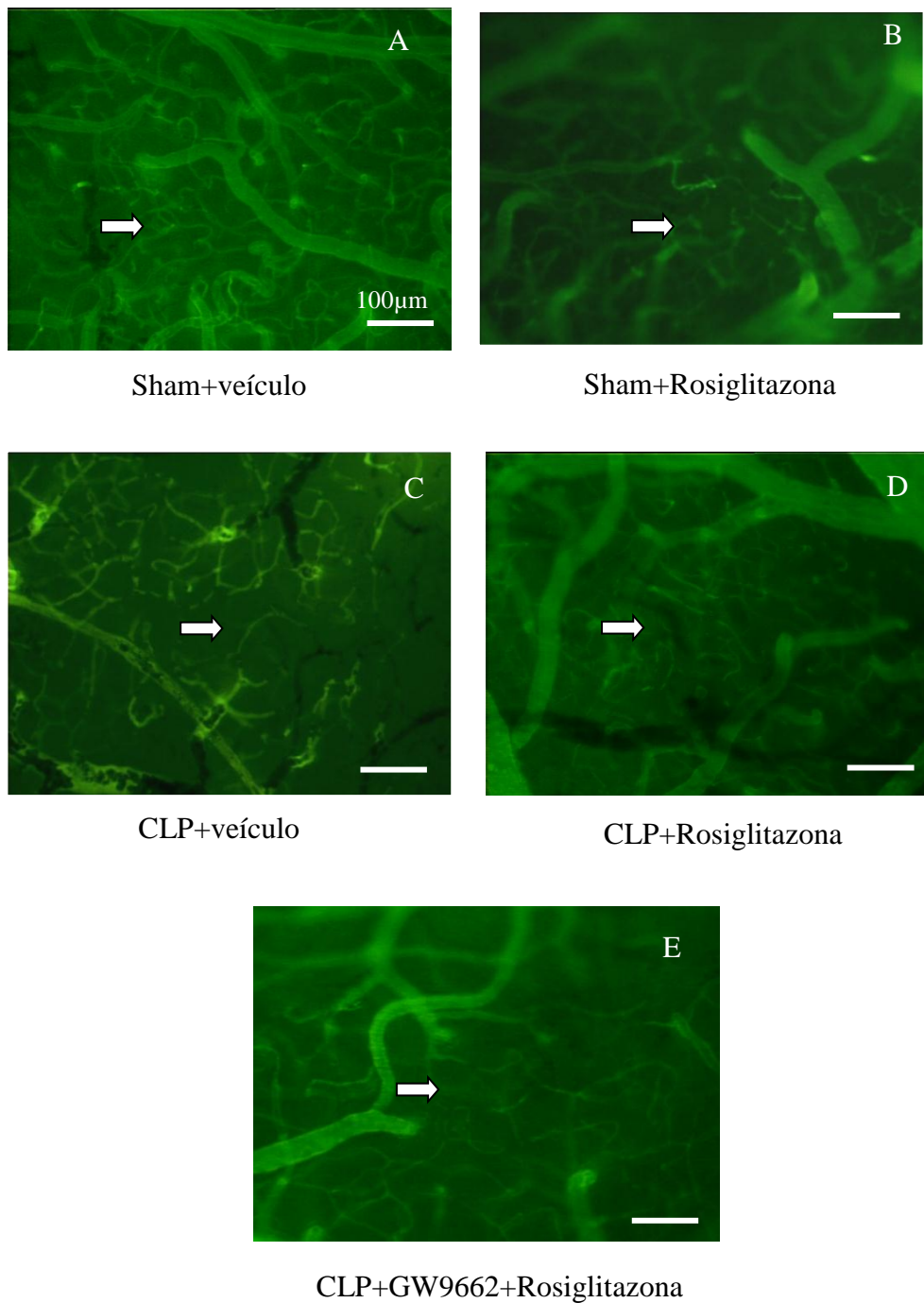


Figura 4.12B: Efeito da Rosiglitazona na microcirculação cerebral em camundongos *Swiss* submetidos à CLP. Camundongos *Swiss* foram submetidos à CLP e 24 h após tiveram a microcirculação cerebral analisada por microscopia intravital. As imagens representam a densidade capilar funcional de capilares marcados FICT-dextran. Os capilares perfundidos (indicado nas setas) foram observados por 1 min para cada campo (4 campos diferentes). O grupo *sham* tratados com veículo (A), grupo *sham*+Rosiglitazona (B), grupo CLP+veículo (C), grupo CLP+Rosiglitazona (D) e o grupo CLP+GW9662+Rosiglitazona (E). Ampliação de 100x. As imagens são representativas de 3 experimentos diferentes (n=8/grupo).

4.13 O efeito da Rosiglitazona na microcirculação cerebral não depende das alterações na pressão arterial e frequência cardíaca de animais sépticos

De maneira a investigar se o efeito protetor da Rosiglitazona na rarefação capilar em animais submetidos à CLP era um mecanismo dependente das alterações das medidas hemodinâmicas, analisamos a pressão arterial e a frequência cardíaca de animais sépticos. Para isto, animais foram submetidos à CLP e 24 h após tiveram a microcirculação acessada por microscopia intravital e a pressão arterial e frequência cardíaca foram monitoradas através de cateter na artéria carótida.

A tabela 1 mostra que não houve alterações significativas nos parâmetros hemodinâmicos no grupo que recebeu veículo, no grupo CLP ou no grupo tratado com Rosiglitazona.

Tabela 1: Efeito da Rosiglitazona e GW9662 na pressão arterial média e frequência cardíaca 24 h após CLP

| Parâmetros | Tratamentos | | | | | |
|------------------------|--------------------------|------------------------------|------------------|------------------------|-----------------|------------------------------------|
| | <i>Sham</i> + veículo | <i>Sham</i> + Roglitazona | CLP + veículo | CLP + Rosiglitazona | CLP + GW9662 | CLP + GW9662 + Rosiglitazona |
| Pressão arterial média | 86 ± 5 | 98 ± 8 | 68 ± 8 | 74 ± 10 | 89 ± 3 | 91 ± 7 |
| Frequência cardíaca | 400 ± 19 | 437 ± 15 | 338 ± 22 | 453 ± 20 | 437 ± 13 | 409 ± 14 |

Cada valor representa a média ± E.P.M. de oito animais para cada grupo ($p > 0.05$). Camundongos *Swiss* submetidos à CLP foram tratados com veículo (DMSO) ou Rosiglitazona (0,5 mg/kg) ou GW9662 (1 mg/kg) por injeção i.v. Os animais *sham* receberam veículo como grupo controle.

4.14 Efeitos diretos dos ligantes de PPAR γ no crescimento bacteriano

O intestino é o maior e mais complexo ambiente num hospedeiro mamífero. O trato gastrointestinal abriga uma grande quantidade e variedade de bactérias, sendo que a maior parte da flora habita o cólon (10^{11} - 10^{12} bactérias/mL) (205). A peritonite que se segue à introdução da flora entérica na cavidade peritoneal se dá geralmente como uma infecção polimicrobiana sinérgica. Uma flora mista de organismos pode ser recuperada após a ruptura do apêndice, na qual as bactérias predominantes são *E. coli*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella spp.* e *Enterobacter spp.* (206).

No nosso estudo resolvemos investigar a ação direta de ligantes de PPAR γ no crescimento de *E.coli in vitro*. Para isso, bactérias foram incubadas durante 2 h na presença do agonista de PPAR γ Rosiglitazona ou de seu antagonista GW9662 nas concentrações de 10, 1,0 ou 0,1 μ M. No grupo controle, as bactérias foram incubadas com veículo (DMSO 0,01%).

Como podemos observar na figura 4.14, apesar da tendência, o aumento de crescimento bacteriano representado UFC causado pela presença de Rosiglitazona, não foi considerado estatisticamente significativo, indicando que o mecanismo envolvido na proteção pelo tratamento com Rosiglitazona após a indução de sepse, não é um efeito direto da droga sobre a bactéria *E. coli*.

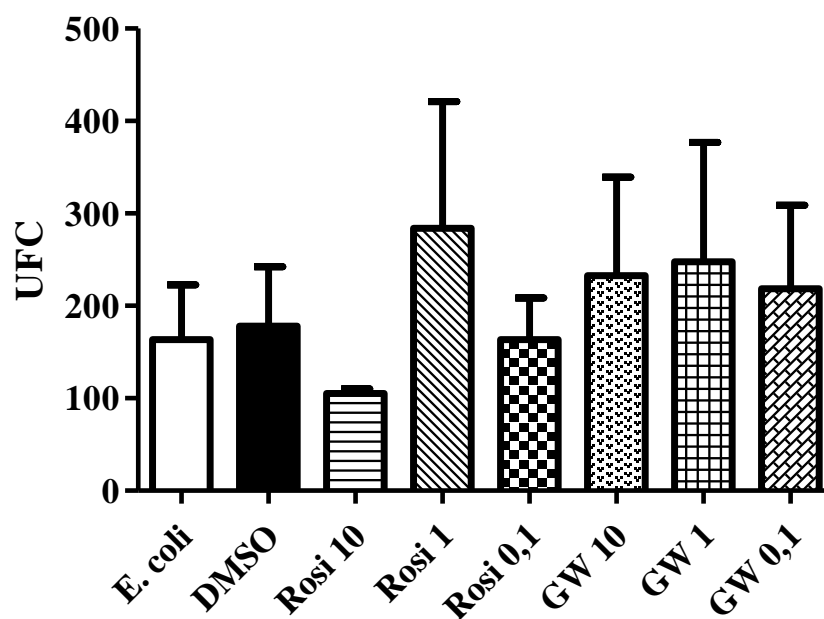


Figura 4.14 : Efeito direto de ligantes de PPAR γ no crescimento de *E. coli*. Bactérias *E. coli* (10^5 /mL) foram incubadas durante 2 h na presença do agonista de PPAR γ , a Rosiglitazona ou do antagonista, o GW9662 nas concentrações de 10, 1 ou 0,1 μ M. Não houve diferença estatística entre as contagens de UFC entre os grupos analisados ($p > 0,05$ pelo teste Neuwman-Keuls-Student).

4.15 Efeito da Rosiglitazona na liberação de óxido nítrico na cavidade peritoneal de animais submetidos à CLP

O óxido nítrico (NO) é um importante elemento da resposta imune, principalmente por ser um potente mediador na eliminação contra diversos patógenos, desempenhando portanto, um importante papel durante a sepse (91).

Como descrito previamente em nossos resultados, o tratamento com Rosiglitazona foi capaz de reduzir significativamente a carga bacteriana da cavidade peritoneal em animais submetidos à CLP. A partir deste dado, resolvemos investigar se o tratamento com Rosiglitazona é capaz de interferir na produção de NO nesta cavidade. Para tanto, foi utilizado o lavado peritoneal livre de células de animais submetidos à CLP tratados com veículo ou Rosiglitazona. Observou-se que animais tratados com veículo e submetidos à CLP tiveram um aumento na produção de NO quando comparados com os animais *sham*. No entanto, o tratamento com Rosiglitazona, nos animais submetidos à CLP, não alterou significativamente a produção deste mediador no nosso modelo (figura 4.15).

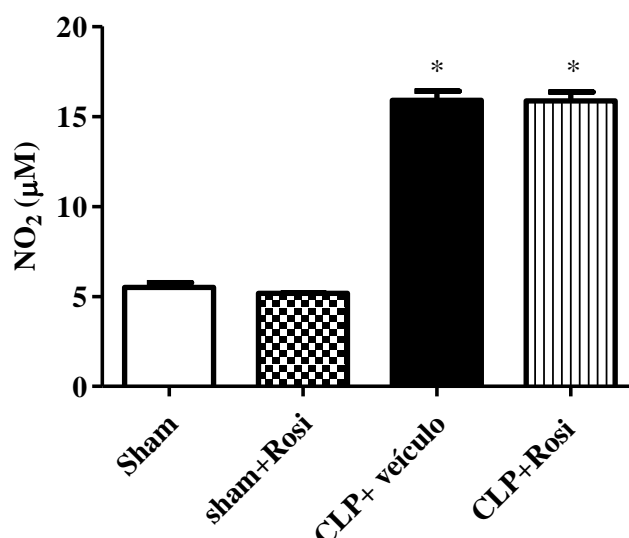


Figura 4.15: Níveis do óxido nítrico (NO) no lavado peritoneal de animais tratados com Rosiglitazona submetidos à CLP. Os animais foram submetidos à CLP e receberam tratamento com Rosiglitazona (Rosi; 0,5mg/kg, i.v.) ou veículo (grupo controle) por via i.v., 15 minutos após a cirurgia. Vinte e quatro horas após o procedimento, o lavado peritoneal foi recolhido para a dosagem de óxido nítrico. Os dados representam um experimento com sobrenadante de n=6 para cada grupo. Os resultados representam a média ± E.P.M. O asterístico (*) representa diferença significativa quando comparadas ao grupo *sham*, com um p<0,05

4.16 O tratamento com Rosiglitazona aumenta a produção de espécie reativa de oxigênio em células de animais submetidos à CLP:

Durante a sepse, algumas células da resposta imune, como por exemplo, os neutrófilos produzem grandes quantidades de espécies reativas de oxigênio (ROS) que funcionam como um potente agente antimicrobiano (109). A partir disto, analisamos o papel da Rosiglitazona na produção de espécies reativas de oxigênio em experimento *in vitro*. Foram recolhidas amostras de sangue de cada animal 4 horas após a cirurgia. As amostras foram então incubadas na presença ou ausência de Rosiglitazona (5 μ M) durante 1 h antes do ensaio do estresse oxidativo. Para a medida intracelular de ROS foi utilizada dihidrorodamina 123 (DHR). A DHR é um corante fluorogênico que se difunde passivamente através da membrana celular, e que após a interação com radicais livres (metabólitos tóxicos do oxigênio como o ânion superóxido ou o peróxido de hidrogênio - H₂O₂) se transforma em rodamina 123 (R123) que é fluorescente, permitindo desta forma, o estudo do metabolismo oxidativo. A quantificação de H₂O₂ nos leucócitos foi medida 15 minutos na ausência ou na presença de PMA 37°C, que causa uma acentuada estimulação em todos os aspectos do metabolismo oxidativo associada à fagocitose. Em seguida, o sangue foi incubado por mais 15 minutos com DHR a 37°C, na presença de catalase bovina. A catalase, formalmente denominada hidroxiperoxidase, é uma enzima intracelular que decompõe o H₂O₂. Como podemos observar na figura 4.16, as células obtidas dos animais submetidos à CLP na presença de PMA obtiveram um aumento na produção de H₂O₂ intracelular quando comparados com as células obtidas dos animais *sham*. De forma interessante, o tratamento com Rosiglitazona nas células de animais submetidos à CLP aumentou a produção de H₂O₂ tanto na ausência quanto na presença de PMA quando comparados às células do grupo CLP+veículo ou CLP+PMA. A Rosiglitazona nas células dos animais sépticos é capaz de aumentar o efeito pró-oxidativo de forma mais acentuada do que o próprio PMA.

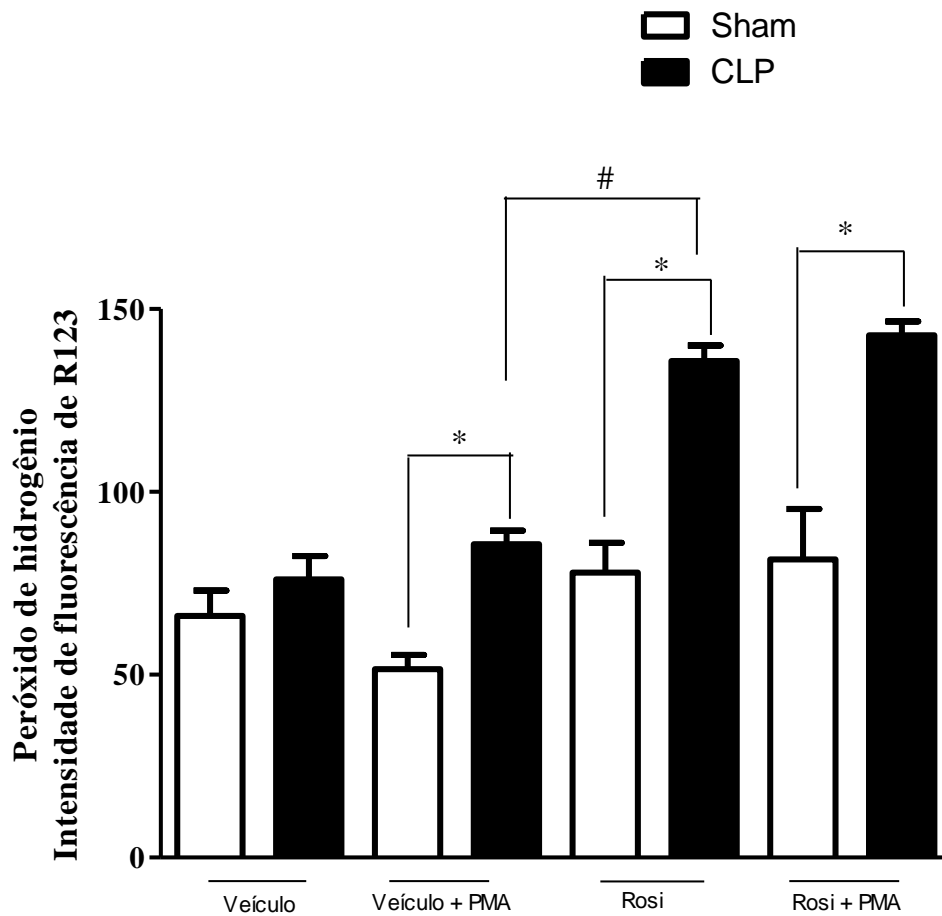


Figura 4.16: Efeito *in vitro* da Rosiglitazona na produção de peróxido de hidrogênio em células de animais submetido à CLP. Quatro horas após a cirurgia foram recolhidas amostras de sangue de animais sham e CLP. As células totais foram incubadas durante 1h com Rosiglitazona (Rosi; 5 μ M) a 37°C e em seguida estimuladas com PMA na presença de catalase e da sonda DHR. $p < 0,05$ (*) representa a diferença significativa do grupo CLP vs sham. (#) representa a diferença estatística entre CLP+Rosi vs CLP+veículo+PMA.

4.17 O tratamento com Rosigitazona aumenta a eliminação bacteriana por polimorfonucleares humanos após estimulação com *E. coli*

Após observar o efeito da Rosigitazona na eliminação bacteriana em animais submetidos à CLP, decidimos analisar o papel da Rosigitazona na eliminação bacteriana em experimentos *in vitro* de cultura de PMNs humanos estimulados com *E. coli*. PMNs humanos (2×10^6) de indivíduos sadios foram purificados (ver item 3.2.8) e plaqueados em placa de 24 poços na presença ou na ausência de diferentes concentrações de Rosigitazona (0,5-50 μM) por 1h. Após este período, as células foram estimuladas com *E. coli* (10^6 bactérias/mL) e após 1h de estímulo, o sobrenadante das células dos diferentes poços foi recolhido e plaqueado em placas contendo TSA. Após 24 h, os números de bactérias foram contados e analisados. Observamos na figura 4.17, que o número de UFC foi menor nos grupos tratados com diferentes concentrações de Rosigitazona, tendo um efeito pronunciado na concentração de 50 μM quando comparados com o grupo tratado com PBS (controle). Quando a Rosigitazona foi incubada com PMNs na ausência de *E. coli*, não se observou um efeito direto da droga nas culturas.

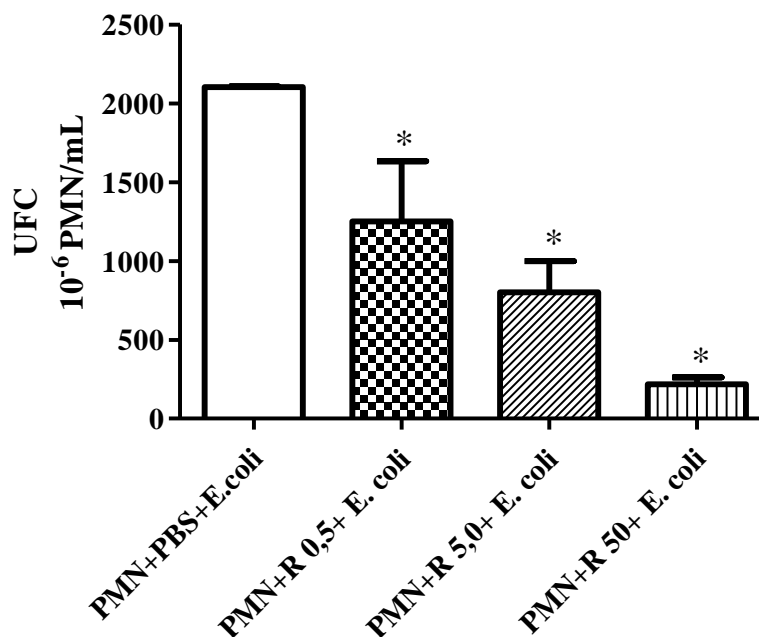


Figura 4.17: Efeito da Rosigitazona na eliminação bacteriana em cultura de PMNs humanos. PMNs foram tratados com diferentes concentrações de Rosigitazona (Rosi; 0,5 - 50 μM) ou PBS e após 1 h, estimulados com *E. coli* ($10^6/\text{mL}$). Triplicatas de diferentes poços foram plaqueadas em placa contendo TSA e o UFC foi analisado em 24 h. $p < 0,05$ (*) representa a diferença significativa com relação ao grupo controle.

4.18 O tratamento com Rosiglitazona aumenta a formação das NETs em células previamente estimuladas com LPS

Na luta contra infecção os PMNs utilizam de várias manobras para conter e proteger o organismo infecção. Dentre elas estão as redes extracelulares de neutrófilos, ou NETs que confinam e matam patógenos de maneira bastante eficaz (114).

Após o protocolo de purificação de neutrófilos descrito no item (3.2.9), foi feita uma curva concentração-resposta de LPS (0,1-100 ng/mL) na presença e na ausência de Rosiglitazona (0,5 μ M). O veículo DMSO foi utilizado como grupo controle. A curva concentração-resposta de LPS foi realizada com o objetivo de avaliar qual a concentração eficaz do estímulo inflamatório seria capaz de evidenciar um possível aumento da formação de NETs em presença da Rosiglitazona. Os resultados são mostrados nas figuras 4.18.1A 4.18.1B.

Como observado na figura 4.18.1A, a concentração de 0,1 ng/mL de LPS+veículo foi eficaz em induzir a formação de NETs e o tratamento das células com Rosiglitazona pré-estimuladas com LPS na mesma concentração observou-se um aumento desta resposta (B). Um efeito semelhante foi observado na concentração de 1 ng/mL de LPS tratadas com veículo, que permitiu a visualização da formação destas estruturas (C). Da mesma forma, o tratamento com a Rosiglitazona em células pré estimuladas LPS (1 ng/mL) se mostrou eficaz em evidenciar o aumento deste efeito (D).

A figura 4.18.2A observa-se que em células pré estimuladas com a concentração maior de LPS foram igualmente eficazes em induzir a formação de NETs. Na concentração de 10ng/mL ainda foi possível observar a formação de NETs. No entanto, o tratamento das células com Rosiglitazona em células pré-estimuladas com LPS na mesma concentração, não foi possível detectar o aumento na formação destas estruturas (4.18.2.B). Efeito semelhante se observou na maior concentração de LPS (100 ng/mL). Embora tenhamos visto que esta concentração também tenha induzido a mesma resposta (4.18.2.C), o tratamento com Rosiglitazona nestas células não permitiu evidenciar uma diferença na formação destas redes extracelulares (4.18.2 D).

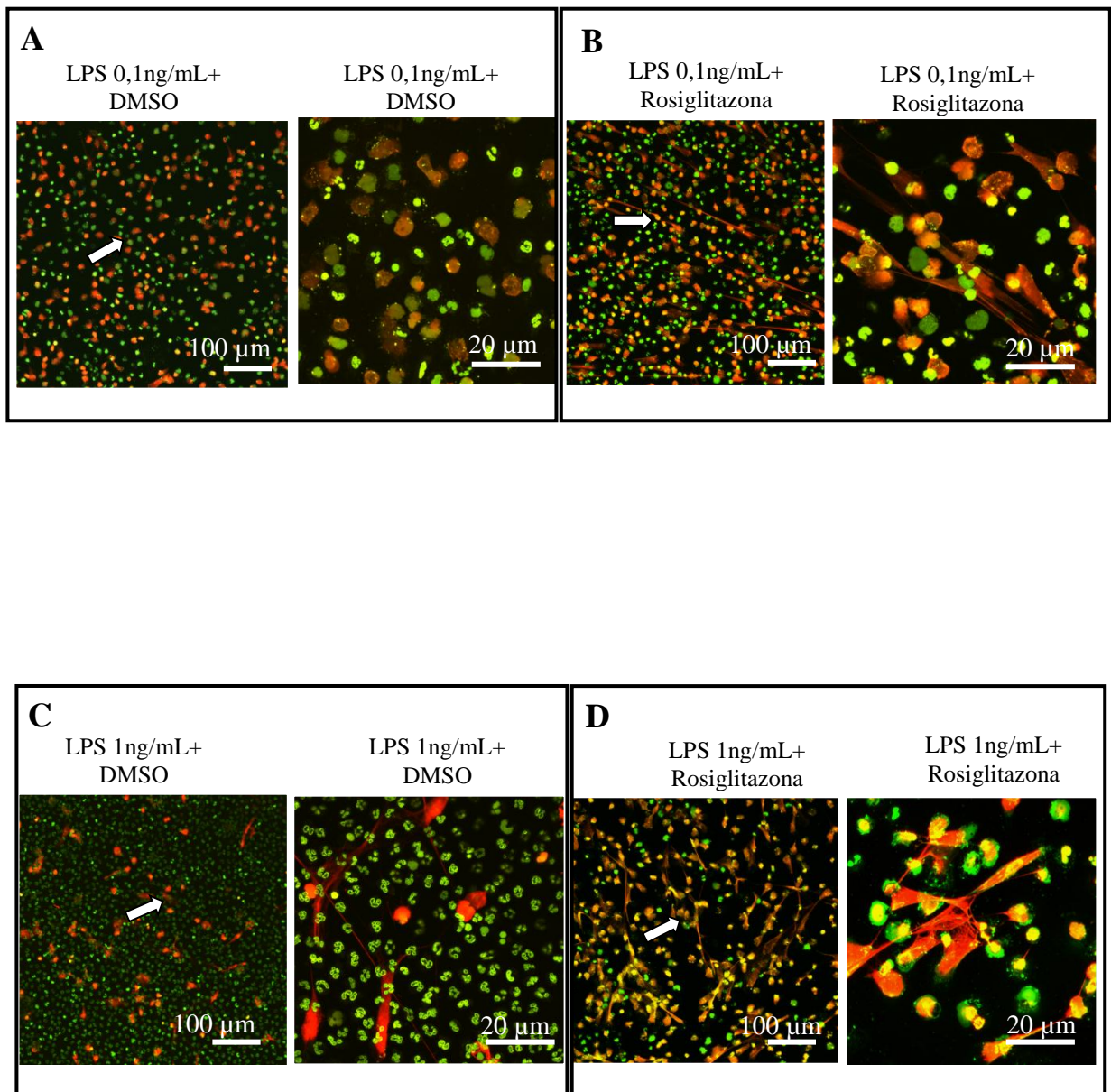


Figura 4.18.1: Efeito da Rosiglitazona na formação de NETs e estimuladas por LPS. PMNs humanos foram purificados, colocados em lâminas pré revestidas com poli-L-lisina e em seguida estimulados com LPS (0,1-1 ng/mL) na presença e na ausência de Rosiglitazona (0,5 μM) por 1 h. O DNA extracelular foi marcado em laranja pelo corante de DNA, *syntox orange* e o DNA nuclear foi marcado em verde pelo *syto green*. (A) LPS 0,1 ng/mL+DMSO. (B) LPS (0,1ng/mL)+Rosiglitazona. (C) LPS (1ng/mL)+DMSO e (D) LPS (1 ng/mL)+Rosiglitazona. As imagens são representativas de 3 experimentos distintos, com PMNs de diferentes doadores. Foram analisados 3 campos distintos para cada imagem e a quantificação da coloração é qualitativa. As imagens foram observadas por microscopia confocal e observadas em objetivas de 20x e 60x.

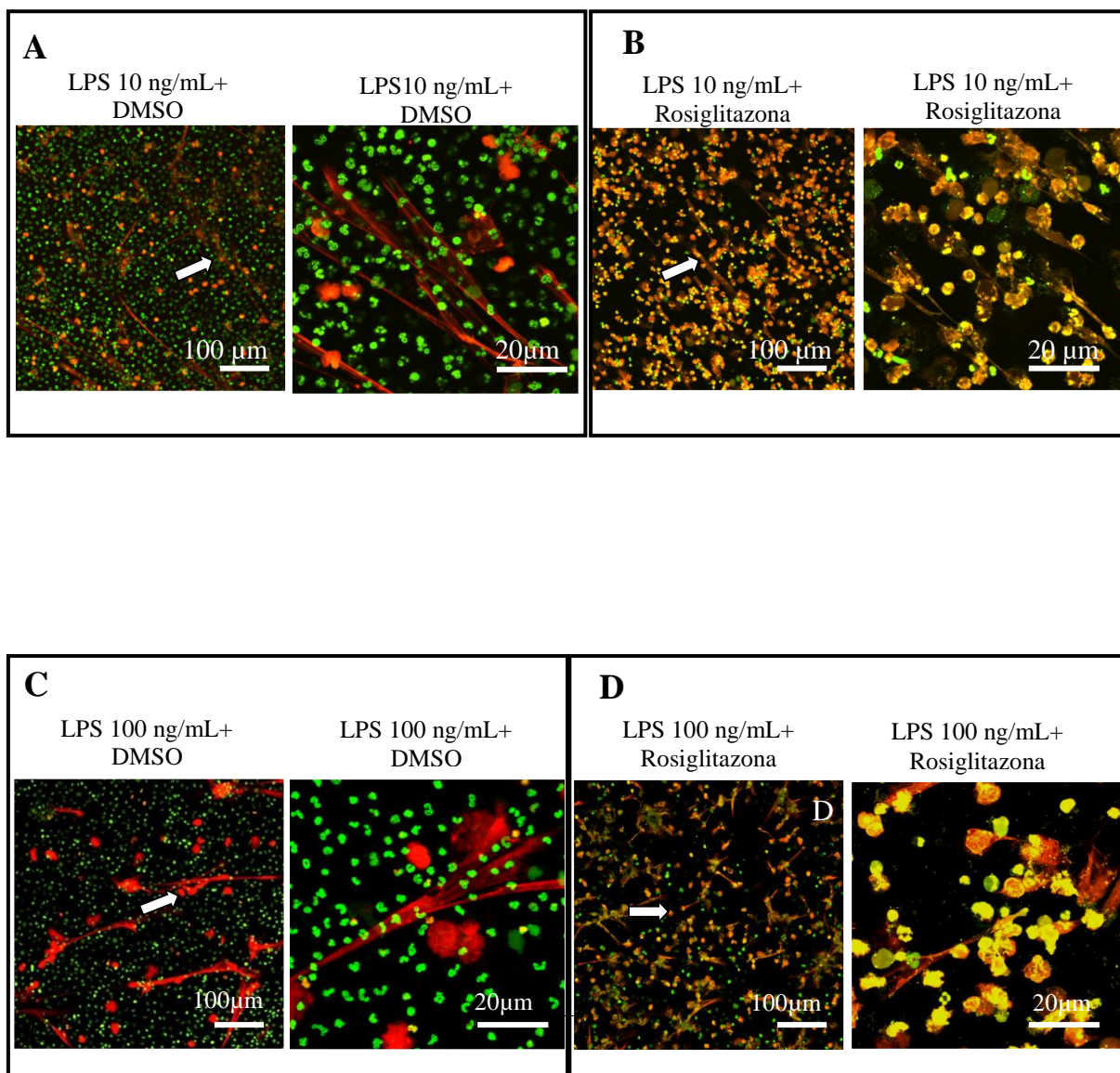


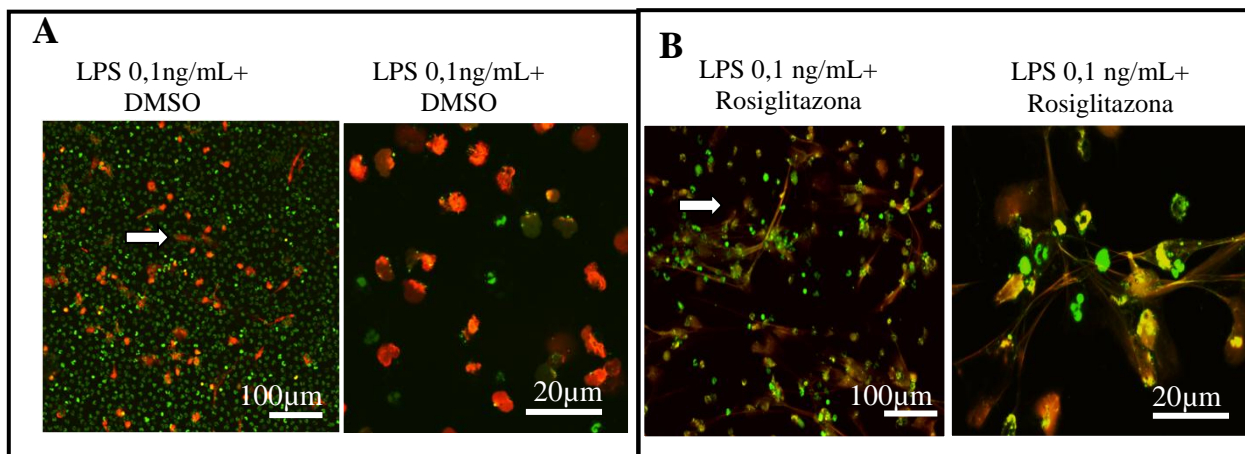
Figura 4.18.2: Efeito da Rosiglitazona na formação de NETs induzidas neutrófilos e estimuladas por LPS. PMNs humanos foram purificados, colocados em lâminas pré revestidas com poli-L-Isina e em seguida estimulados com LPS (0,1-1 ng/mL) na presença e na ausência de Rosiglitazona (0,5μM) por 1 h. O DNA extracelular (indicado pela seta) foi marcado em laranja pelo corante de DNA, *sytox orange* e o DNA nuclear foi marcado em verde pelo *syto green*. (A) LPS 10 ng/mL+DMSO, (B) LPS (10 ng/mL)+Rosiglitazona. (C) LPS (100 ng/mL)+DMSO e (D) LPS (100 ng/mL)+Rosiglitazona. As imagens são representativas de 3 experimentos distintos, com PMNs de diferentes doadores. Foram analisados 3 campos distintos para cada imagem e a quantificação da coloração é qualitativa. As imagens foram observadas por microscopia confocal e observadas em objetivas de 20x e 60x.

4.19 Curso temporal dos efeitos da Rosiglitazona na formação de NETs estimuladas por LPS

Uma vez determinada a concentração efetiva de LPS em induzir NETs e verificar o significativo efeito da Rosiglitazona em aumentar esta resposta, decidimos analisar se este efeito mostrado pela Rosiglitazona era dependente do tempo de incubação. Para isso, neutrófilos foram purificados e incubados com LPS (0,1 ng/mL) na ausência e presença de Rosiglitazona (0,5 μ M) em diferentes intervalos de tempo (30 a 120 minutos).

Como mostra na figura 4.19.1A, em 30 minutos o estímulo com LPS+veículo foi capaz de induzir a formação de NETs. O tratamento das células com Rosiglitazona em células estimuladas com LPS induziu o aumento da formação das mesmas (figura 4.19.1B). Já no tempo de 60 minutos observamos um efeito ainda maior na formação dessas redes extracelulares em células estimuladas com LPS+veículo (figura 4.19.1C) e o tratamento com Rosiglitazona foi igualmente eficaz em aumentar este efeito (figura 4.19.1D). Nos tempos de 90 e 120 minutos os efeitos na formação de NETs não foram diferentes quando comparados com os tempos mais precoces. A figura 4.19.2E mostra que após 90 minutos as células estimuladas apenas com LPS+veículo ainda observou-se a formação de NETs e no grupo estimulado com LPS+Rosiglitazona também foi possível observar um aumento deste efeito (figura 4.19.2F). Em 120 minutos, as células estimuladas com LPS+veículo ou LPS+Rosiglitazona obtiveram o mesmo padrão de resposta em induzir a formação de NETs (figura 4.19.2 G-H).

30 minutos



60 minutos

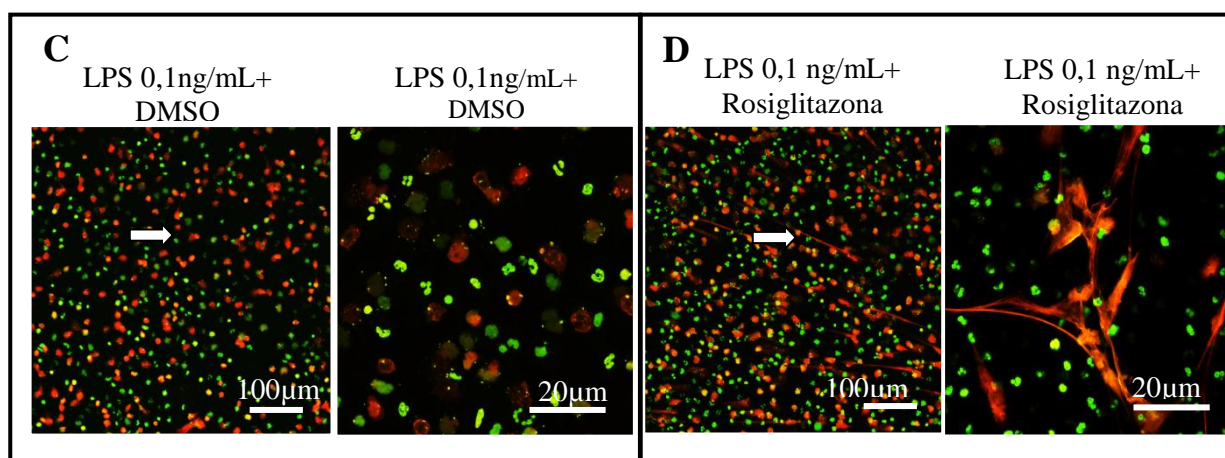
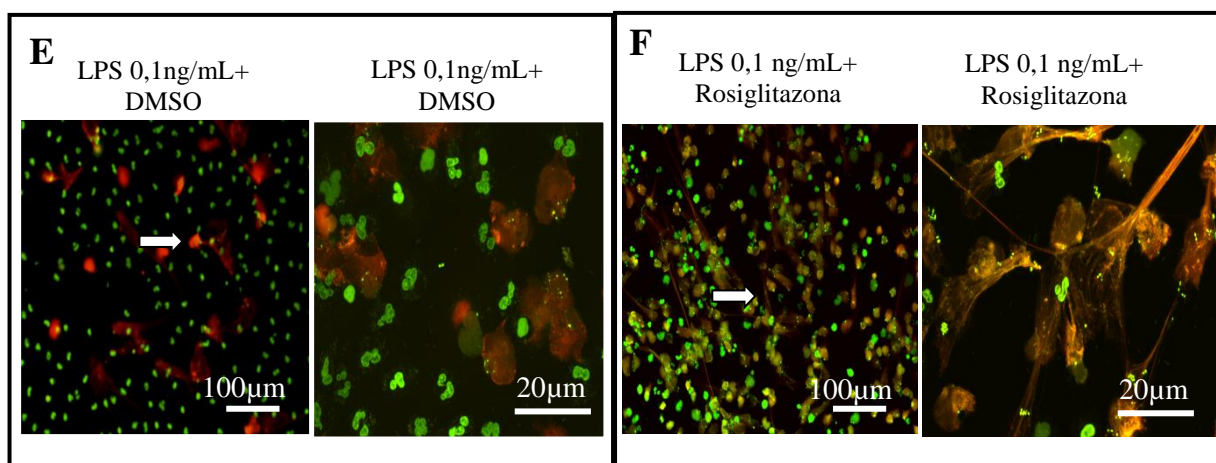


Figura 4.19.1: Curso temporal dos efeitos da Rosiglitazona na formação de redes extracelulares induzidas neutrófilos e estimuladas por LPS. PMNs humanos foram purificados e em seguida estimulados com LPS (0,1 ng/mL) na presença e na ausência de Rosiglitazona (0,5µM). Em seguida foram colocadas em lâminas pré revestidas com poli-L-lisina por 1 h. O DNA extracelular (indicado pela seta) foi marcado em laranja pelo corante de DNA, *sytox orange* e o DNA nuclear foi marcado em verde pelo *syto green*. 30min (A) LPS (0,1 ng/mL) + DMSO, (B) LPS (0,1 ng/mL)+Rosiglitazona. 60min (C) LPS (0,1 ng/mL)+DMSO ou (D) LPS(0,1 ng/mL)+Rosiglitazona. As imagens são representativas de 3 experimentos distintos, com PMNs de diferentes doadores. Foram analisados 3 campos distintos para cada imagem e a quantificação da coloração é qualitativa. As imagens foram observadas por microscopia confocal e observadas em objetivas de 20x e 60x.

90 minutos



120 minutos

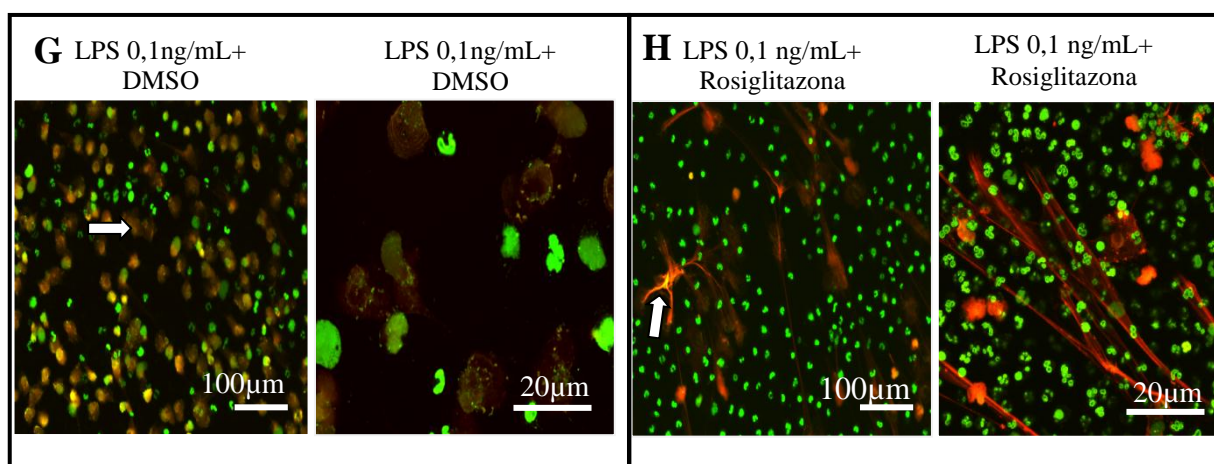


Figura 4.19.2: Efeito da Rosiglitazona na formação de redes extracelulares induzidas neutrófilos e estimuladas por LPS. PMNs humanos foram purificados e em seguida estimulados com LPS (0,1 ng/mL) na presença e na ausência de Rosiglitazona (0,5 μM). Em seguida, foram colocadas em lâminas pré revestidas com poli-L-lisina e incubados por 1 h. O DNA extracelular (indicado pela seta) foi marcado em laranja pelo corante de DNA, *sytox orange* e o DNA nuclear foi marcado em verde pelo *syto green*. 90 min (E) LPS (0,1 ng/mL)+DMSO, (F) LPS(10 ng/mL)+Rosiglitazona. 120min (G) LPS (0,1 ng/mL)+DMSO ou (H) LPS(0,1 ng/mL)+Rosiglitazona. As imagens são representativas de 3 experimentos distintos, com PMNs de diferentes doadores. Foram analisados 3 campos distintos para cada imagem e a quantificação da coloração é qualitativa. As imagens foram observadas por microscopia confocal e observadas em objetivas de 20x e 60x.

4.20 Efeito direto dos ligantes de PPAR γ na formação de NETs

Como a Rosiglitazona demonstrou um importante efeito no aumento da formação de NETs em células previamente estimuladas com LPS, resolvemos investigar se os efeitos observados seriam devido a um efeito direto da droga sobre as células. Para isto, PMNs humanos foram purificados como descrito no item 3.2.9, colocados em lâminas pré-revestidas com poli-L-lisina, tratadas ou não com Rosiglitazona (0,5 μ M) ou GW9662 (0,5 μ M) e incubadas por 1 h. Foram utilizados DMSO (0,01%) ou etanol (0,01%), como grupos controles. Após o tempo de incubação, as células foram marcadas com corantes de DNA *sytox orange* e *syto green* que marcam o DNA extracelular em laranja/vermelho e intracelular em verde, respectivamente. As imagens foram analisadas por microscopia confocal.

Como foi possível observar na figura 4.20 A e B, os tratamentos com os veículos DMSO ou etanol não induziram a formação das NETs, respectivamente. Igualmente foi observado nos tratamentos com ligantes de PPAR γ . Tanto a Rosiglitazona (4.20B) quanto o GW9662 (4.20 C) não induziu a formação de NETs, mostrando portanto, que a resposta observada pela Rosiglitazona no aumento na formação das NETs nas células pré estimuladas com LPS, não parece ser um efeito direto da droga sobre as células.

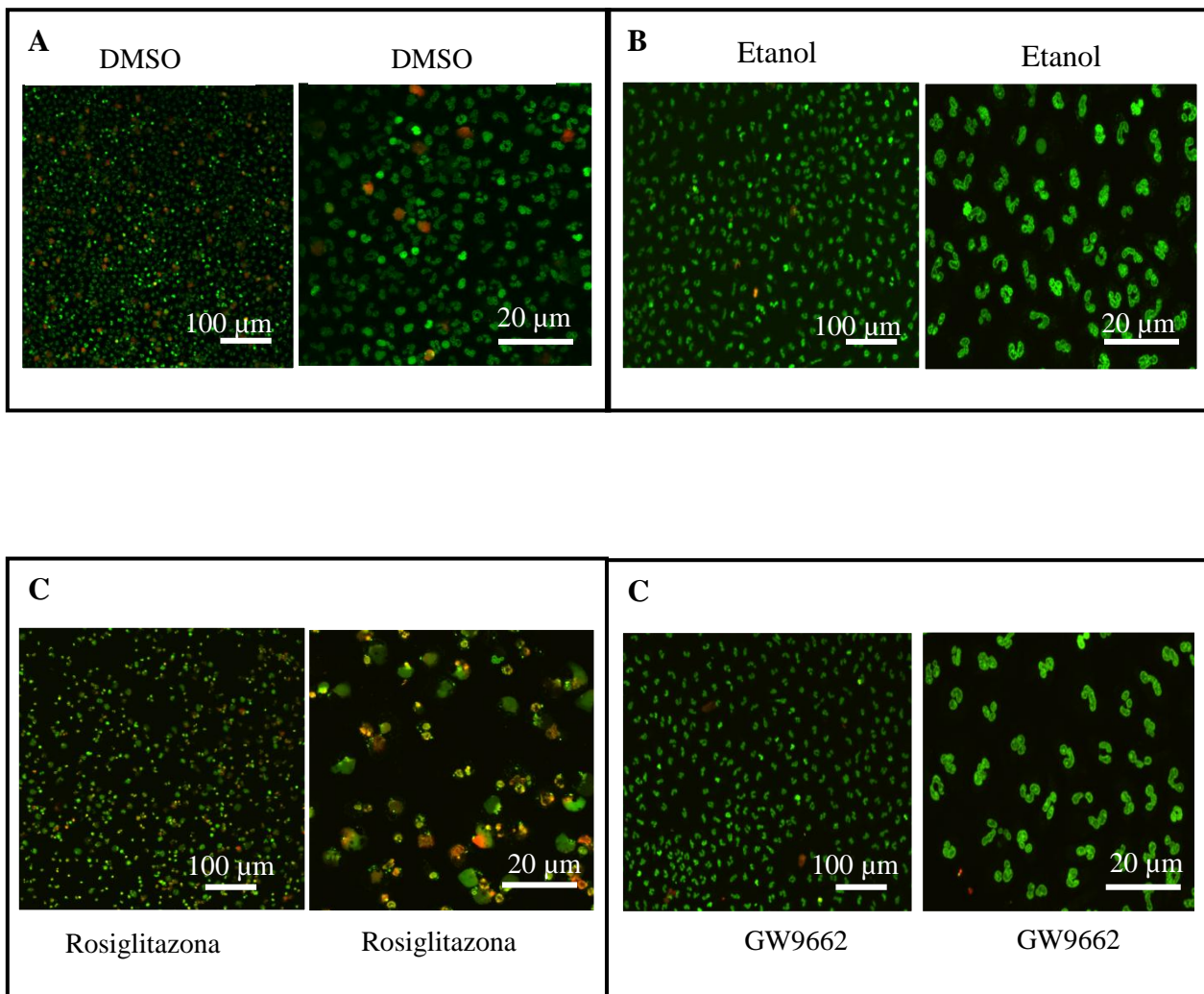


Figura 4.20: Efeito direto dos ligantes de PPAR γ na formação de redes extracelulares induzidas neutrófilos. PMNs humanos foram purificados, estimulados com LPS (0,1 ng/mL) na presença e na ausência de Rosiglitazona (0,5 μ M) e/ou GW9662 (0,5 μ M). Foram utilizado DMSO ou etanol como controles. Em seguida, foram colocados em lâminas pré revestidas com poli-L-lisina e incubadas por 1 h. O DNA extracelular foi marcado em laranja/vermelho pelo corante de DNA, *sytox orange* e o DNA nuclear foi marcado em verde pelo *syto green*. As imagens são representativas de 3 experimentos distintos, com PMNs de diferentes doadores. Foram analisados 3 campos distintos para cada imagem e a quantificação da coloração é qualitativa. As imagens foram observadas por microscopia confocal e observadas em objetivas de 20x e 60x.

4.21. Efeito da Rosiglitazona na formação de NETs é mediado pelo receptor PPAR γ

4.21.1 Efeito da Rosiglitazona formação de NETs em células estimuladas com LPS

Visto que a concentração de 0,5 μ M de Rosiglitazona em presença de LPS (0,1 ng/mL) se mostrou eficaz em aumentar a formação das NETs, resolvemos investigar se esta resposta observada nas células era mediada pelo receptor PPAR γ . Para isto células foram purificadas estimuladas com LPS+DMSO ou LPS+Rosiglitazona na presença ou ausência do antagonista GW9662. Foram utilizados DMSO (0,01%) ou etanol (0,01%), como grupos controles. Como era esperado, o estímulo das células LPS+veículo observamos a formação das NETs (figura 4.21.1A) e quando às células foram estimuladas com LPS+Rosiglitazona observamos um aumento na formação das NETs quando comparados com o grupo controle. (4.21.1B). No entanto, quando as células foram tratadas com Rosiglitazona na presença de GW9662 foi possível observar a reversão deste efeito (4.21.1C). Para verificar se o antagonista poderia induzir algum efeito na formação de NETs, as células foram igualmente estimuladas com LPS e tratadas com o GW9662. O tratamento com o antagonista não aumentou a formação das mesmas quando estimuladas com LPS (4.21.1D).

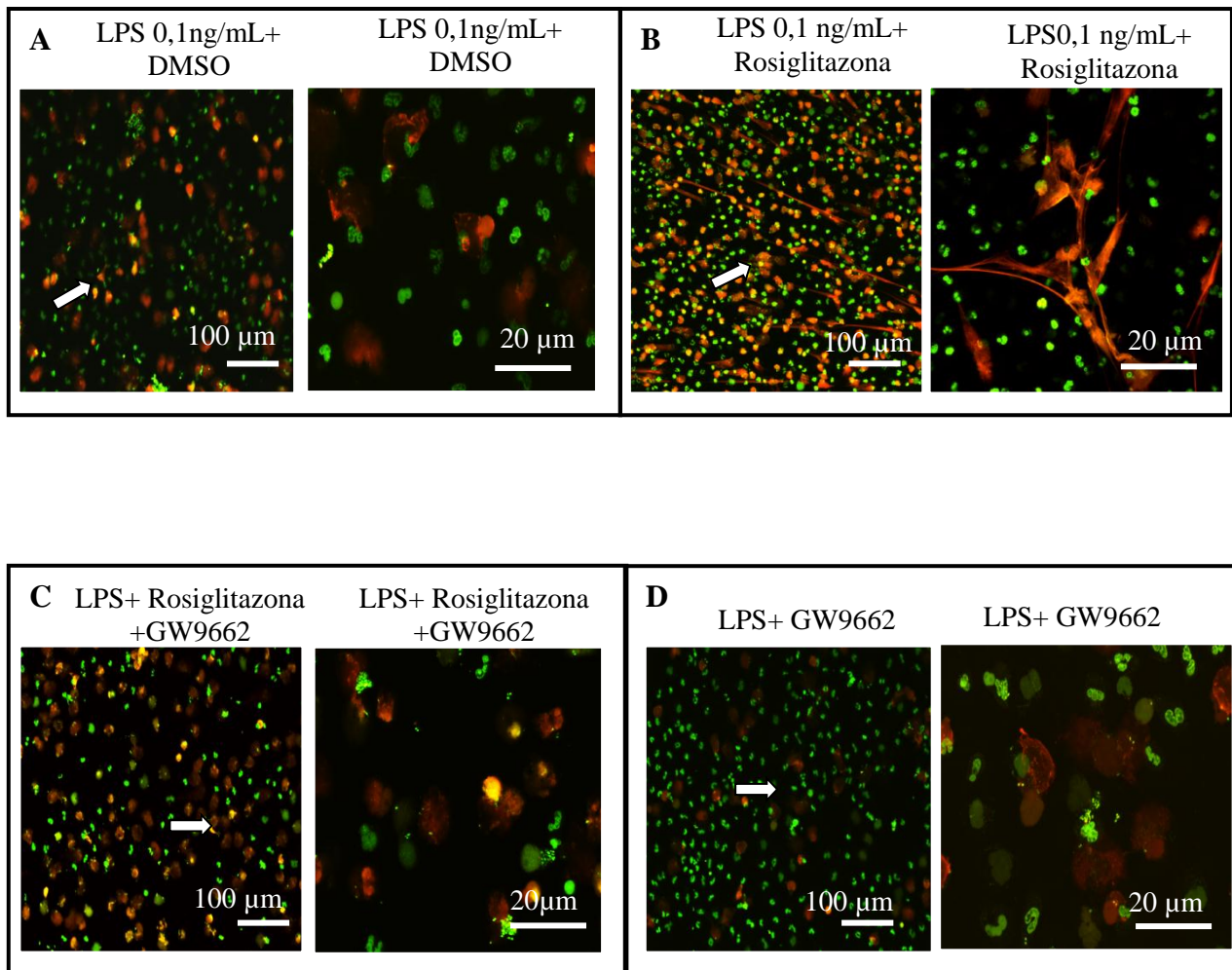


Figura 4.21.1: Efeito na formação de redes extracelulares induzidas neutrófilos em células estimuladas com LPS. PMNs humanos foram purificados, e em seguida estimulados com LPS (0,1 ng/mL) na presença e na ausência de Rosiglitazona (0,5μM). Em seguida foram colocadas em lâminas pré revestidas com poli-L-lisina e incubadas por 1 h. O DNA extracelular (indicado pela seta) foi marcado em laranja/vermelho pelo corante de DNA *sytox orange* e o DNA nuclear foi marcado em verde pelo *syto green*. (A) LPS +DMSO, (B) LPS+Rosiglitazona. (C) LPS+Rosiglitazona+GW9662, (D) LPS+GW9662. As imagens são representativas de 3 experimentos distintos, com PMNs de diferentes doadores. Foram analisados 3 campos distintos para cada imagem e a quantificação da coloração é qualitativa. As imagens foram observadas por microscopia confocal e observadas em objetivas de 20x e 60x.

4.21.2 Efeito da Rosiglitazona na formação de NETs em neutrófilos estimulados com *E. coli*

Como observado anteriormente, a Rosiglitazona foi capaz de aumentar a formação de NETs em células estimuladas com LPS. A partir disto resolvemos estimular as células não somente com um componente de parede microbiana, como o LPS, mas com um estímulo clinicamente mais relevante como a bactéria *E. coli*.

Nossos resultados mostram que as células estimuladas com *E. coli* e DMSO tiveram um aumento do DNA extracelular (marcada em laranja) e a formação de NETs, como mostra na figura 4.21.2A. O tratamento com Rosiglitazona foi capaz de aumentar a formação das redes extracelulares quando comparadas com as células estimuladas apenas com *E. coli* e veículo (figura 4.21.2B). No entanto, quando as células foram estimuladas com *E. coli*, tratadas com Rosiglitazona na presença do antagonista GW9662, observamos uma inibição deste efeito (figura 4.21.2C). Nas células estimuladas com *E. coli* e tratadas com GW9662 não se observou alteração na formação das mesmas quando comparados com o grupo *E. coli* + veículo (Figura 4.21.2D).

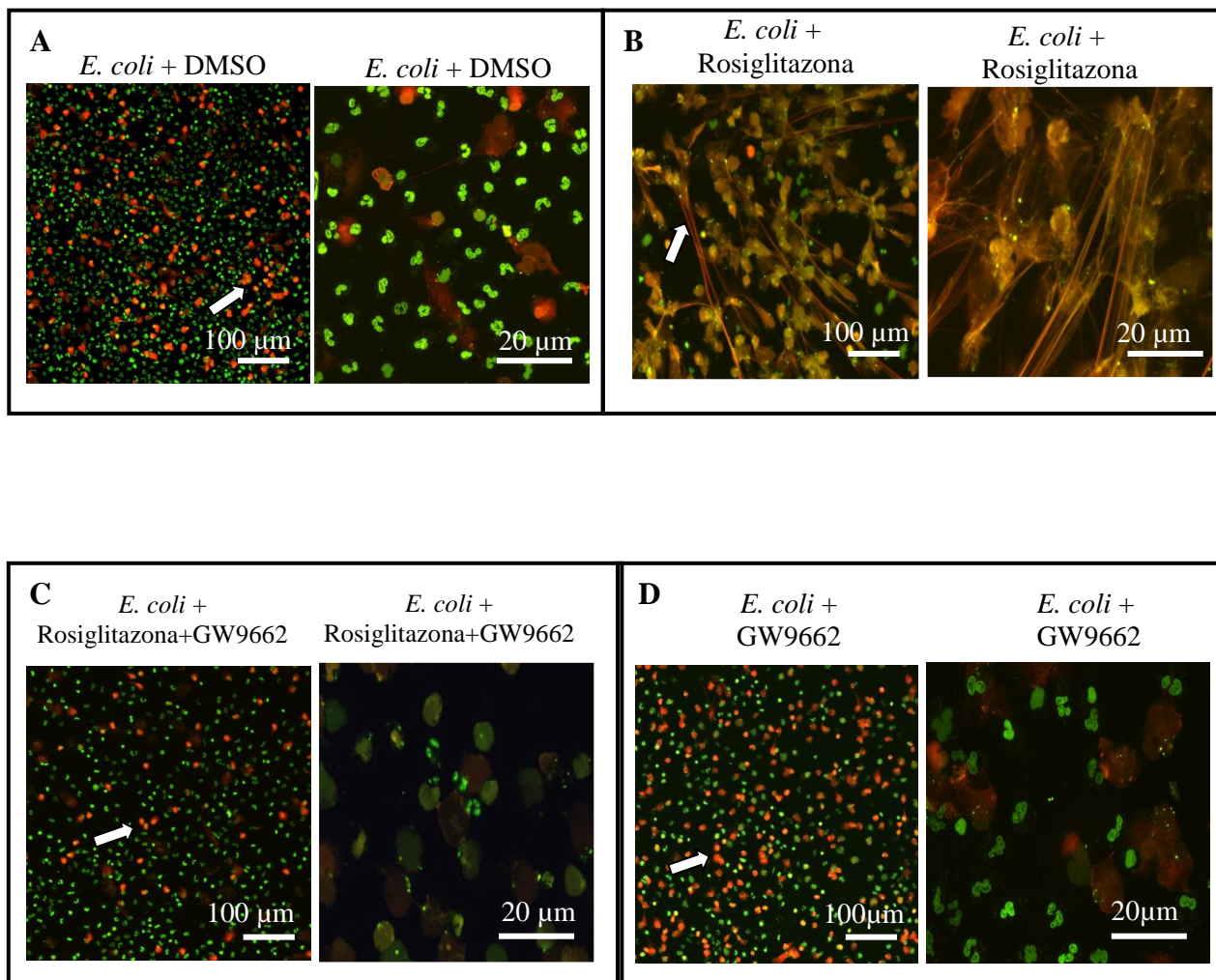


Figura 4.21.2: Efeito do PPAR γ na formação de redes extracelulares induzidas neutrófilos em células estimuladas com *E.coli*. PMNs humanos foram purificados, e em seguida estimulados com *E. coli* (2×10^6 /mL) na presença e na ausência de Rosiglitazona ($0,5 \mu\text{M}$) e/ou GW9662 ($0,5 \mu\text{M}$). Em seguida, foram colocadas em lâminas pré revestidas com poli-L-lisina e incubadas por 1 h. O DNA extracelular (indicado pela seta) foi marcado em laranja/vermelho pelo corante de DNA *sytox orange* e o DNA nuclear foi marcado em verde pelo *syto green*. (A) *E. coli*+DMSO, (B) *E. coli*+Rosiglitazona (C) *E. coli*+Rosiglitazona+GW9662, (D) *E. coli*+GW9662. As imagens são representativas de 3 experimentos distintos, com PMNs de diferentes doadores. Foram analisados 3 campos distintos para cada imagem e a quantificação da coloração é qualitativa. As imagens foram observadas por microscopia confocal e observadas em objetivas de 20x e 60x.

4.22 Efeito do receptor PPAR γ na liberação da proteína histona H3 em polimorfonucleares estimulados com LPS ou *E. coli*

Visto que as células estimuladas com LPS ou *E. coli* e tratadas com Rosiglitazona tiveram um aumento na formação de NETs e que a presença do antagonista GW9662 foi capaz de reverter este efeito, resolvemos investigar se haveria também uma modulação da liberação da proteína H3 mediada pelo PPAR γ , uma vez que esta proteína é um importante marcador na formação dessas redes extracelulares formadas por neutrófilos.

Após a visualização das NETs por microscopia confocal os sobrenadantes das células foram tratados com DNase (2,5 U/mL), para permitir a degradação das mesmas e o material foi analisado por *Western Blotting*. Como mostra a figura 4.22A, as células estimuladas LPS (0,1 ng/mL)+veículo e tiveram um aumento da liberação da proteína H3 quando comparados com o tratamento dos veículos DMSO ou etanol. Já o tratamento com Rosiglitazona (0,5 μ M) foi capaz de aumentar significativamente a liberação da proteína nestas células. No entanto, quando as células foram tratadas com Rosiglitazona na presença de GW9662 (0,5 μ M) se observou uma marcante redução deste efeito.

Um padrão de resposta bastante semelhante foi observado quando as células foram estimuladas com *E. coli* (2×10^6 cel/mL)+veículo. Nestas células observamos igualmente um aumento da liberação da proteína H3. O tratamento das células com LPS+Rosiglitazona também foi capaz de aumentar a liberação desta proteína e a presença do antagonista GW 9662 nas células tratadas com Rosiglitazona e estimuladas com LPS observou-se uma inibição desta resposta (figura 4.22B).

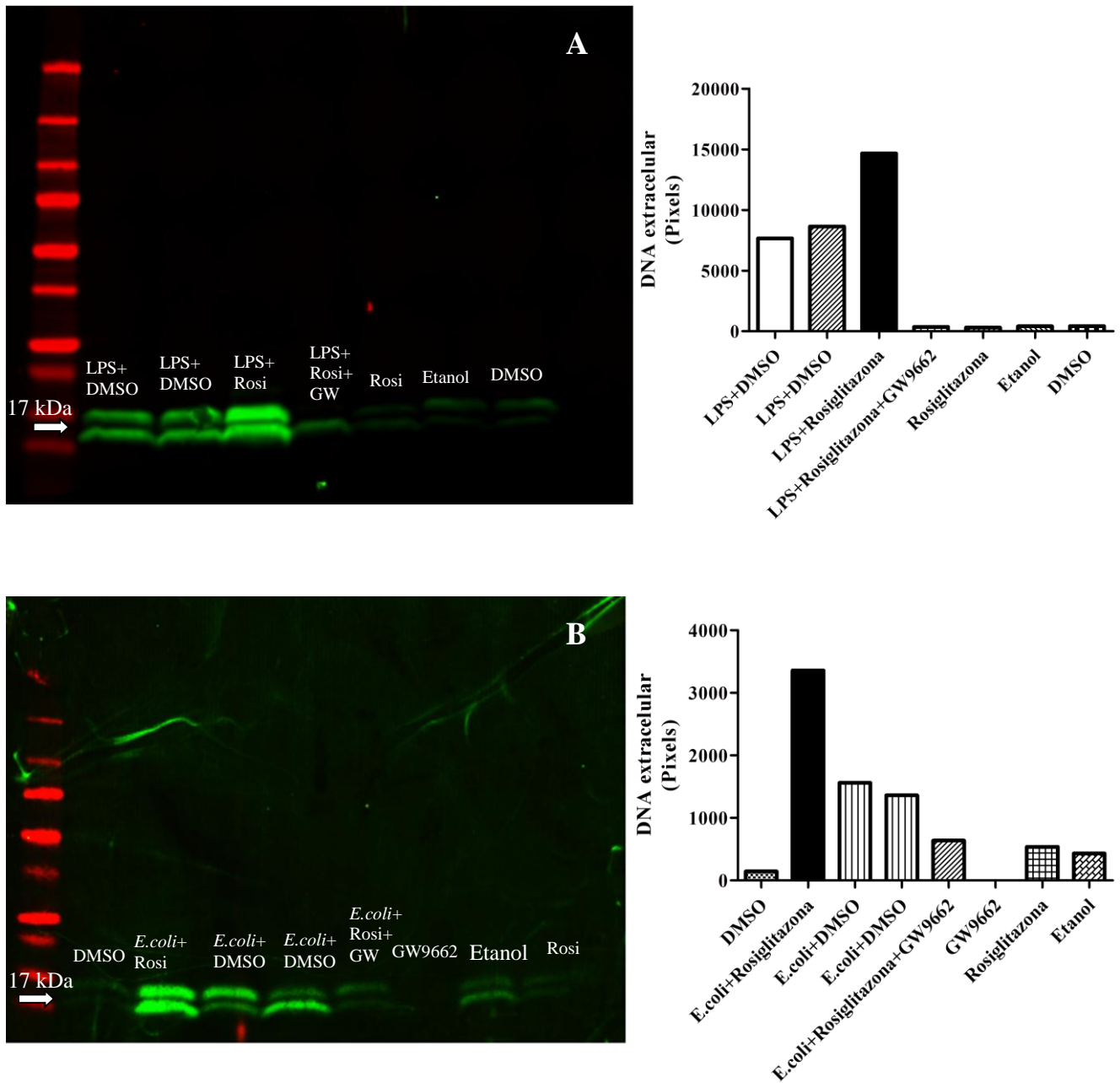


Figura 4.22: Efeito do receptor PPAR γ na liberação de proteínas histonas H3 em células estimuladas com LPS ou *E. coli*. PMNs humanos foram purificados e estimulados com LPS (0,1 ng/mL) (A) ou *E. coli* (2×10^6 cel/mL) (B) e tratados com Rosiglitazona (0,5 μ M) e/ou GW9662 (0,5 μ M). Foram utilizado DMSO ou etanol como controles. Em seguida, as células foram colocadas em lâminas pr revestidas com poli-L-lisina e incubadas por 1 h. Após a incubação, as células foram visualizadas em microscopia confocal, as imagens foram capturadas e em seguida, tratadas com DNase (2,5 U/mL). No sobrenadante das células foi determinado a liberação da proteína histona H3 por *Western Blotting*. Resultado representativo de 3 experimentos independentes.

4.23 O Aumento da eliminação bacteriana induzida por Rosiglitazona é mediada por netose

Para acessar o componente da eliminação bacteriana que ocorre em meio extracelular e excluir a eliminação bacteriana intracelular, culturas de PMNs foram pré-tratados com inibidor de fagocitose a citocalasina B e D (10 μ M). Em seguida, as mesmas foram estimuladas com LPS, para permitir a formação das NETs, em presença e na ausência de Rosiglitazona e/ ou GW9662. Em seguida, as culturas foram incubadas por 1 h com *E. coli*.

Para avaliar a eliminação bacteriana intracelular, as culturas de células foram igualmente estimuladas com LPS, com ou sem Rosiglitazona ou GW9662. Em seguida as NETs foram digeridas com DNase e incubadas com *E. coli*. O tratamento com DNase foi utilizado para bloquear a eliminação bacteriana associada com as NETs.

A eliminação bacteriana total foi representada pela soma da eliminação bacteriana por fagocitose e por NETs. Os dados foram calculados pela contagem manual de UFC e representados em porcentagem de eliminação bacteriana.

Como mostram as figuras 4.23.1A e 4.23.2, houve um aumento na eliminação bacteriana total nas células estimuladas com LPS+Rosiglitazona e incubadas com *E. coli*, quando comparadas com o grupo estimulado apenas com a *E. coli*+meio. No entanto, quando as células foram estimuladas com LPS e tratadas com Rosiglitazona+GW9662, observou-se uma reversão deste feito.

Na eliminação bacteriana extracelular, o tratamento com Rosiglitazona em células pré-tratadas com citocalasina B e D se observou um aumento na eliminação bacteriana mediada por NETs quando comparadas com o grupo estimulado apenas com a *E. coli*+meio. De maneira interessante, o tratamento com GW9662 na presença de Rosiglitazona foi capaz de reverter este efeito (figura 4.23.1B e figura 4.23.2). No ensaio de eliminação bacteriana por fagocitose vimos que o pré-tratamento das células com DNase e em seguida o tratamento com Rosiglitazona não levou a nenhuma alteração na eliminação bacteriana quando comparados com o grupo *E. coli*+meio, assim como não se observou diferença significativa quando comparados com os outros tratamentos (figura 4.23.1C e figura 4.23.2).

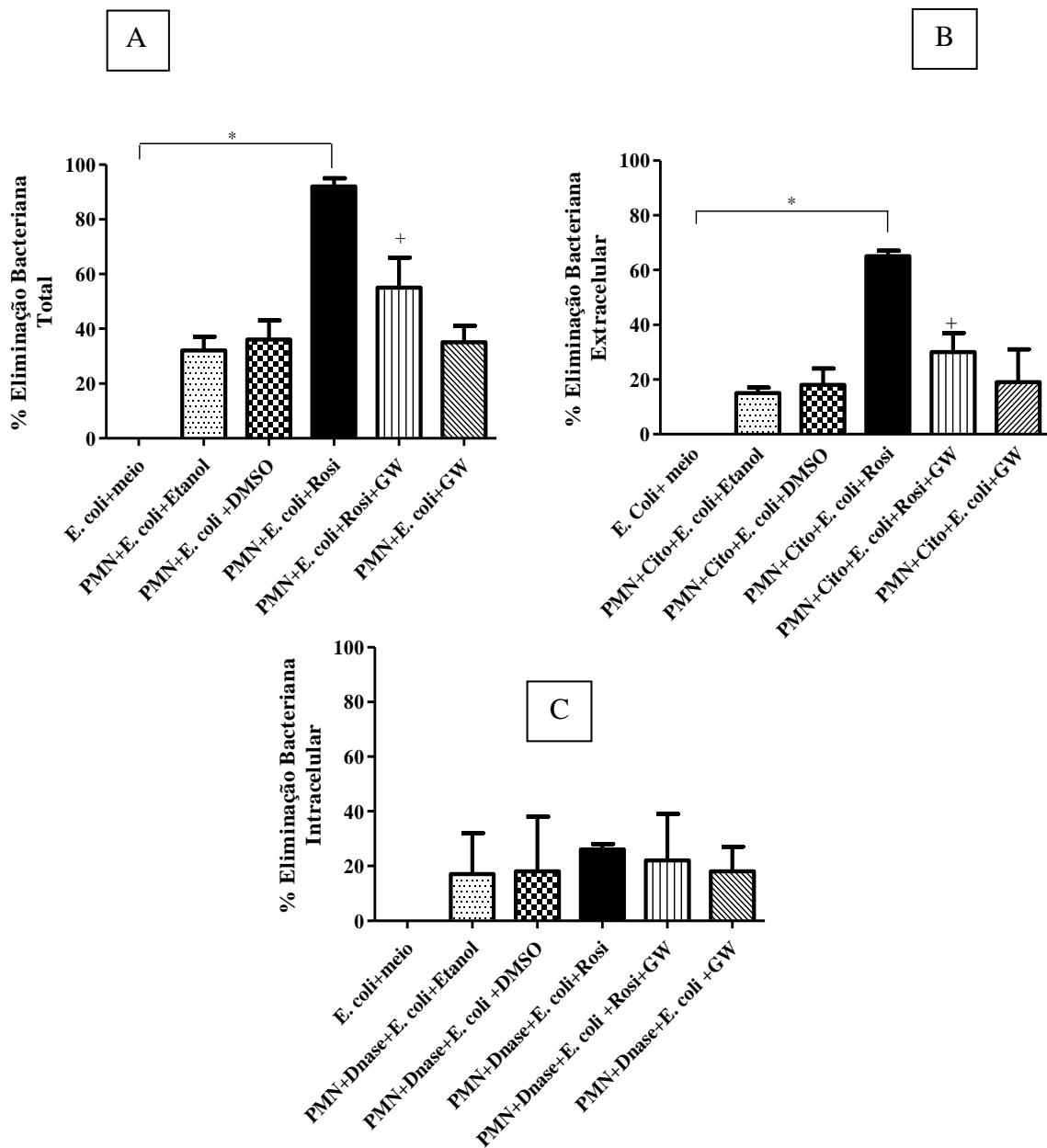


Figura 4.23.1. Efeito da Rosiglitazona na eliminação bacteriana associada com a formação de NETs. Estas imagens representam (A) Eliminação bacteriana total mediada por fagocitose e netose - culturas de PMNs foram estimulados com LPS (0,1 ng/mL), tratados ou não com Rosiglitazona (Rosi) e/ou GW9662 (GW) e em seguida incubados com *E. coli*. (B) Eliminação bacteriana extracelular associada à netose - a fagocitose foi bloqueada por um pré-tratamento com citocalasina B e D (10 μ M) e em seguida as culturas de células foram estimuladas com LPS (0,1 ng/mL) na presença ou na ausência de Rosiglitazona (Rosi; 0,5 μ M) e/ou Gw9662 (0,5 μ M) por 1 h. (C) Eliminação bacteriana intracelular por fagocitose - o tratamento com DNase foi utilizado para bloquear a eliminação bacteriana associada à netose. Dados representados como média \pm EPM de 3 experimentos diferentes. (*) $p < 0,05$ em relação ao grupo *E. coli*+meio. (+) $p < 0,05$ em relação ao grupo PMN+E. coli+RosiouPMN+E. coli+cito+Rosi.

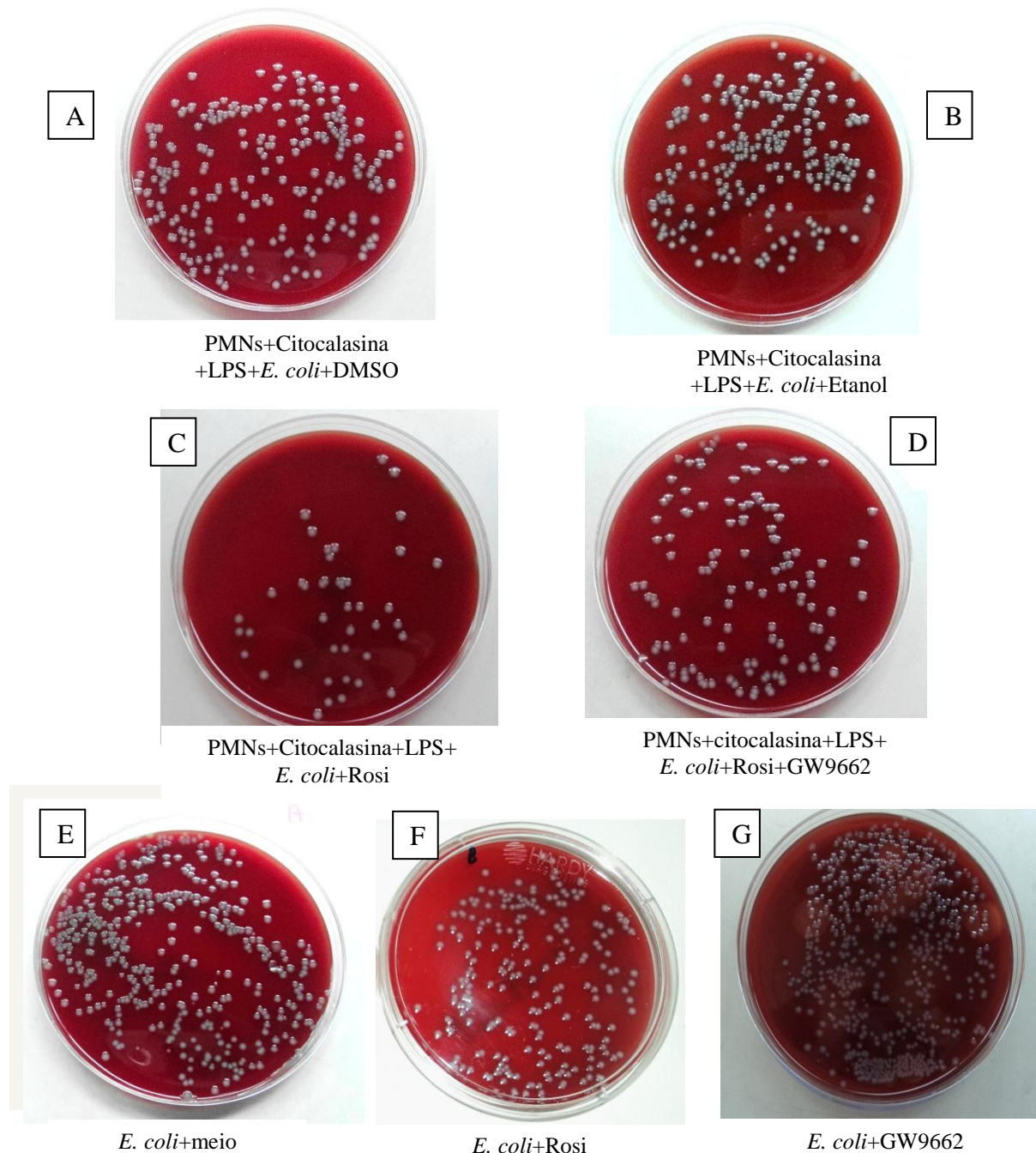


Figura 4.23.2. Efeito da Rosiglitazona na eliminação bacteriana associada com a formação de NETs. Culturas de PMNs foram pré-tratadas com citocalasina B e D (10 μ M) em seguida estimuladas com LPS (0,1 ng/mL) na presença ou ausência de tratamento com Rosiglitazona (0,5 μ M) ou Rosiglitazona+GW9662 por 1 h. Foram utilizados veículos (DMSO ou etanol) como controles. Após o tratamento, as culturas foram incubadas por 1 h com *E. coli* (2×10^6 cel/mL). Seguido o tempo de incubação, alíquotas do sobrenadante da cultura foram plaqueadas para análise de UFC. **(A)** PMN+citocalasina+LPS+E.coli+DMSO **(B)** PMN+citocalasina+LPS+E.coli+etanol **(C)** PMN+citocalasina+LPS+E. coli+Rosi **(D)** PMN+citocalasina+LPS+E.coli+Rosi+GW9662. **(E)** *E. coli*+meio **(F)** *E. coli*+Rosi **(G)** *E. coli*+GW9662. Foto representativa de 3 experimentos independentes.

5 Discussão

Atualmente a sepse vem sendo considerada como consequência da regulação deficiente da resposta imune inata do indivíduo aos produtos microbianos, e muitos trabalhos classificam como peças essenciais para a deficiência nesta regulação, o desequilíbrio entre a produção de mediadores pró e anti-inflamatórios. De fato, estudos pré-clínicos demonstraram que este desbalanço de mediadores impede a manutenção da homeostasia do indivíduo (183, 207) e está amplamente aceito que a consequência da sepse é mais fatal do que a invasão do patógeno propriamente dita.

Muitos modelos de animais têm sido usados para estudar a fisiopatologia da sepse (208), com o objetivo de reproduzir as alterações observadas na sepse humana. O modelo utilizado em nosso estudo, consiste no modelo de ligadura e punção cecal (CLP). Este modelo em roedores vem sendo usado extensivamente na investigação de parâmetros experimentais da sepse e do choque séptico durante as últimas décadas (209). Ele satisfaz diversos critérios essenciais para um bom modelo de sepse: é um modelo polimicrobiano, possui uma fonte local de infecção, induz septicemia e libera produtos microbianos na periferia do sítio de injúria, sendo também capaz de apresentar uma grande versatilidade em se adaptar a diferentes graus de severidade e objetivos experimentais. Portanto, é um modelo valioso para a investigação de diversos aspectos da sepse, tais como, metabolismo, antibioticoterapia, presença de componentes microbianos, respostas cardiovasculares, função imunológica e secreção de mediadores inflamatórios (209). No nosso estudo, os animais submetidos a este modelo desenvolveram manifestações da síndrome séptica, tais como resposta inflamatória exarcebada, alterações na contagem de leucócitos e nos níveis glicêmicos, elevada bacteremia e alto índice de mortalidade.

Drogas pertencentes ao grupo das Tiazolidinedionas (TZD), como por exemplo a Ciglitazona e Rosiglitazona são drogas utilizadas pra tratamento de diabetes do tipo 2 e são conhecidas como agonistas específicos do PPAR γ (181). No nosso trabalho escolhemos a Rosiglitazona (Avandia®) apenas como ferramenta para estudar os aspectos moleculares envolvendo o receptor PPAR γ em diferentes modelos de sepse experimental. No entanto não foi proposto em nosso estudo o uso de agonistas de PPAR γ para fins terapêuticos em pacientes com sepse. Dados da literatura mostram que alguns agonistas de PPAR γ , como por exemplo, a Rosiglitazona possuem alguns efeitos colaterais que comprometeram a utilização da droga para tratamento, assim como a sua circulação no mercado farmacêutico. A dose utilizada em nosso estudo foram baseadas em trabalhos descritos na literatura, embora em

nosso trabalhos utilizamos doses dez vezes menor. As propriedades dos agonistas de PPAR γ tem sido descrita em diversos modelos experimentais de sepse e choque séptico (183, 210). No nosso trabalho escolhemos a Rosiglitazona como ferramenta para estudar os aspectos moleculares envolvendo o receptor PPAR γ em diferentes modelos de sepse experimental. O tratamento *in vivo* com estes ligantes tem mostrado uma diminuição na injúria orgânica associada ao choque hemorrágico, endotóxico e isquemia-reperfusão em roedores (198). Um estudo recente mostra que a apoptose de células do fígado e pulmão induzida pelo choque hemorrágico pode ser diminuída pelo tratamento com Ciglitazona (211). Também foi descrito que a sua ação anti-inflamatória deve-se à inibição da ativação do fator de transcrição NF- κ B. Estudos já relataram que tal atividade deve-se à inibição da expressão de moléculas de adesão (ICAM-1), VCAM-1, TNF- α , metaloproteinase 9 e IL-6 (191). Ainda, o tratamento com um ligante endógeno de PPAR γ , o 15-dPGJ2 protegeu camundongos *Swiss* em um modelo de endotoxemia. Esses animais tiveram uma redução na migração de neutrófilos para o pulmão e intestino, uma diminuição na expressão de moléculas de adesão (E-selectina e ICAM-I) e uma redução na ligação do NF- κ B ao DNA (197). Mais recentemente, Wu e cols (212) também mostraram a inibição de biomarcadores de dano hepático e renal, tais como transaminase pirúvica glutâmica (TGP), creatinina e transaminase oxalacética glutâmica (TGO); e diminuição da produção de citocinas como o TNF- α e IL-6, e inibição do aumento da frequência cardíaca quando agonistas de PPAR γ foram administrados antes da indução do choque endotóxico.

Nosso grupo havia demonstrado anteriormente que o tratamento com Rosiglitazona foi capaz de aumentar em 50% a sobrevivência de camundongos C57BL/6 submetidos à CLP. Apesar de significativo, este resultado ainda se mostrava um pouco distante da realidade clínica, uma vez que os camundongos C57BL/6 são isogênicos e não representam verdadeiramente as variações idiossincráticas encontradas nos pacientes sépticos. Preocupados com a aplicabilidade de nossas pesquisas, decidimos retomar nossos experimentos em uma linhagem de camundongos geneticamente variável. Para isso, camundongos *Swiss* foram submetidos à CLP e tratados com Rosiglitazona (0,5 mg/kg) 15 minutos após o procedimento. O tratamento com Rosiglitazona se mostrou capaz de proteger animais não isogênicos submetidos à CLP, conferindo aos nossos resultados anteriores uma maior relevância clínica. Neste experimento foram utilizadas duas vias de administração para o tratamento com Rosiglitazona nos experimentos de mortalidade. A utilização de duas vias de administração nos levou à descoberta de diferenças na eficácia da proteção conferida pela droga, uma vez que esta proteção se mostrou mais proeminente nos animais tratados por via i.v. que nos animais tratados por via i.p. A administração i.v. se mostrou a via mais eficaz para o tratamento com

Rosiglitazona na prevenção da mortalidade por sepse aguda. Além disso, verificamos que o tratamento com Rosiglitazona 6 h após o CLP por via i.v e i.p. melhorou igualmente a sobrevida dos animais nas primeiras 24 h e permanecendo assim por todo a cinética de análise. O tratamento dos animais com Rosiglitazona em 6 h tem grande relevância clínica, uma vez que após esta intensidade de tempo, os animais já se encontravam com a sepse estabelecida.

Em outra parte do nosso estudo avaliamos a gravidade da sepse, para isso fizemos um escore clínico o qual foram atribuídos pontuações de acordo com a evolução da doença nos animais. Nós vimos que o modelo de sepse adotado em nosso estudo foi classificado como sepse moderada e que o tratamento com Rosiglitazona melhorou a condição clínica destes animais. E ainda, o antagonista de PPAR γ , GW9662 reverteu este efeito protetor. Isto sugere que a resposta da Rosiglitazona é mediada pelo receptor PPAR γ .

Mediante aos efeitos protetores da Rosiglitazona na sobrevivência e no escore clínico observados em nosso modelo, resolvemos investigar se era possível reproduzir os mesmos efeitos protetores da Rosiglitazona em modelo de sepse grave. Para tanto utilizamos um modelo padronizado previamente pelo nosso laboratório (dados não publicados), como injeção de macerado de fezes. Neste estudo, o pós-tratamento com a Rosiglitazona foi igualmente eficaz em aumentar a sobrevida dos animais com sepse grave em 50% corroborando com os dados anteriores. Os efeitos protetores de agonistas de PPAR γ na mortalidade também foi mostrado por Zingarelli e cols (198). Estes autores demonstraram que o tratamento com ligante endógeno 15d-PGJ $_2$ e com a Ciglitazona foi capaz de aumentar o tempo de sobrevida e reduzir a resposta inflamatória de ratos submetidos a sepse experimental.

Em nosso estudo também analisamos a celularidade de amostras de lavado peritoneal dos animais submetidos CLP. Para tal, camundongos *Swiss* foram operados e tratados com Rosiglitazona (0,5 mg/kg, i.v.) Os parâmetros celulares das amostras de lavado peritoneal demonstraram que o tratamento com Rosiglitazona foi capaz de reduzir a migração de neutrófilos para este sítio, o que caracteriza esta droga como um potente anti-inflamatório neste modelo. Estes resultados corroboraram com o estudo mostrado por Zingarelli e cols (198) em que outra glitazona, a Ciglitazona foi capaz de diminuir o infiltrado de leucócitos no pulmão, fígado e cólon em um modelo sepse polimicrobiana em ratos, que foi relacionada com uma evidente redução da mortalidade nos animais sépticos. Porém, no presente estudo, ao analisarmos amostras de sangue periférico, obtivemos evidências indicando que a Rosiglitazona teve uma tendência em reduzir o número de leucócitos circulantes, no entanto não foram observadas diferenças significativas em nossas análises.

Além do recrutamento celular, resolvemos caracterizar o perfil de mediadores envolvidos na resposta inflamatória no nosso modelo. Para isto foram analisados os níveis de IL-6, TNF- α , IL-10 no lavado peritoneal 24 h após o CLP. Na sepse a excessiva e prolongada produção de citocinas na resposta inflamatória, é ainda mais deletéria do que a infecção propriamente dita. Esta teoria é especialmente notável na sepse severa, na qual a excessiva produção de citocinas pró-inflamatórias causa aumento na permeabilidade capilar, injúria tecidual e múltipla falência orgânica [(revisado por Matsuda (19)]. Trabalhos *in vitro* tem sugerido que as vias de NF-kB e da AP-1 controlam vários genes inflamatórios, tais como os de iNOS, moléculas de adesão e citocinas (198, 213). Um dos mediadores cruciais pela indução da resposta inflamatória sistêmica é o TNF- α . Já foi descrito que a administração de TNF- α em animais de experimentação é capaz de reproduzir os mesmos sinais observados durante a sepse ou endotoxemia (revisado por Jean-Baptiste (11)). A IL-6 é um importante biomarcador de severidade de sepse, enquanto que a IL-10 serve como um imunomodulador para contrabalancear a resposta inflamatória intensa que ocorre durante esta síndrome. É descrito que quando há uma falha na liberação destes mediadores inflamatórios, aumentam as chances de ocorrer o óbito rapidamente, que por sua vez está relacionado com a falência orgânica, principalmente hepática e renal [(revisado por Jean-Baptiste (11)]. As nossas análises demonstraram que o tratamento com Rosiglitazona diminuiu a produção de citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF- α e IL-6, sugerindo uma modulação negativa, envolvendo o NF-kB na produção citocinas. Neste contexto, Zingarelli e cols (198) demonstraram o mesmo perfil de citocinas pró-inflamatórias em plasma de ratos sépticos tratados com agonistas de PPAR γ . Neste trabalho foi sugerindo a modulação negativa de I κ B quinase, proteína AP-1 e NF-kB pela Ciglitazona. Continuando com as nossas análises no perfil das citocinas, os nossos resultados mostraram um aumento da produção de citocina anti-inflamatória a IL-10. Uma importante ação anti-inflamatória exercida pelo PPAR γ também foi descrita. Kim e cols. (214) demonstraram que o tratamento com agonistas sintéticos de PPAR γ , pioglitazona e Rosiglitazona foram capazes de aumentar a expressão de IL-10 em tecido pulmonar de camundongos asmáticos, melhorando a condição ou escore clínico destes animais. Estes estudos reforçam os dados encontrados em nosso trabalho.

O processo de migração celular representa um importante mecanismo de resposta imune contra a infecção. Em mamíferos, existe um grupo de citocinas quimiotáticas, denominado quimiocinas, que são importantes indutores da migração leucocitária. As quimiocinas são produzidas por e atuam em diversos tipos celulares, incluindo monócitos/macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, mastócitos, células T e B, células endoteliais na presença de diversos estímulos, como LPS, IL-1, TNF- α , LTB $_4$ e INFs, através da interação com seus receptores

(65, 70). Na verdade, existe uma relação promíscua entre esses receptores e as quimiocinas. Uma única quimiocina pode ligar-se a vários receptores, bem como um único receptor pode promover a sinalização por diferentes quimiocinas. As quimiocinas estão implicadas em várias patologias, como esclerose múltipla, AIDS, aterosclerose e sepse. Em nosso trabalho focamos na análise das quimiocinas proteína quimiotática de monócitos CCL2 e na proteína murina CXCL1. O nosso grupo tem estudado ativamente o papel da quimiocina proteína quimiotática de monócitos CCL2 na fisiopatologia da sepse. Foi mostrado previamente que animais deficientes de CCL2 (CCL2^{-/-}) foram mais suscetíveis a endotoxemia, com uma redução nos níveis de IL-10 (88), mostrando a regulação positiva desta citocina. Ainda, em outro trabalho publicado no mesmo ano, o grupo mostrou que o tratamento com a PAF acetil hidrolase (PAF-AH) uma enzima que degrada um importante mediador inflamatório, o PAF, foi capaz de aumentar níveis peritoneais de CCL2, IL-6 e MIF após a administração sistêmica de LPS ou em camundongos submetidos à CLP (88). Reiterando estes estudos, Bozza e cols (30), determinaram em estudo clínico de análise multiplex, o perfil de citocinas em pacientes com sepse. Neste estudo foi ressaltado a relevância do CCL2 como um importante indicador de melhora no prognóstico na sepse, resultando portanto, em aumento da sobrevida destes pacientes. Corroborando com estes dados, um estudo recente do nosso grupo mostra que tanto a IL-10 quanto o CCL2 também estão envolvidos no aumento da eliminação bacteriana, por um mecanismo dependente de CCR2. O trabalho mostra que o aumento a quimiocina CCL2 confere um efeito protetor nos animais submetidos à CLP e, conseqüentemente, aumenta a sobrevida de animais sépticos (Gomes RN, dados não publicados). No nosso trabalho também observamos níveis aumentados de CCL2 24 h após a indução do CLP e o tratamento com Rosiglitazona potencializou este aumento. Acreditamos principalmente que a produção diminuída de IL-6 e aumentos na produção de CCL2 e IL-10 seja atribuído, pelo menos em parte, ao aumento da sobrevida dos animais observados no nosso modelo.

A proteína murina CXCL1 induz os mesmos efeitos biológicos da quimiocina CXCL2 humana, tais como quimiotaxia de neutrófilos e aumento da expressão da molécula de adesão CD11b/CD18 por estas células, sendo denominadas então de proteína homóloga funcional da IL-8 humana. A quimiocina CXCL1 é liberada por macrófagos residentes e desempenha um papel importante no acúmulo de neutrófilos induzidos por produtos bacterianos como o LPS (65). Em nossos experimentos quando dosamos a quimiocina CXCL1, não observamos diferenças significativas nos níveis deste mediador no lavado peritoneal dos animais submetidos tanto submetidos à CLP quanto no *sham*. No entanto, observamos que o tratamento com Rosiglitazona foi capaz de aumentar de maneira significativa os níveis de CXCL1 quando comparados ao grupo CLP. Em contradição, apesar dos níveis de CXCL1

estarem aumentados, houve uma diminuição na migração de neutrófilos. Estes resultados corroboram com um trabalho de Zingarelli e colaboradores (181). Os autores observaram em um modelo de choque endotóxico em camundongos, que o tratamento com o ligante endógeno de PPAR γ , 15dPGJ₂, foi capaz de diminuir o infiltrado de neutrófilos para a cavidade peritoneal e pulmonar, melhorando a taxa de sobrevivência dos animais. Neste trabalho, foi visto que o aumento da expressão de moléculas de adesão, como VCAM-1 e ICAM-1 após a administração sistêmica de LPS foi visivelmente inibida pelo pré-tratamento com o 15dPGJ₂. E ainda, que este efeito estaria diretamente relacionado com a diminuição da expressão do fator de transcrição NF κ B, o que poderia implicar em um efeito clínico benéfico na sepse. Apesar de não termos avaliado a expressão de moléculas de adesão no nosso modelo, hipotetizamos no entanto, que possa ter havido uma menor expressão destas moléculas, o que poderia explicar em parte, um menor infiltrado de células para o sítio de infecção observado previamente no nosso estudo. Uma outra hipótese seria o envolvimento de um outro mediador inflamatório quimiotático para neutrófilo nesta resposta, como por exemplo o LTB₄, que neste contexto seria mais importante que o próprio CXCL1, e que quando este é inibido o número de neutrófilos diminui.

Continuando com as nossas análises de marcadores de inflamação/infecção, um outro parâmetro analisado foi a indução/formação de corpúsculo lipídicos. Os corpúsculos lipídicos são inclusões citoplasmáticas ricas em lipídios que aumentam em número e tamanho após estímulos inflamatórios. Possuem um importante papel na formação de eicosanóides durante o processo inflamatório, funcionando como reservatório intracelulares de enzimas e citocinas (40, 41). Observamos um aumento na biogênese de corpúsculos lipídicos em leucócitos da cavidade peritoneal dos animais após o CLP. Estes dados estão de acordo com Pacheco e cols (39) que mostram um aumento na formação destas organelas em pacientes com sepse, bem como em animais submetidos à CLP. Em nossos estudos, os animais submetidos à CLP e tratados com Rosiglitazona observamos uma diminuição na formação de corpúsculos lipídicos.

Um trabalho do nosso grupo (215) mostrou a participação dos receptores PPAR γ na biogênese destas organelas. O estudo ressalta que frações fosfolipídicas geradas durante a oxidação da lipoproteína LDL (LDLox), como os fosfolipídios *PAF-like* e aqueles com atividade agonista de PPAR γ atuaram de forma sinérgica na formação de corpúsculos lipídicos. No entanto, estes fosfolipídios não tiveram efeito na formação destas organelas via cascata do ácido araquidônico, mostrando que agonistas de PPAR γ sinergizam de forma estímulo-específica na formação de corpúsculos lipídicos em macrófagos. Em outro trabalho foi mostrado que o agonista de PPAR γ , o tratamento das células com a Rosiglitazona

potencializou a formação de corpúsculos lipídicos acompanhado do aumento na produção de PGE₂ em estudo *in vitro* com macrófagos estimulados com bacilo Calmette-Guérin (BCG) via receptor TLR2. Neste trabalho, estes efeitos foram inibidos pelo antagonista GW9662 (216). Nagy e cols (217) já mostrava a participação de ligantes de PPAR γ no controle do metabolismo lipídico e a formação de células espumosas.

Como descrito anteriormente, as TZDs, como a Rosiglitazona são drogas sensibilizadoras da ação da insulina e como agonista de PPAR γ ativam a transcrição de genes responsáveis pela regulação do metabolismo glicídico, lipídico e diferenciação celular, possuindo um importante papel na homeostase da glicose (218). A partir disto, fomos verificar se a Rosiglitazona poderia interferir com a glicemia em nosso modelo. Em nossos resultados verificamos que os animais apresentaram uma acentuada hipoglicemia 24 h após CLP, e que o tratamento com Rosiglitazona não alterou este efeito comparando com o grupo CLP. No nosso estudo o efeito protetor da Rosiglitazona foi atribuído aos seus efeitos antiinflamatórios em um mecanismo independente de seus efeitos diretos no metabolismo glicídico.

A sepse também envolve alterações microcirculatórias que estão relacionadas com a diminuição da perfusão tecidual, hipóxia e falência orgânica. Estas alterações microcirculatórias incluem efeitos, tais como diminuição na densidade capilar funcional e aumento na heterogeneidade do fluxo sanguíneo caracterizado por fechamento dos capilares ou por capilares perfundidos intermitentemente (140). Durante a sepse, o cérebro é um dos primeiros órgãos afetados, mas os mecanismos associados com a encefalopatia séptica ainda não estão completamente esclarecidos (155). A partir disto, uma outra parte do nosso trabalho foi estudar como a Rosiglitazona poderia interferir na microcirculação sistêmica e cerebral de animais sépticos em um modelo de microscopia intravital. Alguns trabalhos têm focado no estudo da microcirculação na sepse e conseqüentemente em manobras terapêuticas para monitorar a função microcirculatória e contribuir para o diagnóstico e tratamento da sepse (140, 145, 219-221). O nosso estudo é o primeiro a demonstrar o efeito anti-inflamatório de agonistas de PPAR- γ na microcirculação cerebral, com significativas alterações na densidade capilar funcional e na interação leucócito-endotélio em animais submetidos à CLP e tratados com Rosiglitazona.

Nos nossos resultados, nós verificamos que a administração de Rosiglitazona melhorou a microcirculação cerebral cortical e diminuiu o rolamento e aderência dos leucócitos durante a sepse experimental. Em nosso modelo de sepse moderada, os animais apresentaram uma importante redução no número de capilares perfundidos, os quais podem aumentar a resistência cerebrovascular e diminuir o transporte de glicose e oxigênio para o tecido (222), embora não tenhamos observado nenhuma alteração significativa nos parâmetros

hemodinâmicos sistêmicos, como a pressão arterial média e frequência cardíaca. Estes resultados corroboram com as observações feitas em um estudo experimental de sepse utilizando ovelhas fêmeas, nas quais a microcirculação cerebral foi alterada mesmo quando a perfusão global se encontrava mantida (143). Além do mais, nossos resultados demonstraram que o tratamento com Rosiglitazona reverteu a rarefação capilar em camundongos sépticos. E este efeito observado foi devido a ativação do PPAR γ , já que a administração do antagonista de PPAR γ , o GW9662 preveniu este efeito.

Trabalhos ressaltam o papel da Rosiglitazona na microcirculação. Um estudo recente de Ashoff e cols mostram que o tratamento com agonista de PPAR γ , a pioglitazona, foi capaz de prevenir a rarefação capilar da microcirculação da musculatura cardíaca e esquelética em ratos diabéticos. Este estudo resalta o seu importante papel na preservação estrutural da microcirculação durante a diabetes, e mostra que este feito independe da atividade antihiperclêmica ou angiogênica das glitazonas.

Os efeitos protetores dos agonistas de PPAR γ no cérebro também foram mostrados previamente em um modelo de hipertensão em ratas, nas quais o tratamento com agonista de PPAR γ preveniu a rarefação microvascular, o remodelamento e a hipertrofia da camada média das artérias cerebrais (223). Embora neste estudo, a Rosiglitazona tenha sido administrada como um tratamento crônico, o qual aponta uma importante diferença do protocolo usado por eles e o nosso protocolo e que possa implicar diferentes mecanismos moleculares. Outro trabalho mostrou que a administração de Rosiglitazona possui propriedades neuroprotetoras em camundongos submetidos a modelo de isquemia e reperfusão. E este feito foi atribuído pelo menos em parte, a sua atividade antiinflamatória no cérebro, mostrando seu efeito protetor contra o acidente vascular encefálico (AVE) (224).

Nós observamos em nossos estudos uma diminuição substancial tanto do rolamento quanto da aderência de leucócitos nas vênulas pós-capilares cerebrais após o tratamento com Rosiglitazona e estes dados são igualmente consistentes com a diminuição da atividade da MPO no cérebro de animais 24 h após CLP e tratados com Rosiglitazona. De forma interessante, Comin e cols (225), em um modelo de sepse em ratos, observaram um aumento da atividade de MPO no cérebro em diferentes tempos de análise, sendo mais pronunciado 24 h depois do CLP, e este efeito foi relacionado com um aumento na produção de citocinas inflamatórias e com edema local. Em nosso modelo, o tratamento com Rosiglitazona diminuiu a atividade da MPO. É igualmente importante ressaltar que a redução dos componentes envolvidos no processo inflamatório e aumento da perfusão cerebral estão associados com a melhora do escore clínico de gravidade e com a sobrevivência dos animais (Reis e cols, dados não publicados).

Bauer e colaboradores demonstraram previamente (226) que a ativação e o recrutamento de leucócitos circulantes da microcirculação é uma característica determinante da lesão inflamatória em diferentes leitos vasculares de animais sépticos e provavelmente explica o dano microvascular cerebral observado em nosso estudo. O efeito anti-inflamatório da Rosiglitazona foi abolido pela administração prévia de GW9662. Estes resultados indicam que as alterações microvasculares são dependentes de sinalização específicas envolvendo o PPAR γ , sugerindo desta forma, uma regulação da transcrição genes alvo regulados pelo PPAR γ em animais sépticos. Estes dados em conjunto fornecem evidências do envolvimento da ativação do PPAR γ na interação leucócito-endotélio e das alterações na densidade capilar na sepse experimental. Nossos resultados sugerem que o PPAR γ como um alvo potencial para a proteção do cérebro contra a disfunção microvascular na sepse, e conseqüentemente uma melhora na perfusão cerebral.

Um dos controles do organismo contra a infecção é a eliminação bacteriana por células da resposta imune inata, como os macrófagos e neutrófilos. Os neutrófilos são as primeiras células do sistema imunológico que chegam para eliminar o patógeno invasor (227). Estas células quando ativadas, produzem uma série de mediadores pró-inflamatórios (TNF- α , IL-1 β), ROS e NO. O excesso na produção desses mediadores está envolvido no dano tecidual, aumento da permeabilidade vascular e falência orgânica (227). Assim, ao reduzir a migração de neutrófilos para o sítio de infecção, ocorre uma diminuição no dano aos órgãos e aos tecidos que são causados por esse tipo celular. Por outro lado, a eliminação bacteriana é essencial para impedir a disseminação do microorganismo.

Prosseguindo com os nossos estudos, na tentativa de avaliar o papel da Rosiglitazona na eliminação bacteriana, fizemos a contagem do número de UFC na cavidade peritoneal de animais tratados e não tratados com Rosiglitazona (0,5 mg/kg), após 24 h da indução da sepse através do modelo CLP. Em nossos resultados, observamos que o tratamento com Rosiglitazona permitiu uma redução significativa no número de UFC recuperadas a partir do lavado peritoneal, corroborando com a hipótese de que os efeitos desta droga seriam parcialmente responsáveis pela diminuição da mortalidade dos animais sépticos. De maneira interessante, em um trabalho de Stengenga e cols (228), também foi possível observar um efeito protetor da Ciglitazona, no crescimento bacteriano em um modelo de pneumonia induzida por *Streptococcus pneumoniae* em camundongos. Neste artigo, o pós-tratamento com ciglitazona (5 mg/kg, i.p.) imediatamente e 24 h após a inoculação intranasal com as bactérias, se observou uma diminuição da carga bacteriana (UFC) nos pulmões destes animais. Estes dados reiteram que os ligantes de PPAR γ de algum modo interferem no crescimento bacteriano, em diferentes modelos experimentais de sepse.

A partir disto, o nosso objetivo foi verificar se a redução no número de UFC presentes no lavado peritoneal de animais tratados com Rosiglitazona estava relacionada a efeitos diretos da droga sobre o crescimento bacteriano, ou seria um efeito indireto da droga. Para tanto, realizamos ensaios *in vitro* com *E. coli*, uma bactéria amplamente encontrada na microbiota intestinal. As bactérias foram incubadas durante 2 h na presença do agonista de PPAR γ , Rosiglitazona, ou de seu antagonista GW9662 em diferentes concentrações. Pudemos constatar que não há um efeito direto da Rosiglitazona sobre o crescimento destas bactérias e provavelmente o efeito da Rosiglitazona sobre as contagens de UFC, por exemplo, depende da resposta do hospedeiro.

Como descrito anteriormente existem alguns trabalhos ressaltando o envolvimento dos PPAR γ na modulação da resposta inflamatória na sepse em modelos experimentais animais e ensaio clínicos envolvendo seres humanos (197, 198, 229-231). No entanto, o mecanismo pelo qual a ativação do PPAR γ pode modular o aumento na eliminação bacteriana, aumentando a sobrevivência dos animais ainda não está esclarecida. Recentemente foi descrito o envolvimento de um outro subtipo de PPAR, o PPAR α neste efeito. O artigo descreve que camundongos deficientes, ou seja, com uma mutação pontual ou nocautes para PPAR α , em modelo de CLP, obtiveram um aumento na carga bacteriana em 24 h, e que neste estudo foi acompanhado por uma menor sobrevivência dos animais. Este estudo também ressaltou que a deficiência ou a ausência na expressão de PPAR α nestes animais confere uma desvantagem na sobrevivência durante a sepse e que o PPAR α exerce um importante papel na manutenção da função imune (232). De fato, outros efeitos anti-inflamatórios do PPAR α também já foram mostrados. Foi descrito por exemplo, que a ativação do PPAR α está relacionada com a inibição de COX-2 e com a redução da produção de diversas citocinas (como IL-1, IL-6 e TNF- α) através da diminuição da atividade do NF- κ B (233, 234).

Ainda na busca para elucidar o mecanismo de ação pelo qual o PPAR γ e seu agonista, a Rosiglitazona poderia exercer os efeitos na eliminação bacteriana e conseqüentemente, na melhora de sobrevivência dos animais, resolvemos analisar também o perfil da produção das espécies reativas de oxigênio (ROS). É bem descrito que durante o processo inflamatório/infeccioso, a exposição de células fagocíticas como macrófagos e neutrófilos, bem como células endoteliais e musculares lisas a produtos bacterianos e a citocinas como IL-1, TNF- α e IFN- γ levam estas a produzirem e liberarem espécies reativas de nitrogênio (RNS) e oxigênio (ROS), como por exemplo, o NO, superóxido (O_2^-) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (235, 236). A enzima responsável pela produção de O_2^- e H_2O_2 é a NADPH oxidase, que precisa estar ligada a membrana celular para exercer a função de uma oxidase. É bem descrito na literatura o importante papel do NO na defesa do hospedeiro contra a infecção,

atuando de maneira sinérgica com outras espécies reativas de oxigênio na eliminação bacteriana (105, 237). Existem muitas evidências mostrando que muitos efeitos deletérios do NO são de fato, mediados pelo peróxido nítrico. Quando produzidos juntos, O_2^- e NO reagem para produzir peróxido nítrico. O peróxido nítrico é um agente oxidante potente e o mecanismo de ação da sua atividade microbicida deve-se a peroxidação lipídica, inativação do transporte de sódio, oxidação de diversas proteínas, incluindo a nitração de resíduos de tirosina, que resultam em perda de atividade de enzimas e de receptores, e por último, em dano do DNA (238). Já foi demonstrado que o peróxido nítrico reduz a atividade quimiotática de leucócitos via nitração de resíduos de tirosina de neutrófilos, que conseqüentemente inibe a polimerização de actina (239). Além disso, seus efeitos também incluem a diminuição da interação leucócito-endotélio (93) devido à diminuição da expressão da molécula de adesão P-selectina de células endoteliais (240).

Em nossos estudos *in vitro*, observamos que células do sangue de animais submetidos à CLP incubadas com PMA na presença da catalase, aumentam de maneira significativa a produção intracelular de peróxido de hidrogênio quando comparadas com as células do grupo *sham*. A presença de Rosiglitazona neste ensaio, parece de alguma forma aumentar a produção de ROS nas células provenientes de animais sépticos quando comparada às células de animais controles. Estes achados corroboram com um trabalho de Kim e cols. (241), em que os autores ressaltaram as propriedades microbicidas das espécies reativas de oxigênio em um modelo de peritonite pela injeção de *E. coli* em ratos. Neste trabalho, tanto o NO quanto o peróxido nítrico foram responsáveis pela inibição da proliferação bacteriana e pela atividade bactericida *in vivo*. Além disso, células como eritrócitos foram capazes de aumentar mortalidade de animais por um mecanismo sequestrador de NO e principalmente pela inibição da formação do peróxido nítrico. Em um outro trabalho de Hickman-Davis (242), a importância da atividade microbicida das espécies reativas de oxigênio também foi ressaltada. Foi mostrado que o papel de uma proteína surfactante presente nos pulmões (SP-A) no reconhecimento e na eliminação bacteriana é devido à ativação direta do metabolismo oxidativo, bem como o aumento da expressão da NO sintase (NOS) de macrófagos alveolares. Curiosamente em nosso estudo, embora tenhamos observado um aumento da produção de peróxido de hidrogênio pela Rosiglitazona, o que em parte poderia atribuir a sua atividade microbicida, não observamos alterações nos níveis de NO extracelular nos animais sépticos tratados com Rosiglitazona quando comparados aos animais submetidos à CLP. Em nossos estudos com animais, sugerimos que o mecanismo de ação pelo qual o agonista de PPAR γ exerce seu efeito na eliminação bacteriana e melhora a sobrevivência dos animais em nossos estudos depende da ativação do metabolismo oxidativo de células fagocíticas, com um

aumento na produção de H_2O_2 intracelular; que poderiam ser produzidos pelos monócitos/macrófagos ou pelos neutrófilos que embora em menor número estarem mais ativos e eficientes.

Ainda interessados no mecanismo de ação microbicida da Rosiglitazona, decidimos verificar se o efeito observado em nosso modelo de sepse com animais, também poderia ser reproduzido em um estudo *in vitro* em cultura de neutrófilos humanos incubados com *E. coli*. De maneira interessante vimos que a Rosiglitazona foi igualmente eficaz em aumentar a eliminação bacteriana de maneira dependente de concentração, ou seja, quanto maior a concentração da droga, maior efeito microbicida da Rosiglitazona neste experimento. Desta forma, o tratamento com Rosiglitazona demonstrou reduzir a carga bacteriana de maneira bastante eficaz em ambos os modelos experimentais, tanto em animais submetidos à CLP, assim como em ensaios *in vitro* com neutrófilos humanos estimulados com *E. coli*.

Na luta contra infecção, os PMNs possuem várias funções para conter e proteger o organismo da infecção. Dentre os quais estão a fagocitose (113, 243), a produção de ROS, a degranulação (244), e finalmente por netose envolvendo NETs (115). As NETs são estruturas formadas por fibras de cromatina associadas a proteínas de grânulos citoplasmáticos (119, 135) que confinam e matam patógenos de maneira bastante eficiente, assim como previnem o dano colateral ao tecido do hospedeiro por reter proteases tóxicas e reduzir a sua atividade proteolítica (113). É descrito que um dos mecanismos para a netose ou morte celular induzido pela formação de NETs, deve-se a principalmente à descondensação da cromatina que ocorre com a migração da elastase dos grânulos primários para o núcleo dos neutrófilos, onde estas enzimas degradariam as histonas (245). É igualmente descrito que, a MPO, enzima presente nas NETs e igualmente um marcador de atividade neutrofílica, também migra para o núcleo sinergizando com a elastase para a descondensação de cromatina em um mecanismo ainda desconhecido, independente de atividade enzimática. É importante ressaltar que pacientes deficientes de MPO são incapazes de formar NETs, ficando mais suscetíveis a infecções (114, 246). De fato, Parker e cols (117) mostraram que a MPO associada às NETs é ativamente capaz de matar bactérias. Neste estudo, os neutrófilos foram estimulados com PMA, e a atividade da MPO medida. Foi verificada que esta enzima é liberada pelos neutrófilos de 2 a 4 h após o estímulo, concomitantemente com a formação das NETs. Além disso, a adição de H_2O_2 em presença de NETs neste estudo resultou em maior da atividade microbicida por estas células, ressaltando o sinergismo entre a MPO e ROS na eliminação do patógeno. Ainda neste contexto, em um trabalho recente, Remijesen e cols (247) ressaltaram a importância da liberação de ROS na liberação de NETs. O trabalho mostra que pacientes com doença

granulomatosa crônica (DGC) são incapazes de produzir ROS por um defeito na NADPH e portanto são deficientes na formação destas redes extracelulares (247).

A partir disto, resolvemos investigar o mecanismo pelo qual a Rosiglitazona elimina as bactérias e seu possível envolvimento com a formação destas redes induzidas pelos neutrófilos. Para isto utilizamos dois estímulos inflamatórios distintos, o LPS e *E. coli* em diferentes experimentos. Inicialmente vimos que neutrófilos estimulados com diferentes concentrações de LPS por uma hora foram capazes de induzir a formação de NETs e este feito não pareceu ser dependente da concentração administrada. Concentrações menores do estímulo inflamatório foram suficientes pra induzir a formação das mesmas. A presença de Rosiglitazona na cultura de PMNs potencializou este efeito, sendo mais evidente a visualização em concentrações menores de LPS. É importante ressaltar que embora o LPS tenha induzido o aumento da cromatina descondensada no meio extracelular, também denominado “*hot spots*”, ou pontos quentes, a presença da Rosiglitazona permitiu a visualização da formação destas estruturas. Observamos também que o efeito do LPS em induzir a formação das NETs não parece ser dependente do tempo de incubação, haja visto que estes efeitos também foram reproduzidos em uma cinética mais precoce, como em 30 minutos, efeito este que também foi potencializado pela presença de Rosiglitazona.

Em nossos estudos verificamos também que este efeito da Rosiglitazona também foi reproduzido quando as células foram estimuladas não somente com um componente de parede celular das bactérias, como o LPS, mas igualmente com a bactéria *E. coli*. O tratamento das células com Rosiglitazona foi igualmente eficaz em potencializar a formação das NETs. Os efeitos observados em ambos os estímulos parecem ser mediados por receptor uma vez que o antagonista funcional do PPAR γ , o GW9662, foi capaz de reverter este efeito em presença de LPS e Rosiglitazona ou *E. coli* e Rosiglitazona. Pelos nossos resultados este efeito não parece ser um efeito direto dos ligantes de PPAR γ sobre as células não estimuladas. De fato, como mostrado em nossos experimentos, as células, quando tratadas com Rosiglitazona ou com o antagonista de PPAR γ na ausência de estímulos inflamatórios, não foram capazes de induzir NETs, reforçando a idéia de que a Rosiglitazona funcionaria como um potencializador deste efeito.

Prosseguindo com as investigações sobre os efeitos do receptor PPAR γ na formação das redes extracelulares decidimos avaliar neste estudo, a liberação de um marcador, ou melhor, um componente de NETs, a proteína histona (H3) em neutrófilos estimulados igualmente com LPS ou *E.coli*. As NETs contém proteínas histonas H1, H2A, H2B, H3 e H4, assim como grânulos de outras proteínas, incluindo elastase neutrofílica, mieloperoxidase e proteínas bactericidas (BP) (115). Uma vez ligadas às NETs, a associação de histonas e proteínas

antimicrobianas eliminam o patógeno (122). A descondensação da cromatina, a qual é particularmente densa em neutrófilos maduros, está associada com a citrulinização da histona H3 pela conversão de histona arginina a resíduos de citrulina (248). As análises por *Western Blotting* revelaram que a Rosiglitazona apresentou um resultado favorável ao aumentar a liberação da histona H3 quando as células foram estimuladas tanto com LPS quanto por *E. coli*. O receptor de PPAR γ parece estar envolvido igualmente nesta resposta já que o antagonista GW9662 diminuiu a liberação desta proteína na presença de Rosiglitazona e dos estímulos inflamatórios.

A etapa seguinte do nosso estudo foi correlacionar o efeito da Rosiglitazona na formação de NETs com aumento da eliminação bacteriana em ensaio *in vitro*. Neste estudo, as células foram estimuladas previamente com LPS em seguida tratadas com Rosiglitazona na presença ou ausência do antagonista GW9662. Foram analisadas a eliminação bacteriana total, a extracelular mediada por NETs e intracelular mediada pela fagocitose. Em nossos resultados observamos que nas células tratadas com Rosiglitazona houve um aumento na eliminação bacteriana total, que neste estudo foi correlacionado com a eliminação bacteriana extracelular mediado pelas NETs. Além disso, este efeito foi inibido pela presença do antagonista GW9662, sugerindo que esta resposta é mediada pelo receptor PPAR γ . Além disso, os efeitos da Rosiglitazona em aumentar a formação de NETs corroboram com os resultados obtidos quando analisamos a celularidade do lavado peritoneal dos animais submetidos à CLP e tratados com Rosiglitazona. Sugerimos que a diminuição de células totais, assim como de neutrófilos observada em nosso estudo poderia estar fortemente relacionada com a morte celular mediada por netose.

É importante ressaltar que o nosso trabalho é o primeiro a demonstrar a participação de agonistas de PPAR γ na formação destas redes extracelulares induzida por neutrófilos, embora existam outros trabalhos ressaltando a importância das NETs no combate de microorganismo em diferentes modelos experimentais. Por exemplo, um trabalho realizado pelo grupo de Yost e cols (249) resalta a importância das NETs no sistema imune inato. O trabalho mostra que neutrófilos de crianças recém nascidas e prematuras estimulados com LPS ou PAF, possuem um defeito na formação de NETs, portanto uma falha no mecanismo de defesa contra bactérias, levando a estes indivíduos a uma maior susceptibilidade às infecções. Neste trabalho também foi mostrado, que embora a produção de ROS pelas células estivesse mantida, como um mecanismo importante no disparo para formação dessas redes extracelulares, a sinalização foi insuficiente para induzir a formação das mesmas pelos neutrófilos.

A formação das NETs por estas células também é citada na fisiopatologia da tuberculose. É descrito que os neutrófilos são essenciais para a formação do granuloma durante a infecção crônica por *Mycobacterium tuberculosis* (250), no entanto, este mecanismo ainda é controverso. É discutido se eles são capazes de eliminar ativamente o *M tuberculosis*, controlando desta forma a infecção (251), ou se eles contribuem ainda mais para a fisiopatologia da doença (252, 253). Em um estudo *in vitro* com *M. tuberculosis*, Kichik e cols (254) mostraram que este patógeno intracelular foi capaz de induzir um efeito citotóxico nas células e induzir a formação de NETs pelos neutrófilos de maneira tempo dependente. Neste trabalho, essas redes extracelulares se mostraram eficientes em capturar o patógeno, no entanto, falharam na sua eliminação.

Interessantemente, em outro trabalho, de Guimarães-Costa e cols. (127), foi ressaltado que formas promastigotas de *Leshimania amazonensis* são capazes de induzir a liberação de NETs através de um componente estrutural presente de membrana celular do parasito, o lipofosfoglicano. Foi descrito ainda que a atividade leshimanicida associada às NETs é em parte mediada pelas histonas presentes nestas redes extracelulares.

De uma forma reveladora, os nossos estudos com neutrófilos humanos e NETs sugere que o efeito na eliminação bacteriana induzido pela Rosiglitazona seja um mecanismo que envolve principalmente a netose mediada pela ativação do receptor PPAR γ . Sugerimos que o mecanismo envolvido nesta resposta possa envolver eventos como a produção de ROS, incluindo o peróxido de hidrogênio, que possui atividades que influenciam a fosforilação de tirosina e outras vias de transdução de sinais que regulam a formação das NETs.

Em conjunto, nossos estudos indicam que a Rosiglitazona atuou em diversos parâmetros da fisiopatologia da sepse, modulando a resposta inflamatória, aumentando a eliminação bacteriana, melhorando o quadro clínico, melhorando a circulação sistêmica e cerebral e diminuindo a mortalidade em camundongos sépticos. É importante ressaltar que é de extrema importância o entendimento dos mecanismos moleculares envolvidos na sepse, para que possa servir de potencial manobra ou intervenção terapêutica no futuro.

6 CONCLUSÕES

- ✓ O agonista de PPAR γ Rosiglitazona diminuiu a migração de neutrófilos no foco infeccioso, assim como síntese de citocinas, como o TNF- α e IL-6, o número de corpúsculos lipídicos e a carga bacteriana, sem interferir na glicemia;
- ✓ O tratamento com Rosiglitazona aumentou os níveis de IL-10, CCL2 e CXCL1, bem como o escore clínico e a sobrevivência de camundongos não isogênicos submetidos tanto à CLP quanto à sepse severa em modelo de injeção de macerado fecal;
- ✓ No estudo de microcirculação cerebral, a Rosiglitazona melhorou a perfusão tecidual cerebral, com diminuição do rolamento e aderência dos leucócitos, da rarefação capilar e da produção de MPO. Os efeitos da Rosiglitazona foram independentes dos efeitos hemodinâmicos;
- ✓ A redução da carga bacteriana de animais submetidos à CLP e tratados com Rosiglitazona não se deve à intervenções diretas do agonista de PPAR γ no crescimento bacteriano;
- ✓ A Rosiglitazona diminuiu a carga bacteriana e melhorou a taxa de sobrevivência após CLP parece depender em parte, da produção de ROS, mas não interferiu na produção de NO;
- ✓ O tratamento *in vitro* com Rosiglitazona em diferentes concentrações aumentou a eliminação bacteriana em co-cultura de PMNs humanos e com *E. coli*, e este efeito mostrou ser dependente de concentração administrada;
- ✓ O tratamento *in vitro* com Rosiglitazona aumentou a formação de NETs, assim como a liberação de histona em células previamente estimuladas com LPS ou *E. coli*. O antagonista de PPAR γ reverteu estes efeitos;
- ✓ O tratamento das células com Rosiglitazona aumentou a eliminação bacteriana extracelular por neutrófilos humanos, e este efeito foi associado com o aumento na formação de NETs em células pré estimuladas com LPS ou *E. coli*.

6.1 CONCLUSÃO FINAL:

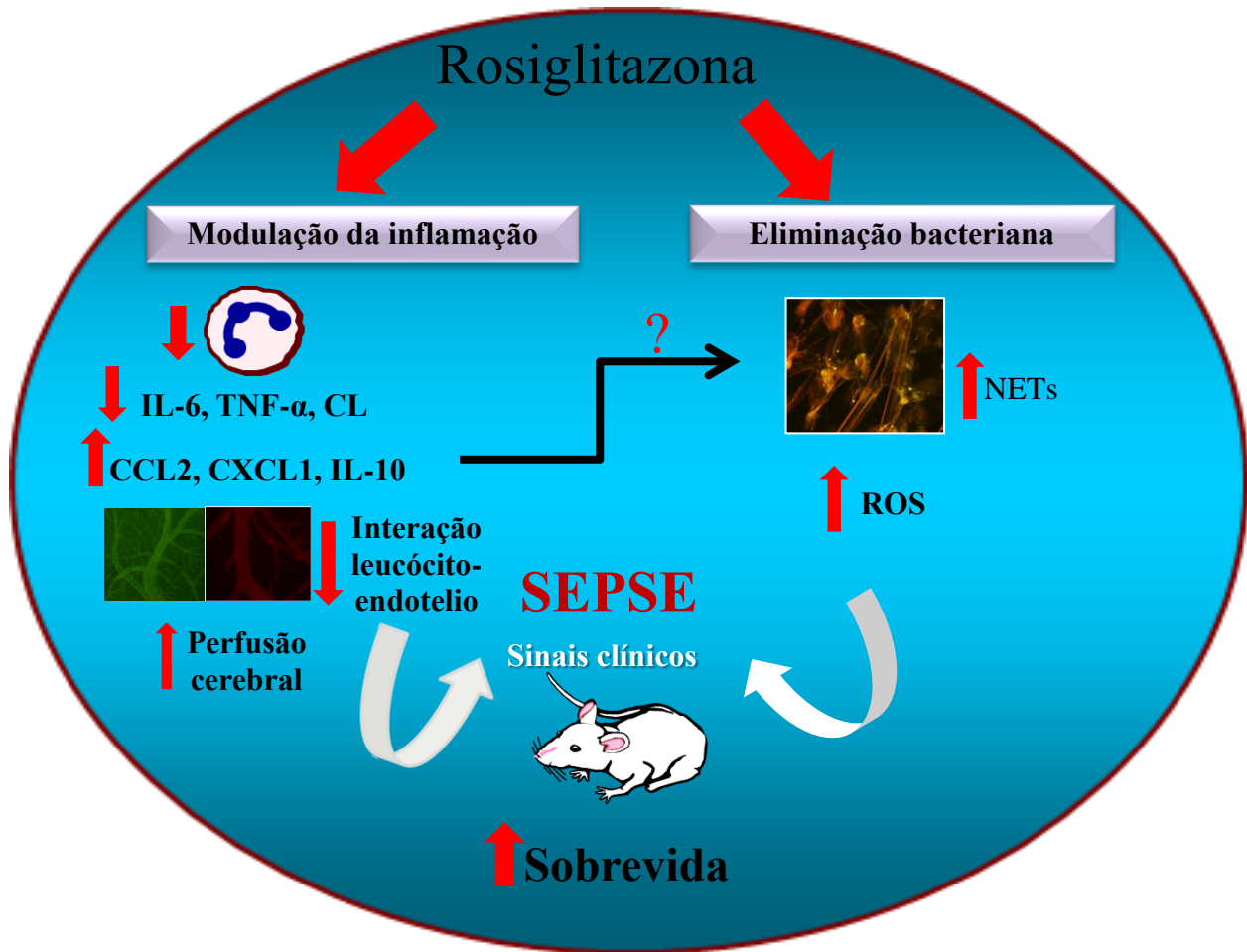


Figura 6.1: Efeito anti-inflamatório da Rosiglitazona em animais sépticos: a Rosiglitazona é capaz de modular a inflamação por diminuir o infiltrado de neutrófilos, diminuir a produção de citocinas inflamatórias e corpúsculos lipídicos, aumentar a produção de quimiocinas de migração celular como a CCL2 e CXCL1, assim como a produção de citocinas anti-inflamatórias (IL-10). A Rosiglitazona também melhora a microcirculação cerebral em diminuir a interação leucócito-endotélio e aumentar a densidade capilar funcional. Além disso, a Rosiglitazona aumenta a eliminação bacteriana por modular a formação de redes extracelulares formadas por neutrófilos (NETs) e a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). Todos estes fatores somados juntos melhoram os sinais clínicos e aumentam a sobrevida dos animais sépticos. Também hipotetizamos se a produção aumentada de quimiocinas e citocinas anti-inflamatórias poderia interferir com o aumento da eliminação bacteriana mediada por netose.

Referências Bibliográficas

1. Bone RC, Sibbald WJ, Sprung CL. The ACCP-SCCM consensus conference on sepsis and organ failure. *Chest*. 1992;101(6):1481-3.
2. Blackwell TS, Christman JW. Sepsis and cytokines: current status. *Br J Anaesth*. 1996 ;;77(1):110-7.
3. Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med*. 2001; 29(7):1303-10.
4. Dombrovskiy VY, Martin AA, Sunderram J, Paz HL. Rapid increase in hospitalization and mortality rates for severe sepsis in the United States: a trend analysis from 1993 to 2003. *Crit Care Med*. 2007;35(5):1244-50.
5. Silva E AM, Sogayar ACB, Mohovic T, Oliveira Silva CL,, Janiszewski M CRR, Sousa EF, Abe TP , Andrade J, Matos JD, Rezende E, Assunção M,, Avezum A RP, Faissol Janot de Matos G, Moreira Bento A,, Corrêa AD BVPaKE. Brazilian Sepsis Epidemiological Study (BASES study). *Crit Care*. 2004;8(4):R251-R60.
6. Zanon F CJ, Regina Schwerz MR, Cabeda EV, Ceretta DF, Luckemeyer GD; Beltrame C; Posenatto N. Sepsis in the Intensive Care Unit: Etiologies, Prognostic Factors and Mortality*. *Revista Brasileira de Terapia Intensiva*. 2008;Vol. 20 (2):128-34.
7. Silva E, Pedro Mde A, Sogayar AC, Mohovic T, Silva CL, Janiszewski M, et al. Brazilian Sepsis Epidemiological Study (BASES study). *Crit Care*. 2004;8(4):R251-60.
8. Dauphinee SM, Karsan A. Lipopolysaccharide signaling in endothelial cells. *Lab Invest*. 2006; 86(1):9-22.
9. Cohen J. The immunopathogenesis of sepsis. *Nature*. 2002 19-26;420(6917):885-91.
10. Nduka OO, Parrillo JE. The pathophysiology of septic shock. *Crit Care Nurs Clin North Am*. 201;23(1):41-66.
11. Jean-Baptiste E. Cellular mechanisms in sepsis. *J Intensive Care Med*. 2007 Mar-;22(2):63-72.
12. Roger T, Froidevaux C, Le Roy D, Reymond MK, Chanson AL, Mauri D, et al. Protection from lethal gram-negative bacterial sepsis by targeting Toll-like receptor 4. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(7):2348-52.
13. Doi K, Leelahavanichkul A, Yuen PS, Star RA. Animal models of sepsis and sepsis-induced kidney injury. *J Clin Invest*. 2009;119(10):2868-78.
14. Visintin A, Mazzone A, Spitzer JA, Segal DM. Secreted MD-2 is a large polymeric protein that efficiently confers lipopolysaccharide sensitivity to Toll-like receptor 4. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(21):12156-61.
15. Uematsu S, Akira S. [Innate immunity and toll-like receptor]. *Nihon Naika Gakkai Zasshi*. 2006;95(6):1115-21.

16. Kovach MA, Standiford TJ. Toll like receptors in diseases of the lung. *Int Immunopharmacol.* 2011;11(10):1399-406.
17. Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol.* 2010;11(5):373-84.
18. Creagh EM, O'Neill LA. TLRs, NLRs and RLRs: a trinity of pathogen sensors that cooperate in innate immunity. *Trends Immunol.* 2006; 27(8):352-7.
19. Matsuda A, Jacob A, Wu R, Aziz M, Yang WL, Matsutani T, et al. Novel therapeutic targets for sepsis: regulation of exaggerated inflammatory responses. *J Nihon Med Sch.* 2012;79(1):4-18.
20. Lien E, Ingalls RR. Toll-like receptors. *Crit Care Med.* 2002;30(1 Supp):S1-S11.
21. McGhan LJ, Jaroszewski DE. The role of toll-like receptor-4 in the development of multi-organ failure following traumatic haemorrhagic shock and resuscitation. *Injury.* 2012;43(2):129-36.
22. Janssens S, Beyaert R. A universal role for MyD88 in TLR/IL-1R-mediated signaling. *Trends Biochem Sci.* 2002;27(9):474-82.
23. Sriskandan S, Altmann DM. The immunology of sepsis. *J Pathol.* 2008;214(2):211-23.
24. Medzhitov R, Janeway C, Jr. Innate immune recognition: mechanisms and pathways. *Immunol Rev.* 2000;173:89-97.
25. Strieter RM, Kunkel SL. The immunopathology of chemotactic cytokines. *Adv Exp Med Biol.* 1993; 351:19-28.
26. van der Poll T OS. Host-pathogen interactions in sepsis. *lancet Infect Dis.* 2008;8:32-43.
27. Horai R, Asano M, Sudo K, Kanuka H, Suzuki M, Nishihara M, et al. Production of mice deficient in genes for interleukin (IL)-1alpha, IL-1beta, IL-1alpha/beta, and IL-1 receptor antagonist shows that IL-1beta is crucial in turpentine-induced fever development and glucocorticoid secretion. *J Exp Med.* 1998;187(9):1463-75.
28. Tanaka H, Ishikawa K, Nishino M, Shimazu T, Yoshioka T. Changes in granulocyte colony-stimulating factor concentration in patients with trauma and sepsis. *J Trauma.* 1996 ;40(5):718-25; discussion 25-6.
29. Pinsky MR, Vincent JL, Deviere J, Alegre M, Kahn RJ, Dupont E. Serum cytokine levels in human septic shock. Relation to multiple-system organ failure and mortality. *Chest.* 1993;103(2):565-75.
30. Bozza FA, Salluh JJ, Japiassu AM, Soares M, Assis EF, Gomes RN, et al. Cytokine profiles as markers of disease severity in sepsis: a multiplex analysis. *Crit Care.* 2007;11(2):R49.
31. Bloom BR, Bennett B. Mechanism of a reaction in vitro associated with delayed-type hypersensitivity. *Science.* 1966;153(3731):80-2.

32. Bozza FA, Gomes RN, Japiassu AM, Soares M, Castro-Faria-Neto HC, Bozza PT, et al. Macrophage migration inhibitory factor levels correlate with fatal outcome in sepsis. *Shock*. 2004;22(4):309-13.
33. Leng L, Bucala R. Macrophage migration inhibitory factor. *Crit Care Med*. 2005 ;33(12 Suppl):S475-7.
34. Rios-Santos F, Benjamim CF, Zavery D, Ferreira SH, Cunha Fde Q. A critical role of leukotriene B4 in neutrophil migration to infectious focus in cecal ligation and puncture sepsis. *Shock*. 2003;19(1):61-5.
35. Prescott SM, Zimmerman GA, Stafforini DM, McIntyre TM. Platelet-activating factor and related lipid mediators. *Annu Rev Biochem*. 2000;69:419-45.
36. Weyrich AS, McIntyre TM, McEver RP, Prescott SM, Zimmerman GA. Monocyte tethering by P-selectin regulates monocyte chemotactic protein-1 and tumor necrosis factor- α secretion. Signal integration and NF- κ B translocation. *J Clin Invest*. 1995 ;95(5):2297-303.
37. Gomes RN, Bozza FA, Amancio RT, Japiassu AM, Vianna RC, Larangeira AP, et al. Exogenous platelet-activating factor acetylhydrolase reduces mortality in mice with systemic inflammatory response syndrome and sepsis. *Shock*. 2006;26(1):41-9.
38. Ang SF, Sio SW, Mochhala SM, MacAry PA, Bhatia M. Hydrogen sulfide upregulates cyclooxygenase-2 and prostaglandin E metabolite in sepsis-evoked acute lung injury via transient receptor potential vanilloid type 1 channel activation. *J Immunol*. 2011 ;187(9):4778-87.
39. Pacheco P, Bozza FA, Gomes RN, Bozza M, Weller PF, Castro-Faria-Neto HC, et al. Lipopolysaccharide-induced leukocyte lipid body formation in vivo: innate immunity elicited intracellular Loci involved in eicosanoid metabolism. *J Immunol*. 2002;169(11):6498-506.
40. Bozza PT, Yu W, Penrose JF, Morgan ES, Dvorak AM, Weller PF. Eosinophil lipid bodies: specific, inducible intracellular sites for enhanced eicosanoid formation. *J Exp Med*. 1997;186(6):909-20.
41. Bozza PT, Payne JL, Goulet JL, Weller PF. Mechanisms of platelet-activating factor-induced lipid body formation: requisite roles for 5-lipoxygenase and de novo protein synthesis in the compartmentalization of neutrophil lipids. *J Exp Med*. 1996;183(4):1515-25.
42. Yu W, Bozza PT, Tzizik DM, Gray JP, Cassara J, Dvorak AM, et al. Co-compartmentalization of MAP kinases and cytosolic phospholipase A2 at cytoplasmic arachidonate-rich lipid bodies. *Am J Pathol*. 1998;152(3):759-69.
43. Weller PF, Ryeom SW, Picard ST, Ackerman SJ, Dvorak AM. Cytoplasmic lipid bodies of neutrophils: formation induced by cis-unsaturated fatty acids and mediated by protein kinase C. *J Cell Biol*. 1991;113(1):137-46.
44. Weller PF, Ackerman SJ, Nicholson-Weller A, Dvorak AM. Cytoplasmic lipid bodies of human neutrophilic leukocytes. *Am J Pathol*. 1989;135(5):947-59.
45. Johnson MM, Vaughn B, Triggiani M, Swan DD, Fonteh AN, Chilton FH. Role of arachidonyl triglycerides within lipid bodies in eicosanoid formation by human polymorphonuclear cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1999;21(2):253-8.

46. Bozza PT, Melo RC, Bandeira-Melo C. Leukocyte lipid bodies regulation and function: contribution to allergy and host defense. *Pharmacol Ther.* 2007;113(1):30-49.
47. Wooten RE, Willingham MC, Daniel LW, Leslie CC, Rogers LC, Sergeant S, et al. Novel translocation responses of cytosolic phospholipase A2alpha fluorescent proteins. *Biochim Biophys Acta.* 2008;1783(8):1544-50.
48. Moreira LS, Piva B, Gentile LB, Mesquita-Santos FP, D'Avila H, Maya-Monteiro CM, et al. Cytosolic phospholipase A2-driven PGE2 synthesis within unsaturated fatty acids-induced lipid bodies of epithelial cells. *Biochim Biophys Acta.* 2009;1791(3):156-65.
49. Bandeira-Melo C, Weller PF, Bozza PT. EicosaCell - an immunofluorescent-based assay to localize newly synthesized eicosanoid lipid mediators at intracellular sites. *Methods Mol Biol.* 2011;689:163-81.
50. Bandeira-Melo C, Phoofolo M, Weller PF. Extranuclear lipid bodies, elicited by CCR3-mediated signaling pathways, are the sites of chemokine-enhanced leukotriene C4 production in eosinophils and basophils. *J Biol Chem.* 2001;276(25):22779-87.
51. Pacheco P, Vieira-de-Abreu A, Gomes RN, Barbosa-Lima G, Wermelinger LB, Maya-Monteiro CM, et al. Monocyte chemoattractant protein-1/CC chemokine ligand 2 controls microtubule-driven biogenesis and leukotriene B4-synthesizing function of macrophage lipid bodies elicited by innate immune response. *J Immunol.* 2007;179(12):8500-8.
52. D'Avila H, Melo RC, Parreira GG, Werneck-Barroso E, Castro-Faria-Neto HC, Bozza PT. *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin induces TLR2-mediated formation of lipid bodies: intracellular domains for eicosanoid synthesis in vivo. *J Immunol.* 2006;176(5):3087-97.
53. Vieira-de-Abreu A, Assis EF, Gomes GS, Castro-Faria-Neto HC, Weller PF, Bandeira-Melo C, et al. Allergic challenge-elicited lipid bodies compartmentalize in vivo leukotriene C4 synthesis within eosinophils. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2005;33(3):254-61.
54. Londos C, Sztalryd C, Tansey JT, Kimmel AR. Role of PAT proteins in lipid metabolism. *Biochimie.* 2005;87(1):45-9.
55. Wolins NE, Brasaemle DL, Bickel PE. A proposed model of fat packaging by exchangeable lipid droplet proteins. *FEBS Lett.* 2006;580(23):5484-91.
56. Robenek H, Buers I, Hofnagel O, Robenek MJ, Troyer D, Severs NJ. Compartmentalization of proteins in lipid droplet biogenesis. *Biochim Biophys Acta.* 2009;1791(6):408-18.
57. Miura S, Gan JW, Brzostowski J, Parisi MJ, Schultz CJ, Londos C, et al. Functional conservation for lipid storage droplet association among Perilipin, ADRP, and TIP47 (PAT)-related proteins in mammals, *Drosophila*, and *Dictyostelium*. *J Biol Chem.* 2002;277(35):32253-7.
58. D'Avila H, Maya-Monteiro CM, Bozza PT. Lipid bodies in innate immune response to bacterial and parasite infections. *Int Immunopharmacol.* 2008;8(10):1308-15.
59. Reddy RC, Standiford TJ. Effects of sepsis on neutrophil chemotaxis. *Curr Opin Hematol.* 2010;17(1):18-24.

60. Couper KN, Blount DG, Wilson MS, Hafalla JC, Belkaid Y, Kamanaka M, et al. IL-10 from CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺CD127⁺ adaptive regulatory T cells modulates parasite clearance and pathology during malaria infection. *PLoS Pathog.* 2008;4(2):e1000004.
61. Mege JL, Meghari S, Honstetter A, Capo C, Raoult D. The two faces of interleukin 10 in human infectious diseases. *Lancet Infect Dis.* 2006;6(9):557-69.
62. Menezes GB, Lee WY, Zhou H, Waterhouse CC, Cara DC, Kubes P. Selective down-regulation of neutrophil Mac-1 in endotoxemic hepatic microcirculation via IL-10. *J Immunol.* 2009;183(11):7557-68.
63. Dang PM, Elbim C, Marie JC, Chiandotto M, Gougerot-Pocidallo MA, El-Benna J. Anti-inflammatory effect of interleukin-10 on human neutrophil respiratory burst involves inhibition of GM-CSF-induced p47^{PHOX} phosphorylation through a decrease in ERK1/2 activity. *FASEB J.* 2006;20(9):1504-6.
64. Scott MJ, Hoth JJ, Turina M, Woods DR, Cheadle WG. Interleukin-10 suppresses natural killer cell but not natural killer T cell activation during bacterial infection. *Cytokine.* 2006;33(2):79-86.
65. Sallusto F, Baggiolini M. Chemokines and leukocyte traffic. *Nat Immunol.* 2008 ;9(9):949-52.
66. Bacon K, Baggiolini M, Broxmeyer H, Horuk R, Lindley I, Mantovani A, et al. Chemokine/chemokine receptor nomenclature. *J Interferon Cytokine Res.* 2002 ;22(10):1067-8.
67. Rossi D, Zlotnik A. The biology of chemokines and their receptors. *Annu Rev Immunol.* 2000;18:217-42.
68. Kunkel EJ, Butcher EC. Chemokines and the tissue-specific migration of lymphocytes. *Immunity.* 2002;16(1):1-4.
69. D'Ambrosio D, Panina-Bordignon P, Sinigaglia F. Chemokine receptors in inflammation: an overview. *J Immunol Methods.* 2003;273(1-2):3-13.
70. Charo IF, Ransohoff RM. The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. *N Engl J Med.* 2006;354(6):610-21.
71. Loetscher P, Clark-Lewis I. Agonistic and antagonistic activities of chemokines. *J Leukoc Biol.* 2001;69(6):881-4.
72. Yi H, Zhao Y. Chemokines, chemokine receptors and CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Expert Rev Clin Immunol.* 2007;3(3):343-9.
73. Rosenkilde MM, Schwartz TW. The chemokine system -- a major regulator of angiogenesis in health and disease. *APMIS.* 2004; 112(7-8):481-95.
74. Segal BM. CNS chemokines, cytokines, and dendritic cells in autoimmune demyelination. *J Neurol Sci.* 2005;228(2):210-4.
75. Beutler B, Poltorak A. Sepsis and evolution of the innate immune response. *Crit Care Med.* 2001;29(7 Suppl):S2-6; discussion S-7.

76. Riese J, Denzel C, Zowe M, Mehler C, Hohenberger W, Haupt W. [Production of chemokines by the human peritoneum]. *Zentralbl Chir.* 1999;124(3):206-9.
77. Strieter RM, Chensue SW, Basha MA, Standiford TJ, Lynch JP, Baggiolini M, et al. Human alveolar macrophage gene expression of interleukin-8 by tumor necrosis factor-alpha, lipopolysaccharide, and interleukin-1 beta. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1990;2(4):321-6.
78. Bozic CR, Gerard NP, von Uexkull-Guldenband C, Kolakowski LF, Jr., Conklyn MJ, Breslow R, et al. The murine interleukin 8 type B receptor homologue and its ligands. Expression and biological characterization. *J Biol Chem.* 1994;269(47):29355-8.
79. Rot A, von Andrian UH. Chemokines in innate and adaptive host defense: basic chemokinese grammar for immune cells. *Annu Rev Immunol.* 2004;22:891-928.
80. Leonard EJ, Yoshimura T. Human monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1). *Immunol Today.* 1990;11(3):97-101.
81. Chensue SW, Warmington KS, Ruth JH, Sanghi PS, Lincoln P, Kunkel SL. Role of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in Th1 (mycobacterial) and Th2 (schistosomal) antigen-induced granuloma formation: relationship to local inflammation, Th cell expression, and IL-12 production. *J Immunol.* 1996;157(10):4602-8.
82. Penido C, Vieira-de-Abreu A, Bozza MT, Castro-Faria-Neto HC, Bozza PT. Role of monocyte chemotactic protein-1/CC chemokine ligand 2 on gamma delta T lymphocyte trafficking during inflammation induced by lipopolysaccharide or *Mycobacterium bovis* bacille Calmette-Guerin. *J Immunol.* 2003;171(12):6788-94.
83. Daly C, Rollins BJ. Monocyte chemoattractant protein-1 (CCL2) in inflammatory disease and adaptive immunity: therapeutic opportunities and controversies. *Microcirculation.* 2003;10(3-4):247-57.
84. Mahad DJ, Ransohoff RM. The role of MCP-1 (CCL2) and CCR2 in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *Semin Immunol.* 2003;15(1):23-32.
85. Zisman DA, Kunkel SL, Strieter RM, Tsai WC, Bucknell K, Wilkowski J, et al. MCP-1 protects mice in lethal endotoxemia. *J Clin Invest.* 1997;99(12):2832-6.
86. Matsukawa A, Hogaboam CM, Lukacs NW, Lincoln PM, Strieter RM, Kunkel SL. Endogenous monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) protects mice in a model of acute septic peritonitis: cross-talk between MCP-1 and leukotriene B4. *J Immunol.* 1999;163(11):6148-54.
87. Nakano Y, Kasahara T, Mukaida N, Ko YC, Nakano M, Matsushima K. Protection against lethal bacterial infection in mice by monocyte-chemotactic and -activating factor. *Infect Immun.* 1994;62(2):377-83.
88. Gomes RN, Figueiredo RT, Bozza FA, Pacheco P, Amancio RT, Laranjeira AP, et al. Increased susceptibility to septic and endotoxic shock in monocyte chemoattractant protein 1/cc chemokine ligand 2-deficient mice correlates with reduced interleukin 10 and enhanced macrophage migration inhibitory factor production. *Shock.* 2006;26(5):457-63.
89. Ignarro LJ. Nitric oxide. A novel signal transduction mechanism for transcellular communication. *Hypertension.* 1990;16(5):477-83.

90. Hauser B, Bracht H, Matejovic M, Radermacher P, Venkatesh B. Nitric oxide synthase inhibition in sepsis? Lessons learned from large-animal studies. *Anesth Analg*. 2005 ;101(2):488-98.
91. Fortin CF, McDonald PP, Fulop T, Lesur O. Sepsis, leukocytes, and nitric oxide (NO): an intricate affair. *Shock*. 2010;33(4):344-52.
92. Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J*. 2001;357(Pt 3):593-615.
93. Torres-Duenas D, Celes MR, Freitas A, Alves-Filho JC, Spiller F, Dal-Secco D, et al. Peroxynitrite mediates the failure of neutrophil migration in severe polymicrobial sepsis in mice. *Br J Pharmacol*. 2007;152(3):341-52.
94. Tyml K, Wang X, Lidington D, Ouellette Y. Lipopolysaccharide reduces intercellular coupling in vitro and arteriolar conducted response in vivo. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001;281(3):H1397-406.
95. Farquhar I, Martin CM, Lam C, Potter R, Ellis CG, Sibbald WJ. Decreased capillary density in vivo in bowel mucosa of rats with normotensive sepsis. *J Surg Res*. 1996 ;61(1):190-6.
96. Benjamim CF, Ferreira SH, Cunha FQ. Role of nitric oxide in the failure of neutrophil migration in sepsis. *J Infect Dis*. 2000;182(1):214-23.
97. Rosen H, Crowley JR, Heinecke JW. Human neutrophils use the myeloperoxidase-hydrogen peroxide-chloride system to chlorinate but not nitrate bacterial proteins during phagocytosis. *J Biol Chem*. 2002;277(34):30463-8.
98. Goya T, Morisaki T, Torisu M. Immunologic assessment of host defense impairment in patients with septic multiple organ failure: relationship between complement activation and changes in neutrophil function. *Surgery*. 1994;115(2):145-55.
99. Boveris A, Alvarez S, Navarro A. The role of mitochondrial nitric oxide synthase in inflammation and septic shock. *Free Radic Biol Med*. 2002;33(9):1186-93.
100. Caimi G, Mule G, Hopps E, Carollo C, Lo Presti R. Nitric oxide metabolites and oxidative stress in mild essential hypertension. *Clin Hemorheol Microcirc*. 2010;46(4):321-5.
101. Ellis CG, Bateman RM, Sharpe MD, Sibbald WJ, Gill R. Effect of a maldistribution of microvascular blood flow on capillary O₂ extraction in sepsis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002;282(1):H156-64.
102. Landry DW, Oliver JA. The pathogenesis of vasodilatory shock. *N Engl J Med*. 2001 ;345(8):588-95.
103. Lam C, Tyml K, Martin C, Sibbald W. Microvascular perfusion is impaired in a rat model of normotensive sepsis. *J Clin Invest*. 1994;94(5):2077-83.
104. Kumar H, Kawai T, Akira S. Toll-like receptors and innate immunity. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009;388(4):621-5.
105. Johnson ML, Billiar TR. Roles of nitric oxide in surgical infection and sepsis. *World J Surg*. 1998;22(2):187-96.

106. Hofman P. Molecular regulation of neutrophil apoptosis and potential targets for therapeutic strategy against the inflammatory process. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*. 2004 ;3(1):1-9.
107. Muller WA. Leukocyte-endothelial-cell interactions in leukocyte transmigration and the inflammatory response. *Trends Immunol*. 2003;24(6):327-34.
108. Mackay CR. Chemokines: immunology's high impact factors. *Nat Immunol*. 2001 ;2(2):95-101.
109. Alves-Filho JC, de Freitas A, Spiller F, Souto FO, Cunha FQ. The role of neutrophils in severe sepsis. *Shock*. 2008;30 Suppl 1:3-9.
110. Drost EM, Kassabian G, Meiselman HJ, Gelmont D, Fisher TC. Increased rigidity and priming of polymorphonuclear leukocytes in sepsis. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999;159(6):1696-702.
111. Skoutelis AT, Kaleridis V, Athanassiou GM, Kokkinis KI, Missirlis YF, Bassaris HP. Neutrophil deformability in patients with sepsis, septic shock, and adult respiratory distress syndrome. *Crit Care Med*. 2000;28(7):2355-9.
112. 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 Immun*. 2002;70(7):3602-10.
113. Papayannopoulos V, Zychlinsky A. NETs: a new strategy for using old weapons. *Trends Immunol*. 2009;30(11):513-21.
114. Guimaraes-Costa AB, Nascimento MT, Wardini AB, Pinto-da-Silva LH, Saraiva EM. ETosis: A Microbicidal Mechanism beyond Cell Death. *J Parasitol Res*. 2012;2012:929743.
115. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*. 2004;303(5663):1532-5.
116. Fuchs TA, Abed U, Goosmann C, Hurwitz R, Schulze I, Wahn V, et al. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol*. 2007;176(2):231-41.
117. Parker H, Albrett AM, Kettle AJ, Winterbourn CC. Myeloperoxidase associated with neutrophil extracellular traps is active and mediates bacterial killing in the presence of hydrogen peroxide. *J Leukoc Biol*. 2012;91(3):369-76.
118. Zasloff M. Antimicrobial peptides in health and disease. *N Engl J Med*. 2002 ;347(15):1199-200.
119. Nathan C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat Rev Immunol*. 2006;6(3):173-82.
120. Bianchi M, Hakkim A, Brinkmann V, Siler U, Seger RA, Zychlinsky A, et al. Restoration of NET formation by gene therapy in CGD controls aspergillosis. *Blood*. 2009;114(13):2619-22.
121. Clark SR, Ma AC, Tavener SA, McDonald B, Goodarzi Z, Kelly MM, et al. Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. *Nat Med*. 2007;13(4):463-9.

122. Wartha F, Beiter K, Normark S, Henriques-Normark B. Neutrophil extracellular traps: casting the NET over pathogenesis. *Curr Opin Microbiol.* 2007;10(1):52-6.
123. Buchanan JT, Simpson AJ, Aziz RK, Liu GY, Kristian SA, Kotb M, et al. DNase expression allows the pathogen group A *Streptococcus* to escape killing in neutrophil extracellular traps. *Curr Biol.* 2006;16(4):396-400.
124. Beiter K, Wartha F, Albiger B, Normark S, Zychlinsky A, Henriques-Normark B. An endonuclease allows *Streptococcus pneumoniae* to escape from neutrophil extracellular traps. *Curr Biol.* 2006;16(4):401-7.
125. Sumby P, Barbian KD, Gardner DJ, Whitney AR, Welty DM, Long RD, et al. Extracellular deoxyribonuclease made by group A *Streptococcus* assists pathogenesis by enhancing evasion of the innate immune response. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 ;102(5):1679-84.
126. Urban CF, Reichard U, Brinkmann V, Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps capture and kill *Candida albicans* yeast and hyphal forms. *Cell Microbiol.* 2006 ;8(4):668-76.
127. Guimaraes-Costa AB, Nascimento MT, Froment GS, Soares RP, Morgado FN, Conceicao-Silva F, et al. *Leishmania amazonensis* promastigotes induce and are killed by neutrophil extracellular traps. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(16):6748-53.
128. Ward JR, Bingle L, Judge HM, Brown SB, Storey RF, Whyte MK, et al. Agonists of toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 are unable to modulate platelet activation by adenosine diphosphate and platelet activating factor. *Thromb Haemost.* 2005;94(4):831-8.
129. Cognasse F, Hamzeh H, Chavarin P, Acquart S, Genin C, Garraud O. Evidence of Toll-like receptor molecules on human platelets. *Immunol Cell Biol.* 2005;83(2):196-8.
130. Aslam R, Speck ER, Kim M, Crow AR, Bang KW, Nestel FP, et al. Platelet Toll-like receptor expression modulates lipopolysaccharide-induced thrombocytopenia and tumor necrosis factor-alpha production in vivo. *Blood.* 2006;107(2):637-41.
131. Andonegui G, Kerfoot SM, McNagny K, Ebbert KV, Patel KD, Kubes P. Platelets express functional Toll-like receptor-4. *Blood.* 2005 Oct 1;106(7):2417-23.
132. Stahl AL, Svensson M, Morgelin M, Svanborg C, Tarr PI, Mooney JC, et al. Lipopolysaccharide from enterohemorrhagic *Escherichia coli* binds to platelets through TLR4 and CD62 and is detected on circulating platelets in patients with hemolytic uremic syndrome. *Blood.* 2006;108(1):167-76.
133. Yousefi S, Gold JA, Andina N, Lee JJ, Kelly AM, Kozlowski E, et al. Catapult-like release of mitochondrial DNA by eosinophils contributes to antibacterial defense. *Nat Med.* 2008;14(9):949-53.
134. Gupta AK, Joshi MB, Philippova M, Erne P, Hasler P, Hahn S, et al. Activated endothelial cells induce neutrophil extracellular traps and are susceptible to NETosis-mediated cell death. *FEBS Lett.* 2010;584(14):3193-7.
135. Tillack K, Breiden P, Martin R, Sospedra M. T lymphocyte priming by neutrophil extracellular traps links innate and adaptive immune responses. *J Immunol.* 2012 ;188(7):3150-9.

136. Galley HF, Webster NR. Physiology of the endothelium. *Br J Anaesth*. 2004;93(1):105-13.
137. Kotsovolis G, Kallaras K. The role of endothelium and endogenous vasoactive substances in sepsis. *Hippokratia*. 2010;14(2):88-93.
138. Huet O, Dupic L, Harrois A, Duranteau J. Oxidative stress and endothelial dysfunction during sepsis. *Front Biosci*. 2011;16:1986-95.
139. Dobbe JG, Streekstra GJ, Atasever B, van Zijderveld R, Ince C. Measurement of functional microcirculatory geometry and velocity distributions using automated image analysis. *Med Biol Eng Comput*. 2008;46(7):659-70.
140. Ince C. The microcirculation is the motor of sepsis. *Crit Care*. 2005;9 Suppl 4:S13-9.
141. Aird WC. The role of the endothelium in severe sepsis and multiple organ dysfunction syndrome. *Blood*. 200;101(10):3765-77.
142. Karimova A, Pinsky DJ. The endothelial response to oxygen deprivation: biology and clinical implications. *Intensive Care Med*. 2001;27(1):19-31.
143. Taccone FS, Su F, Pierrakos C, He X, James S, Dewitte O, et al. Cerebral microcirculation is impaired during sepsis: an experimental study. *Crit Care*. 2010;14(4):R140.
144. Koh IH, Menchaca-Diaz JL, Koh TH, Souza RL, Shu CM, Rogerio VE, et al. Microcirculatory evaluation in sepsis: a difficult task. *Shock*. 2010;34 Suppl 1:27-33.
145. Bateman RM, Sharpe MD, Ellis CG. Bench-to-bedside review: microvascular dysfunction in sepsis--hemodynamics, oxygen transport, and nitric oxide. *Crit Care*. 2003;7(5):359-73.
146. Price SA, Spain DA, Wilson MA, Harris PD, Garrison RN. Subacute sepsis impairs vascular smooth muscle contractile machinery and alters vasoconstrictor and dilator mechanisms. *J Surg Res*. 1999;83(1):75-80.
147. Cerwinka WH, Cooper D, Krieglstein CF, Ross CR, McCord JM, Granger DN. Superoxide mediates endotoxin-induced platelet-endothelial cell adhesion in intestinal venules. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003;284(2):H535-41.
148. Goldman D, Bateman RM, Ellis CG. Effect of sepsis on skeletal muscle oxygen consumption and tissue oxygenation: interpreting capillary oxygen transport data using a mathematical model. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004;287(6):H2535-44.
149. Ince C, Sinaasappel M. Microcirculatory oxygenation and shunting in sepsis and shock. *Crit Care Med*. 1999;27(7):1369-77.
150. Marchi N, Cavaglia M, Fazio V, Bhudia S, Hallene K, Janigro D. Peripheral markers of blood-brain barrier damage. *Clin Chim Acta*. 2004;342(1-2):1-12.
151. Weiss N, Miller F, Cazaubon S, Couraud PO. The blood-brain barrier in brain homeostasis and neurological diseases. *Biochim Biophys Acta*. 2009;1788(4):842-57.

152. de Boer AG, Gaillard PJ. Drug targeting to the brain. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2007;47:323-55.
153. Ballabh P, Braun A, Nedergaard M. The blood-brain barrier: an overview: structure, regulation, and clinical implications. *Neurobiol Dis.* 2004;16(1):1-13.
154. Wassmer SC, Combes V, Candal FJ, Juhan-Vague I, Grau GE. Platelets potentiate brain endothelial alterations induced by *Plasmodium falciparum*. *Infect Immun.* 2006;74(1):645-53.
155. Streck EL, Comim CM, Barichello T, Quevedo J. The septic brain. *Neurochem Res.* 2008;33(11):2171-7.
156. Tuon L, Comim CM, Petronilho F, Barichello T, Izquierdo I, Quevedo J, et al. Memory-enhancing treatments reverse the impairment of inhibitory avoidance retention in sepsis-surviving rats. *Crit Care.* 2008;12(5):R133.
157. Iacobone E, Bailly-Salin J, Polito A, Friedman D, Stevens RD, Sharshar T. Sepsis-associated encephalopathy and its differential diagnosis. *Crit Care Med.* 2009;37(10 Suppl):S331-6.
158. Barichello T, Martins MR, Reinke A, Feier G, Ritter C, Quevedo J, et al. Cognitive impairment in sepsis survivors from cecal ligation and perforation. *Crit Care Med.* 2005;33(1):221-3; discussion 62-3.
159. Sharshar T, Polito A, Checinski A, Stevens RD. Septic-associated encephalopathy--everything starts at a microlevel. *Crit Care.* 2010;14(5):199.
160. Sharshar T, Carlier R, Bernard F, Guidoux C, Brouland JP, Nardi O, et al. Brain lesions in septic shock: a magnetic resonance imaging study. *Intensive Care Med.* 2007;33(5):798-806.
161. Messaris E, Memos N, Chatzigianni E, Konstadoulakis MM, Menenakos E, Katsaragakis S, et al. Time-dependent mitochondrial-mediated programmed neuronal cell death prolongs survival in sepsis. *Crit Care Med.* 2004;32(8):1764-70.
162. Sharshar T, Gray F, Lorin de la Grandmaison G, Hopkinson NS, Ross E, Dorandeu A, et al. Apoptosis of neurons in cardiovascular autonomic centres triggered by inducible nitric oxide synthase after death from septic shock. *Lancet.* 2003;362(9398):1799-805.
163. Alexander JJ, Jacob A, Cunningham P, Hensley L, Quigg RJ. TNF is a key mediator of septic encephalopathy acting through its receptor, TNF receptor-1. *Neurochem Int.* 2008;52(3):447-56.
164. Maeda S, Nakatsuka I, Hayashi Y, Higuchi H, Shimada M, Miyawaki T. Heme oxygenase-1 induction in the brain during lipopolysaccharide-induced acute inflammation. *Neuropsychiatr Dis Treat.* 2008;4(3):663-7.
165. Comim CM, Cassol-Jr OJ, Constantino LS, Felisberto F, Petronilho F, Rezin GT, et al. Alterations in inflammatory mediators, oxidative stress parameters and energetic metabolism in the brain of sepsis survivor rats. *Neurochem Res.* 2011;36(2):304-11.

166. Dellinger RP, Levy MM, Carlet JM, Bion J, Parker MM, Jaeschke R, et al. Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2008. *Intensive Care Med.* 2008;34(1):17-60.
167. Albert M, Losser MR, Hayon D, Faivre V, Payen D. Systemic and renal macro- and microcirculatory responses to arginine vasopressin in endotoxic rabbits. *Crit Care Med.* 2004;32(9):1891-8.
168. Westphal M, Freise H, Kehrel BE, Bone HG, Van Aken H, Sielenkamper AW. Arginine vasopressin compromises gut mucosal microcirculation in septic rats. *Crit Care Med.* 2004;32(1):194-200.
169. Bernard GR, Vincent JL, Laterre PF, LaRosa SP, Dhainaut JF, Lopez-Rodriguez A, et al. Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis. *N Engl J Med.* 2001;344(10):699-709.
170. Isobe H, Okajima K, Uchiba M, Mizutani A, Harada N, Nagasaki A, et al. Activated protein C prevents endotoxin-induced hypotension in rats by inhibiting excessive production of nitric oxide. *Circulation.* 2001;104(10):1171-5.
171. Yamaji K, Wang Y, Liu Y, Abeyama K, Hashiguchi T, Uchimura T, et al. Activated protein C, a natural anticoagulant protein, has antioxidant properties and inhibits lipid peroxidation and advanced glycation end products formation. *Thromb Res.* 2005;115(4):319-25.
172. Ibrahim EH, Sherman G, Ward S, Fraser VJ, Kollef MH. The influence of inadequate antimicrobial treatment of bloodstream infections on patient outcomes in the ICU setting. *Chest.* 2000;118(1):146-55.
173. Kellum JA, Venkataraman R. Blood purification in sepsis: an idea whose time has come? *Crit Care Med.* 2002;30(6):1387-8.
174. Szeles L, Torocsik D, Nagy L. PPARgamma in immunity and inflammation: cell types and diseases. *Biochim Biophys Acta.* 2007;1771(8):1014-30.
175. Szanto A, Nagy L. The many faces of PPARgamma: anti-inflammatory by any means? *Immunobiology.* 2008;213(9-10):789-803.
176. Varga T, Nagy L. Nuclear receptors, transcription factors linking lipid metabolism and immunity: the case of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Eur J Clin Invest.* 2008;38(10):695-707.
177. Schmidt MV, Brune B, von Knethen A. The nuclear hormone receptor PPARgamma as a therapeutic target in major diseases. *ScientificWorldJournal.* 2010;10:2181-97.
178. Rocchi S, Auwerx J. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma: a versatile metabolic regulator. *Ann Med.* 1999;31(5):342-51.
179. Dubuquoy L, Bourdon C, Peuchmaur M, Leibowitz MD, Nutten S, Colombel JF, et al. [Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma: a new target for the treatment of inflammatory bowel disease]. *Gastroenterol Clin Biol.* 2000;24(8-9):719-24.

180. Moore KJ, Rosen ED, Fitzgerald ML, Randow F, Andersson LP, Altshuler D, et al. The role of PPAR-gamma in macrophage differentiation and cholesterol uptake. *Nat Med.* 2001;7(1):41-7.
181. Zingarelli B, Cook JA. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a new therapeutic target in sepsis and inflammation. *Shock.* 2005;23(5):393-9.
182. Chung SW, Kang BY, Kim SH, Pak YK, Cho D, Trinchieri G, et al. Oxidized low density lipoprotein inhibits interleukin-12 production in lipopolysaccharide-activated mouse macrophages via direct interactions between peroxisome proliferator-activated receptor-gamma and nuclear factor-kappa B. *J Biol Chem.* 2000;275(42):32681-7.
183. von Knethen A, Soller M, Brune B. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma) and sepsis. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2007;55(1):19-25.
184. Pascual G, Fong AL, Ogawa S, Gamliel A, Li AC, Perissi V, et al. A SUMOylation-dependent pathway mediates transrepression of inflammatory response genes by PPAR-gamma. *Nature.* 2005;437(7059):759-63.
185. Takeyama K, Kodera Y, Suzawa M, Kato S. [Peroxisome proliferator-activated receptor(PPAR)--structure, function, tissue distribution, gene expression]. *Nihon Rinsho.* 2000;58(2):357-63.
186. Davies SS, Pontsler AV, Marathe GK, Harrison KA, Murphy RC, Hinshaw JC, et al. Oxidized alkyl phospholipids are specific, high affinity peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands and agonists. *J Biol Chem.* 2001;276(19):16015-23.
187. McIntyre TM, Pontsler AV, Silva AR, St Hilaire A, Xu Y, Hinshaw JC, et al. Identification of an intracellular receptor for lysophosphatidic acid (LPA): LPA is a transcellular PPARgamma agonist. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(1):131-6.
188. Siess W, Zangl KJ, Essler M, Bauer M, Brandl R, Corrinth C, et al. Lysophosphatidic acid mediates the rapid activation of platelets and endothelial cells by mildly oxidized low density lipoprotein and accumulates in human atherosclerotic lesions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96(12):6931-6.
189. Yki-Jarvinen H, Westerbacka J. The fatty liver and insulin resistance. *Curr Mol Med.* 2005 May;5(3):287-95.
190. Furnsinn C, Waldhausl W. Thiazolidinediones: metabolic actions in vitro. *Diabetologia.* 2002;45(9):1211-23.
191. Gomes MB. [Glitazones and the metabolic syndrome: mechanism of action, pathophysiology and therapeutic indications]. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2006 ;50(2):271-80.
192. Zapolska-Downar D, Naruszewicz M. Propionate reduces the cytokine-induced VCAM-1 and ICAM-1 expression by inhibiting nuclear factor-kappa B (NF-kappaB) activation. *J Physiol Pharmacol.* 2009;60(2):123-31.
193. Liu JJ, Liu PQ, Lin DJ, Xiao RZ, Huang M, Li XD, et al. Downregulation of cyclooxygenase-2 expression and activation of caspase-3 are involved in peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists induced apoptosis in human monocyte leukemia cells in vitro. *Ann Hematol.* 2007;86(3):173-83.

194. Lin TH, Yang RS, Tang CH, Lin CP, Fu WM. PPARgamma inhibits osteogenesis via the down-regulation of the expression of COX-2 and iNOS in rats. *Bone*. 2007;41(4):562-74.
195. Subbaramaiah K, Lin DT, Hart JC, Dannenberg AJ. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands suppress the transcriptional activation of cyclooxygenase-2. Evidence for involvement of activator protein-1 and CREB-binding protein/p300. *J Biol Chem*. 2001;276(15):12440-8.
196. Collin M, Thiemermann C. The PPAR-gamma ligand 15-deoxy(delta12,14) prostaglandin J2 reduces the liver injury in endotoxic shock. *Eur J Pharmacol*. 2003;476(3):257-8.
197. Kaplan JM, Cook JA, Hake PW, O'Connor M, Burroughs TJ, Zingarelli B. 15-Deoxy-delta(12,14)-prostaglandin J(2) (15D-PGJ(2)), a peroxisome proliferator activated receptor gamma ligand, reduces tissue leukosequestration and mortality in endotoxic shock. *Shock*. 2005;24(1):59-65.
198. Zingarelli B, Sheehan M, Hake PW, O'Connor M, Denenberg A, Cook JA. Peroxisome proliferator activator receptor-gamma ligands, 15-deoxy-Delta(12,14)-prostaglandin J2 and ciglitazone, reduce systemic inflammation in polymicrobial sepsis by modulation of signal transduction pathways. *J Immunol*. 2003;171(12):6827-37.
199. Napimoga MH, Vieira SM, Dal-Secco D, Freitas A, Souto FO, Mestriner FL, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligand, 15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2, reduces neutrophil migration via a nitric oxide pathway. *J Immunol*. 2008;180(1):609-17.
200. Kaplan JM, Denenberg A, Monaco M, Nowell M, Wong H, Zingarelli B. Changes in peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activity in children with septic shock. *Intensive Care Med*. 2010;36(1):123-30.
201. Carvalho-Tavares J, Hickey MJ, Hutchison J, Michaud J, Sutcliffe IT, Kubes P. A role for platelets and endothelial selectins in tumor necrosis factor-alpha-induced leukocyte recruitment in the brain microvasculature. *Circ Res*. 2000; 87(12):1141-8.
202. Bozza PT, Magalhaes KG, Weller PF. Leukocyte lipid bodies - Biogenesis and functions in inflammation. *Biochim Biophys Acta*. 2009;1791(6):540-51.
203. den Uil CA, Klijn E, Lagrand WK, Brugts JJ, Ince C, Spronk PE, et al. The microcirculation in health and critical disease. *Prog Cardiovasc Dis*. 2008;51(2):161-70.
204. Kielian T, Syed MM, Liu S, Phulwani NK, Phillips N, Wagoner G, et al. The synthetic peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist ciglitazone attenuates neuroinflammation and accelerates encapsulation in bacterial brain abscesses. *J Immunol*. 2008;180(7):5004-16.
205. Walters M, Sperandio V. Quorum sensing in *Escherichia coli* and *Salmonella*. *Int J Med Microbiol*. 2006;296(2-3):125-31.
206. Brook I. The role of anaerobic bacteria in cutaneous and soft tissue abscesses and infected cysts. *Anaerobe*. 2007;13(5-6):171-7.

207. Yang WG, Li CR, He YX, Wang GB, Zu Y. [Role of transduce molecules and modulatory factors of signal pathways of Toll-like receptor in inflammatory response of children with sepsis]. *Zhongguo Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue*. 2008;20(9):561-4.
208. Osuchowski MF, Welch K, Siddiqui J, Remick DG. Circulating cytokine/inhibitor profiles reshape the understanding of the SIRS/CARS continuum in sepsis and predict mortality. *J Immunol*. 2006;177(3):1967-74.
209. Hubbard WJ, Choudhry M, Schwacha MG, Kerby JD, Rue LW, 3rd, Bland KI, et al. Cecal ligation and puncture. *Shock*. 2005;24 Suppl 1:52-7.
210. Abdelrahman M, Sivarajah A, Thiemermann C. Beneficial effects of PPAR-gamma ligands in ischemia-reperfusion injury, inflammation and shock. *Cardiovasc Res*. 2005 ;65(4):772-81.
211. Zingarelli B, Chima R, O'Connor M, Piraino G, Denenberg A, Hake PW. Liver apoptosis is age dependent and is reduced by activation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in hemorrhagic shock. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2010 ;298(1):G133-41.
212. Wu WT, Lee CC, Lee CJ, Subeq YM, Lee RP, Hsu BG. Rosiglitazone ameliorates endotoxin-induced organ damage in conscious rats. *Biol Res Nurs*. 2011;13(1):38-43.
213. Arcaroli J, Silva E, Maloney JP, He Q, Svetkauskaite D, Murphy JR, et al. Variant IRAK-1 haplotype is associated with increased nuclear factor-kappaB activation and worse outcomes in sepsis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006;173(12):1335-41.
214. Kim SR, Lee KS, Park HS, Park SJ, Min KH, Jin SM, et al. Involvement of IL-10 in peroxisome proliferator-activated receptor gamma-mediated anti-inflammatory response in asthma. *Mol Pharmacol*. 2005;68(6):1568-75.
215. de Assis EF, Silva AR, Caiado LF, Marathe GK, Zimmerman GA, Prescott SM, et al. Synergism between platelet-activating factor-like phospholipids and peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists generated during low density lipoprotein oxidation that induces lipid body formation in leukocytes. *J Immunol*. 2003;171(4):2090-8.
216. Almeida PE, Silva AR, Maya-Monteiro CM, Torocsik D, D'Avila H, Dezso B, et al. *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin infection induces TLR2-dependent peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression and activation: functions in inflammation, lipid metabolism, and pathogenesis. *J Immunol*. 2009;183(2):1337-45.
217. Nagy L, Tontonoz P, Alvarez JG, Chen H, Evans RM. Oxidized LDL regulates macrophage gene expression through ligand activation of PPARgamma. *Cell*. 1998 ;93(2):229-40.
218. Yki-Jarvinen H. Thiazolidinediones. *N Engl J Med*. 2004;351(11):1106-18.
219. Spronk PE, Zandstra DF, Ince C. Bench-to-bedside review: sepsis is a disease of the microcirculation. *Crit Care*. 2004;8(6):462-8.
220. Sakr Y, Dubois MJ, De Backer D, Creteur J, Vincent JL. Persistent microcirculatory alterations are associated with organ failure and death in patients with septic shock. *Crit Care Med*. 2004;32(9):1825-31.

221. De Backer D, Creteur J, Preiser JC, Dubois MJ, Vincent JL. Microvascular blood flow is altered in patients with sepsis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002;166(1):98-104.
222. Vicaut E. Microcirculation and arterial hypertension. *Drugs.* 1999;59 Spec No:1-10.
223. Cipolla MJ, Bishop N, Vinke RS, Godfrey JA. PPAR{gamma} activation prevents hypertensive remodeling of cerebral arteries and improves vascular function in female rats. *Stroke.* 2010;41(6):1266-70.
224. Luo Y, Yin W, Signore AP, Zhang F, Hong Z, Wang S, et al. Neuroprotection against focal ischemic brain injury by the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist rosiglitazone. *J Neurochem.* 2006;97(2):435-48.
225. Comim CM, Vilela MC, Constantino LS, Petronilho F, Vuolo F, Lacerda-Queiroz N, et al. Traffic of leukocytes and cytokine up-regulation in the central nervous system in sepsis. *Intensive Care Med.* 2011;37(4):711-8.
226. Bauer P, Lush CW, Kvietys PR, Russell JM, Granger DN. Role of endotoxin in the expression of endothelial selectins after cecal ligation and perforation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2000;278(5):R1140-7.
227. Hoesel LM, Neff TA, Neff SB, Younger JG, Olle EW, Gao H, et al. Harmful and protective roles of neutrophils in sepsis. *Shock.* 2005;24(1):40-7.
228. Stegenga ME, Florquin S, de Vos AF, van der Poll T. The thiazolidinedione ciglitazone reduces bacterial outgrowth and early inflammation during *Streptococcus pneumoniae* pneumonia in mice. *Crit Care Med.* 2009;37(2):614-8.
229. Lee S, Kim W, Kang KP, Moon SO, Sung MJ, Kim DH, et al. Agonist of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma, rosiglitazone, reduces renal injury and dysfunction in a murine sepsis model. *Nephrol Dial Transplant.* 2005;20(6):1057-65.
230. Haraguchi G, Kosuge H, Maejima Y, Suzuki J, Imai T, Yoshida M, et al. Pioglitazone reduces systematic inflammation and improves mortality in apolipoprotein E knockout mice with sepsis. *Intensive Care Med.* 2008;34(7):1304-12.
231. Hauser B, Kick J, Ivanyi Z, Asfar P, Ehrmann U, Muth CM, et al. Effects of 15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin-J2 during hyperdynamic porcine endotoxemia. *Intensive Care Med.* 2006;32(5):759-65.
232. Standage SW, Caldwell CC, Zingarelli B, Wong HR. Reduced peroxisome proliferator-activated receptor alpha expression is associated with decreased survival and increased tissue bacterial load in sepsis. *Shock.* 2012;37(2):164-9.
233. Ricote M, Glass CK. PPARs and molecular mechanisms of transrepression. *Biochim Biophys Acta.* 2007;1771(8):926-35.
234. Pyper SR, Viswakarma N, Yu S, Reddy JK. PPARalpha: energy combustion, hypolipidemia, inflammation and cancer. *Nucl Recept Signal.* 2010;8:e002.
235. Kirkeboen KA, Strand OA. [Nitric oxide--an important mediator in sepsis?]. *Tidsskr Nor Laegeforen.* 1999;119(27):4061-5.

236. Kirkeboen KA, Strand OA. The role of nitric oxide in sepsis--an overview. *Acta Anaesthesiol Scand.* 1999;43(3):275-88.
237. Evans TJ, Buttery LD, Carpenter A, Springall DR, Polak JM, Cohen J. Cytokine-treated human neutrophils contain inducible nitric oxide synthase that produces nitration of ingested bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93(18):9553-8.
238. Radi R, Beckman JS, Bush KM, Freeman BA. Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *J Biol Chem.* 1991;266(7):4244-50.
239. Clements MK, Siemsen DW, Swain SD, Hanson AJ, Nelson-Overton LK, Rohn TT, et al. Inhibition of actin polymerization by peroxynitrite modulates neutrophil functional responses. *J Leukoc Biol.* 2003;73(3):344-55.
240. Lelamali K, Wang W, Gengaro P, Edelstein C, Schrier RW. Effects of nitric oxide and peroxynitrite on endotoxin-induced leukocyte adhesion to endothelium. *J Cell Physiol.* 2001;188(3):337-42.
241. Kim YM, Hong SJ, Billiar TR, Simmons RL. Counterprotective effect of erythrocytes in experimental bacterial peritonitis is due to scavenging of nitric oxide and reactive oxygen intermediates. *Infect Immun.* 1996;64(8):3074-80.
242. Hickman-Davis JM, Fang FC, Nathan C, Shepherd VL, Voelker DR, Wright JR. Lung surfactant and reactive oxygen-nitrogen species: antimicrobial activity and host-pathogen interactions. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2001;281(3):L517-23.
243. Logters T, Margraf S, Altrichter J, Cinatl J, Mitzner S, Windolf J, et al. The clinical value of neutrophil extracellular traps. *Med Microbiol Immunol.* 2009;198(4):211-9.
244. Ma AC, Kubes P. Platelets, neutrophils, and neutrophil extracellular traps (NETs) in sepsis. *J Thromb Haemost.* 2008;6(3):415-20.
245. Papayannopoulos V, Metzler KD, Hakkim A, Zychlinsky A. Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol.* 2010;191(3):677-91.
246. Metzler KD, Fuchs TA, Nauseef WM, Reumaux D, Roesler J, Schulze I, et al. Myeloperoxidase is required for neutrophil extracellular trap formation: implications for innate immunity. *Blood.* 2011;117(3):953-9.
247. Remijsen Q, Vanden Berghe T, Wirawan E, Asselbergh B, Parthoens E, De Rycke R, et al. Neutrophil extracellular trap cell death requires both autophagy and superoxide generation. *Cell Res.* 2011;21(2):290-304.
248. Wang D, Lippard SJ. Cisplatin-induced post-translational modification of histones H3 and H4. *J Biol Chem.* 2004;279(20):20622-5.
249. Yost CC, Cody MJ, Harris ES, Thornton NL, McInturff AM, Martinez ML, et al. Impaired neutrophil extracellular trap (NET) formation: a novel innate immune deficiency of human neonates. *Blood.* 2009;113(25):6419-27.
250. Seiler P, Aichele P, Bandermann S, Hauser AE, Lu B, Gerard NP, et al. Early granuloma formation after aerosol *Mycobacterium tuberculosis* infection is regulated by neutrophils via CXCR3-signaling chemokines. *Eur J Immunol.* 2003;33(10):2676-86.

251. Brown AE, Holzer TJ, Andersen BR. Capacity of human neutrophils to kill *Mycobacterium tuberculosis*. *J Infect Dis*. 1987;156(6):985-9.
252. Sugawara I, Udagawa T, Yamada H. Rat neutrophils prevent the development of tuberculosis. *Infect Immun*. 2004;72(3):1804-6.
253. Eruslanov EB, Lyadova IV, Kondratieva TK, Majorov KB, Scheglov IV, Orlova MO, et al. Neutrophil responses to *Mycobacterium tuberculosis* infection in genetically susceptible and resistant mice. *Infect Immun*. 2005;73(3):1744-53.
254. Ramos-Kichik V, Mondragon-Flores R, Mondragon-Castelan M, Gonzalez-Pozos S, Muniz-Hernandez S, Rojas-Espinosa O, et al. Neutrophil extracellular traps are induced by *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis (Edinb)*. 2009;89(1):29-37.

ANEXO



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Microvascular Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ymvre

Brief Communication

PPAR gamma activation protects the brain against microvascular dysfunction in sepsis[☆]C.V. Araújo^a, V. Estado^b, E. Tibiriçá^b, P.T. Bozza^a, H.C. Castro-Faria-Neto^a, A.R. Silva^{a,*}^a Laboratório de Imunofarmacologia, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, Brazil^b Laboratório de Investigação Cardiovascular, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Accepted 23 May 2012

Available online xxxxx

ABSTRACT

Sepsis is a severe disorder characterized by systemic inflammatory responses in the presence of an infection and may progress to multiple organ dysfunction and death. Alterations in cerebral microcirculation fulfill a crucial role in the pathogenesis of severe sepsis, and include a decrease in capillary density and disturbances in leukocyte movement along capillaries. Nevertheless, the mechanisms involved in sepsis-associated cerebral microcirculatory alterations have so far not been defined. We investigated the effect of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) selective agonist rosiglitazone on leukocyte/endothelial cell interaction and functional capillary density in the brain in the cecal ligation and puncture (CLP) model of sepsis. Anti-inflammatory effects of rosiglitazone on the cerebral microcirculation were marked. Functional capillary density increased and leukocyte rolling and adhesion were decreased in animals submitted to CLP and treated with rosiglitazone. Our data provide evidence for involvement of PPAR γ activation in leukocyte–endothelium interactions and alterations in capillary density. Improved cerebral perfusion in animals treated with rosiglitazone, suggests that PPAR γ activation is protective against cerebral microvascular dysfunction in sepsis.

© 2012 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

Sepsis is a systemic response to infection characterized by hemodynamic and metabolic derangement that may result in septic shock, multiple organ system failure, and death. Although antibiotic therapy may effectively treat an underlying infection, it is not sufficient to reverse the systemic inflammation and its consequences.

Microcirculatory dysfunction plays a pivotal role in the pathogenesis of severe sepsis. There is evidence for a decrease in functional capillary density, and an increase in the proportion of nonperfused or intermittently perfused capillaries (den Uil et al., 2008). Monitoring microcirculatory blood flow in sepsis has gained increasing attention not only as a prognostic parameter but also as a possible guideline for therapeutic maneuvers (Koh et al., 2010). Moreover, microcirculatory alterations nonresponsive to therapy predict a poor outcome in critically ill patients (Sakr et al., 2004).

Several *in vitro* and *in vivo* studies have demonstrated that pharmacological activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) by natural or synthetic ligands, including

thiazolidinediones (TZD), has anti-inflammatory effects (Haraguchi et al., 2008); (Zingarelli et al., 2003); (Zingarelli and Cook, 2005). PPAR γ is a nuclear receptor expressed in various cells, including monocytes, macrophages, T cells, endothelial cells, and other cells involved in the progression of sepsis. PPAR γ ligands have anti-inflammatory effects and improve outcomes in clinical conditions such as atherosclerosis, rheumatoid arthritis, allergy and sepsis (Szeles et al., 2007); (Zingarelli, 2005). In cerebral infection by *Staphylococcus aureus*, PPAR γ agonist treatment attenuated inflammation and limited bacterial dissemination (Kielian et al., 2008). Based on this information, the purpose of this study was to investigate whether the PPAR γ selective agonist rosiglitazone reduces the inflammatory response in the cecal ligation and puncture (CLP) model of sepsis, by modulating leukocyte/endothelial cell interaction and functional capillary density, thereby improving cerebral microcirculation.

Materials and methods

Experimental animals

Ten weeks old Male Swiss mice (Oswaldo Cruz Foundation breeding unit) weighing 20 to 25 g were used. The animals were kept at a constant temperature (25 °C) with the access to pellet diet and water in a room with a 12 h light/dark cycle. The protocol was approved in accordance with the ethical guidelines of the Institutional

Abbreviations: PPAR γ , peroxisome proliferator-activated receptor gamma; CLP, cecal ligation and puncture; TZD, thiazolidinediones.

[☆] Financial support: CNPq, FIOCRUZ, FAPERJ.

* Corresponding author at: Laboratório de Imunofarmacologia, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Av. Brasil 4365, 21040-900, Rio de Janeiro, RJ, Brazil. Fax: + 55 21 2562 1410.

E-mail address: arsilva@ioc.fiocruz.br (A.R. Silva).

0026-2862/\$ – see front matter © 2012 Elsevier Inc. All rights reserved.

doi:10.1016/j.mvr.2012.05.006

Please cite this article as: Araújo, C.V., et al., PPAR gamma activation protects the brain against microvascular dysfunction in sepsis, *Microvasc. Res.* (2012), doi:10.1016/j.mvr.2012.05.006

Animal Care Committee (CEUA 0260–05), Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ).

Surgical procedure and CLP model

Sepsis was induced by CLP as previously described (Gomes et al., 2006). After the surgery all animals received 1 ml s.c. of sterile isotonic saline. Fifteen minutes after the CLP procedure, mice were divided into six random groups: sham + vehicle (DMSO, v/v, i.v.), sham + rosiglitazone (0.5 mg/kg, i.v.) CLP + vehicle (DMSO, v/v, i.v.), CLP + GW9662 (1 mg/kg, i.v.) and CLP + GW9662 (1 mg/kg, i.v.) + rosiglitazone (0.5 mg/kg, i.v.), 9 animals per group.

Assessment of the severity of sepsis

At 24 h after infection, mice were scored for severity of sepsis. In this assessment, higher scores reflect increased severity. Mice were scored based on the following variables: piloerection, curved trunk, alterations on gait, seizures, limb paralysis, coma, respiratory rate, skin color alterations, heart rate, lacrimation, palpebral closure, grip strength, limb, abdominal, body tone and body temperature alterations. Each animal received a total score between 1 and 11: 1–3 (mild sepsis); 3–7 (moderate sepsis) and 8–11 (severe sepsis) (Reis et al., unpublished data). In our CLP model, all animals that were ranked as moderate sepsis were used for intravital microscopy analysis. Animals with mild or severe sepsis were excluded from the experimental protocol.

Intravital microscopy in mouse brain

The animals were anesthetized by intraperitoneal injection of a mixture of 10 mg/kg xylazine and 75 mg/kg ketamine hydrochloride, tracheostomized and artificially ventilated (Hugo Basile) with room air. The jugular vein was cannulated to allow injection of fluorescent tracers. Arterial pressure and heart rate were monitored with a catheter placed in the right carotid artery connected to a quartz transducer, which in turn was connected to an automatic acquisition system hemodynamic data (Biopac Systems, Santa Barbara, CA). Core temperature was monitored with a rectal probe, and body temperature was maintained at 37 °C with a homeothermic blanket system (Harvard Apparatus, Boston, Massachusetts).

The anesthetized animals were immobilized in a stereotaxic frame, the left parietal bone was exposed by a midline skin incision, a craniotomy was performed with high-speed drill, and the *dura mater* was incised and everted to expose the cerebral pial microcirculation (Carvalho-Tavares et al., 2000). The cranial window was suffused with artificial cerebrospinal fluid (in mmol/l: NaCl 132, KCl 2.95, CaCl₂ 1.71, MgCl₂ 0.64, NaHCO₃ 24.6 dextrose 3.71 and urea 6.7 at 37 °C, pH 7.35).

The animals were then placed under an upright fixed-stage intravital microscope with a mercury lamp (Olympus BX51/WI, USA) coupled to a CCD digital video camera system (Optronics, Goleta, California). Olympus objectives 10× and 20× were used to produce a total magnification of 100× and 200×, respectively at the monitor.

Assessment of capillary density, leukocyte rolling and adhesion

After intravenous administration of 0.1 ml of 5% FITC-labeled dextran, microscopic images of the cerebral microcirculation were acquired by Archimed 3.7.0 software for online counting of the capillaries using Saisam software (Microvision, France). Functional capillary density, considered as the total number of spontaneously perfused capillaries (vessels with diameters less than 10 μm) per square mm of surface area (1 mm²), was determined by counting each capillary branch over a period of 4 min, as described previously in detail (Sabino et al., 2008). For labeling circulating leukocytes,

animals received intravenous administration of rhodamine 6G (0.3 mg/kg body weight) and fluorescence associated with leukocytes was visualized by epi-illumination. Five randomly selected venular segments, 30 to 100 μm in diameter and 100 μm long, were observed for 30 s in each preparation examined for leukocyte recruitment and the mean was calculated. Leukocyte–endothelial interactions were evaluated by determining the number of leukocytes adhered to the venular wall for 30 s. Rolling leukocytes were defined as crossing the 100 μm venular segment at a speed below the circulating red blood cells, and were expressed as number of cells/min.

Cerebral myeloperoxidase (MPO) activity

The neutrophil infiltration in brain was measured indirectly by quantifying MPO enzyme activity. Briefly, brain extracts were homogenized (50 mg/ml) in 0.5% hexadecyltrimethylammonium bromide and centrifuged at 4000 rpm for 15 min at 4 °C. MPO activity in the supernatant was measured spectrophotometrically as the change in optical density at 460 nm and 37 °C, using tetramethylbenzidine (1.6 mM) and H₂O₂ (0.5 mM) as the substrate.

Statistical analysis

All data were analyzed by ANOVA with Newman–Keuls post hoc test. Data are reported as means ± SEM. *P* value < 0.05 was considered significant.

Results

Rosiglitazone treatment improves the clinical condition of septic mice

We developed a clinical score to assess the severity of sepsis in our CLP model. This clinical score takes into consideration several alterations in appearance; physiology and behavior that are associated with severe sepsis in mice (see [Materials and methods](#) section). We observed that the severity score decreased from 6.0 ± 0.4 to 3.3 ± 0.2 (*P* < 0.0001) in rosiglitazone-treated septic animals, even though treated animals were still ranked as moderate sepsis.

Rosiglitazone decreases leukocyte–endothelial interaction and increases functional capillary density in mice brain microvasculature during experimental murine sepsis

Figs. 1A and **B** show that rolling and adhesion of leukocytes in septic animals were increased when compared to the control group. Rosiglitazone treatment decreased leukocyte rolling and adhesion in septic mice and treatment with the specific antagonist GW9662 abolished the protective effects of rosiglitazone with respect to both rolling and adhesion (**Figs. 1A** and **B**). **Panel 1** illustrates the increased leukocyte–endothelial interaction in the cerebral microcirculation of CLP mice (**Panel 1B**) as compared to either sham (data not illustrated, but shown in **Fig. 1**) or sham mice treated with rosiglitazone (**Panel 1A**). As we observed in **Figs. 1A** and **B**, rosiglitazone diminished leukocyte–endothelial interaction in septic animals (**Panel 1C**) and GW9662 treatment effectively impaired rosiglitazone effect (**Panel 1D**).

Table 1 shows mean arterial pressure and heart rate of septic mice. We did not observe significant alterations in haemodynamic parameters in the control CLP group or in the rosiglitazone treated group. Mice subjected to CLP had a significant decrease in the number of spontaneously perfused capillaries when compared to the control group. Treatment with rosiglitazone reversed capillary rarefaction when compared to the CLP group that did not receive rosiglitazone. The protective effect of rosiglitazone was completely abolished in the presence of the PPARγ antagonist GW9662, whereas GW9662 alone had no impact on the brain capillary density of septic mice (**Fig. 1C**).

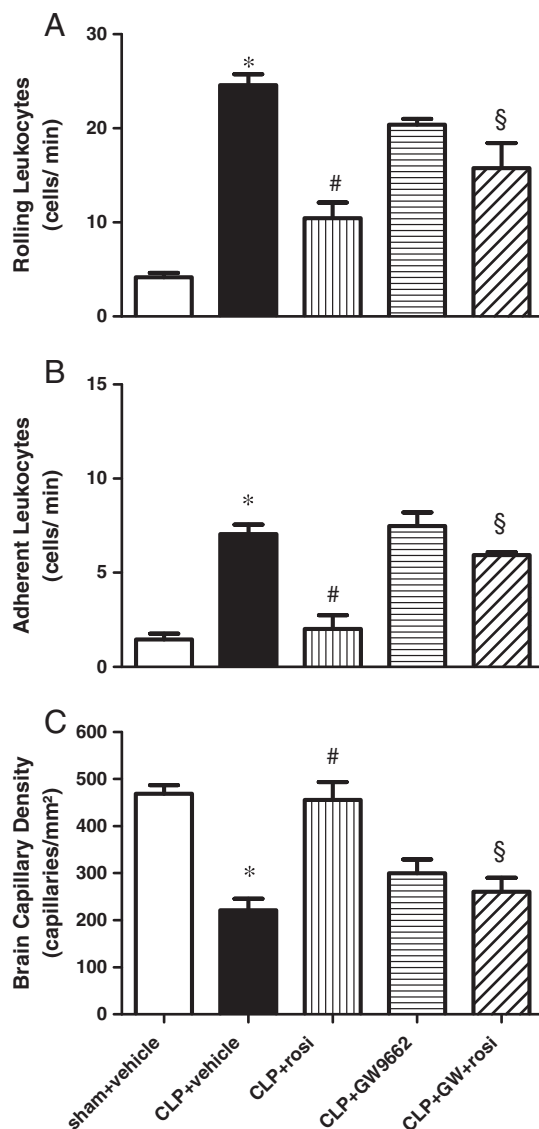


Fig. 1. Leukocyte rolling (A), adhesion (B), and capillary density (C) in the brain microvasculature after CLP in control and rosiglitazone treated mice. Sepsis was induced in animals and intravital microscopy was performed 24 h later. Data are expressed as mean \pm SEM (n = 8/group). * P < 0.05 vs. sham + vehicle mice; # P < 0.05 vs. CLP + vehicle group; § P < 0.05 vs. CLP + rosi group.

Rosiglitazone decreases neutrophil infiltration in brain of septic mice

Besides leukocyte–endothelial interaction of septic mice, we also observed an increase in the MPO activity in brain 24 h after CLP, reflecting the presence of neutrophils in brain of septic mice (Fig. 2). The inhibition of leukocyte–endothelial interaction caused by rosiglitazone, as we showed above, was followed by diminished neutrophil influx to the brain, since rosiglitazone treatment decreased MPO activity when compared to CLP group.

Discussion

Sepsis-associated cerebral microcirculatory alterations include a decrease in capillary density and increase of heterogeneity of blood flow characterized by closed capillaries or intermittently-perfused capillaries (Ince, 2004). Furthermore, inflammation, blood–brain barrier abnormalities, and apoptosis may also be involved (Papadopoulos et al., 2000). The mechanisms involved in sepsis-associated cerebral microcirculatory alterations have not been described, however. Our

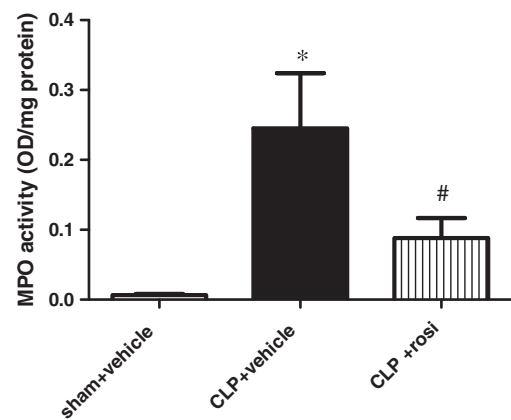


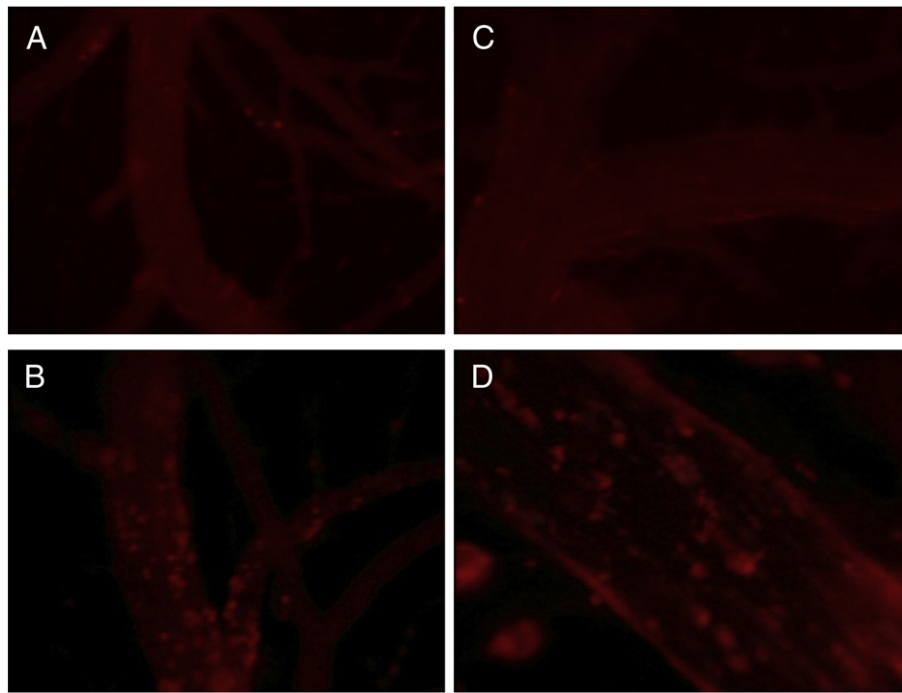
Fig. 2. Myeloperoxidase activity in the brain after CLP in control and rosiglitazone treated mice. Data are expressed as mean \pm SEM (n = 8/group). * P < 0.05 vs. sham + vehicle mice; # P < 0.05 vs. CLP + vehicle group.

study is the first to demonstrate the anti-inflammatory effects of a PPAR γ agonist in the cerebral microcirculation in sepsis, with significant alterations in functional capillary density and leukocyte–endothelial interactions in animals submitted to CLP and treated with rosiglitazone. Specifically, we found that administration of rosiglitazone improved cortical cerebral microcirculation and decreased leukocyte rolling and adherence and neutrophil influx during experimental sepsis. We have also found that the reduction of these components of the inflammatory process and increase in brain perfusion were associated with an improvement in clinical severity score and in survival (Araujo et al., unpublished results).

In our model of moderate sepsis, the animals presented a marked reduction in the number of perfused cerebral capillaries, which can increase cerebrovascular resistance and decrease oxygen and glucose transport (Vicaut, 1999) even though there were no significant alterations in systemic hemodynamics. These results are consistent with observations in an experimental model of sepsis using female sheep, in which cerebral microcirculation in brain was altered even when global perfusion pressure was maintained (Taccone et al., 2010). Moreover, our results demonstrate that treatment with rosiglitazone reversed the brain capillary rarefaction of septic mice. This is likely due to activation of PPAR γ , since administration of the PPAR γ antagonist GW9662 prevented it. Brain protecting effects of PPAR γ agonists were also shown in a model of hypertension in rats, where PPAR γ treatment prevented microvascular rarefaction and the inward remodeling and medial hypertrophy of cerebral arteries (Cipolla et al., 2010). Nevertheless, in this study rosiglitazone was given as a chronic treatment, which is an important difference from our protocol and may implicate different molecular mechanisms.

Additionally, we demonstrated a substantial decrease in rolling and adhesion of leukocytes in brain post-capillary venules after rosiglitazone treatment. These observations are consistent with a decrease in MPO activity as reflect of diminished neutrophil infiltration in brain 24 h in CLP animals treated with rosiglitazone. Accordingly, Comim et al., 2011, in a rat CLP model, observed an increase in rolling and adhesion of leukocytes and in MPO activity in the brain at different time points, being more pronounced 24 h after CLP. Nevertheless, those studies had not described the mechanisms involved yet.

As previously reported by (Bauer et al., 2000), recruitment of activated circulating leukocytes into microcirculation is a determinant feature of inflammatory injury in different vascular beds of septic animals and likely explains the cerebral microvascular impairment observed in our study. The anti-inflammatory effect of rosiglitazone was abolished by previous administration of GW9662. This result indicates that microvascular changes are dependent on specific signaling by PPAR γ thus, potentially, transcription of PPAR γ regulated genes in septic mice. These data, taken together provide evidence for the involvement of



Panel 1. Photomicrographs of the cerebral microcirculation of CLP mice treated with rosiglitazone or GW 9662 plus rosiglitazone. Rolling/adherent rhodamine labeled leukocytes of sham mice treated with rosiglitazone (A), CLP mice treated with vehicle (B), CLP mice treated with rosiglitazone (C) or CLP mice treated with GW + rosiglitazone (D). Photo width = 320 μ m; magnification 200 \times . These images are representative of 3 different experiments (n = 8/group).

Table 1
Effects of rosiglitazone and GW 9662 on mean arterial pressure and heart rate 24 h after CLP.

| Parameters | Sham + vehicle | Sham + rosiglitazone | CLP + vehicle | CLP + rosiglitazone | CLP + GW9662 | CLP + rosiglitazone + GW9662 |
|------------------------|----------------|----------------------|---------------|---------------------|--------------|------------------------------|
| Mean arterial pressure | 86 \pm 5 | 98 \pm 8 | 68 \pm 8 | 74 \pm 10 | 89 \pm 3 | 91 \pm 7 |
| Heart rate | 400 \pm 19 | 437 \pm 15 | 338 \pm 22 | 453 \pm 20 | 437 \pm 13 | 409 \pm 14 |

Each point represents the mean \pm SEM of eight animals for each group ($P > 0.05$). Treated mice received vehicle (DMSO) or rosiglitazone (0.5 mg/kg) or GW9662 (1 mg/kg) by i.v. injection and the analysis was performed 24 h after CLP. Sham-operated animals received vehicle.

Sepsis is a disorder characterized by systemic inflammatory response to an infection. Decrease in brain capillary density and increase in leukocyte rolling/adhesion occur. PPAR γ activation increases capillary density and decreases leukocyte rolling/adhesion. PPAR γ activation is protective against cerebral microvascular dysfunction in sepsis.

PPAR γ activation in leukocyte–endothelial interactions and alterations in capillary density in experimental sepsis. They reveal that PPAR γ is a potential target to protect the brain against microvascular dysfunction in sepsis, potentially leading to improvement of cerebral perfusion.

Acknowledgements

We acknowledge Dr. Guy Zimmerman for encouragement and unique help with manuscript revision.

References

- Bauer, P., et al., 2000. Role of endotoxin in the expression of endothelial selectins after cecal ligation and perforation. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 278, R1140–R1147.
- Carvalho-Tavares, J., et al., 2000. A role for platelets and endothelial selectins in tumor necrosis factor- α -induced leukocyte recruitment in the brain microvasculature. *Circ. Res.* 87, 1141–1148.
- Cipolla, M.J., et al., 2010. PPAR γ activation prevents hypertensive remodeling of cerebral arteries and improves vascular function in female rats. *Stroke* 41, 1266–1270.
- Comim, M.C., et al., 2011. Traffic of leukocytes and cytokine up-regulation in the central nervous system in sepsis. *Intensive Care Med.* 37, 711–718.
- Den Uil, C.A., et al., 2008. The microcirculation in health and critical disease. *Prog. Cardiovasc. Dis.* 51, 161–170.
- Gomes, R.N., et al., 2006. Exogenous platelet-activating factor acetylhydrolase reduces mortality in mice with systemic inflammatory response syndrome and sepsis. *Shock* 26, 41–49.
- Haraguchi, G., et al., 2008. Pioglitazone reduces systematic inflammation and improves mortality in apolipoprotein E knockout mice with sepsis. *Intensive Care Med.* 34, 1304–1312.
- Ince, C., 2004. Microcirculation in distress: a new resuscitation end point? *Crit. Care Med.* 32, 1963–1964.
- Kielian, T., et al., 2008. The synthetic peroxisome proliferator-activated receptor- γ agonist ciglitazone attenuates neuroinflammation and accelerates encapsulation in bacterial brain abscesses. *J. Immunol.* 180, 5004–5016.
- Koh, I.H., et al., 2010. Microcirculatory evaluation in sepsis: a difficult task. *Shock* 34 (Suppl. 1), 27–33.
- Papadopoulos, M.C., et al., 2000. Pathophysiology of septic encephalopathy: a review. *Crit. Care Med.* 28, 3019–3024.
- Sabino, B., et al., 2008. Effects of antihypertensive drugs on capillary rarefaction in spontaneously hypertensive rats: intravital microscopy and histologic analysis. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 51, 402–409.
- Sakr, Y., et al., 2004. Persistent microcirculatory alterations are associated with organ failure and death in patients with septic shock. *Crit. Care Med.* 32, 1825–1831.
- Szeles, L., et al., 2007. PPAR γ in immunity and inflammation: cell types and diseases. *Biochim. Biophys. Acta* 1771, 1014–1030.
- Taccone, F.S., et al., 2010. Cerebral microcirculation is impaired during sepsis: an experimental study. *Crit. Care* 14, R140.
- Vicaut, E., 1999. Microcirculation and arterial hypertension. *Drugs* 59, 1–10 Spec No.
- Zingarelli, B., 2005. Nuclear factor- κ B. *Crit. Care Med.* 33, S414–S416.
- Zingarelli, B., Cook, J.A., 2005. Peroxisome proliferator-activated receptor- γ is a new therapeutic target in sepsis and inflammation. *Shock* 23, 393–399.
- Zingarelli, B., et al., 2003. Peroxisome proliferator activator receptor- γ ligands, 15-deoxy-Delta(12,14)-prostaglandin J2 and ciglitazone, reduce systemic inflammation in polymicrobial sepsis by modulation of signal transduction pathways. *J. Immunol.* 171, 6827–6837.