

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Mariana Gisely Amarante Teixeira da Cunha

Atividade protetora da enzima PAF-acetilhidrolase (PAF-AH) na sepse: Efeitos sobre a eliminação bacteriana

Tese ou dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre Biologia Celular e Molecular

Orientador: Prof. Dr. Hugo Caire de Castro Faria Neto

Co-orientadora: Profa. Dra. Rachel Novaes Gomes

RIO DE JANEIRO

2010

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

C972

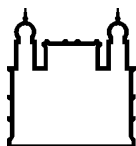
Cunha, Mariana Gisely Amarante Teixeira da.

Atividade protetora da enzima PAF-acetilhidrolase (PAF-AH) na sepse : efeitos sobre a eliminação bacteriana / Mariana Gisely Amarante Teixeira da Cunha. – Rio de Janeiro, 2010.
xix, 69 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2010.
Bibliografia: f. 59-69.

1. Sepse. 2. CLP. 3. rPAF-AH. 4. Eliminação bacteriana. I. Título.

CDD 618.92



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

AUTOR: Mariana Gisely Amarante Teixeira da Cunha

Atividade protetora da enzima PAF-acetilhidrolase (PAF-AH) na sepse: Efeitos sobre a eliminação bacteriana

ORIENTADOR: Prof. Dr. Hugo Caire de Castro Faria Neto

CO-ORIENTADORA: Prof. Dra. Rachel Novaes Gomes

Aprovada em: ____/____/____

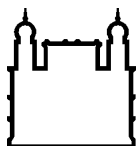
EXAMINADORES:

Profa. Dra. Adriana Ribeiro Silva

Profa. Dra. Carmen Penido Monteiro

Profa. Dra. Cláudio de Azevedo Canetti

Rio de Janeiro, 19 de Julho de 2010.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho em primeiro lugar a Deus, minha força maior.

Aos meus pais, João Luís T. da Cunha e Eliane G.A.T. Cunha meus verdadeiros mestres, por seu amor incondicional, dedicação e companheirismo.

Aos meus avós pelos ensinamentos que foram importante para a minha.

Ao meu irmão João Guilherme A.T. da Cunha e a Fernanda Coelho da Cunha e ao anjinho João Gabriel

Ao meu Tio Heráclio, meu segundo pai, que me deu abrigo e pelas nossas conversas, fontes de aprendizado.

À toda minha família, por ser meu exemplo de união e fé.

À minha orientadora, Rachel Novaes Gomes, minha mami mestre por me guiar em toda essa trajetória.

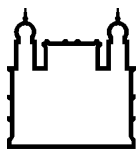
Ao meu orientador Hugo Caire de Castro Faria Neto, por ter permitido concretizar esse sonho.

Aos meus irmãos científicos, Nathassia Esther Roehrs e Sílvio Caetano e à “Michelinha” que também foi minha “maninha” científica mais velha, que me ajudou durante a iniciação científica.

Aos amigos do laboratório de Imunofarmacologia, que servem de exemplo pra mim.

À toda equipe da pós-graduação por toda dedicação.

Ao pessoal que compõe o pavilhão Osório de Almeida.



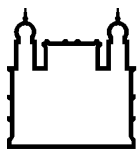
Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

AGRADECIMENTO

Agradeço em primeiro lugar a Deus pela vida, por ser minha luz e minha proteção, por me fortalecer e me dar coragem nos caminhos da vida. Aos meus pais amados, que moram no meu coração e que apesar de estarem longe, sempre se fazem presentes na minha vida. Obrigada pelo “colo” nos momentos em que precisava. Agradeço também pelo companheirismo, dedicação, pelo amor e pelos ensinamentos. Ao meu irmão e a minha cunhada sou grata por estarem comigo sempre nessa trajetória e me contagiando com sua alegria. Obrigada também por colocarem a dádiva de Deus, o “Joãozinho”, na minha vida. Obrigada a minha família pelo exemplo de união e dedicação. Agradeço aos meus avós, por seu amor e pelos ensinamentos. Ao meu tio Heráclio, pelo abrigo, compreensão, companheirismo e por ser meu segundo pai. À minha mãe científica, Rachel N. Gomes, obrigada pelos ensinamentos que serviram como base para minha vida científica. Obrigada por sua dedicação para com seus “filhos”, pela alegria que torna o nosso dia a dia no laboratório mais feliz. Ao Dr. Hugo Caire de Castro Faria Neto, por me orientar e me dar a oportunidade de ingressar no mundo da pesquisa científica e de poder fazer parte dessa equipe maravilhosa. À Dra. Patrícia Bozza, Fernando Bozza e à Clarissa Monteiro, agradeço por serem sempre atenciosos para conosco. Aos meus irmãos científicos, Rodrigo Amâncio, Nathassia Esther Roehrs (Natles) e Sílvio (“Silvuuu”), por sua amizade, companheirismo, dedicação e por fazerem parte da minha “família científica”. À minha “tia científica”, Daniele e à minha “prima” Angélica (“Pessoa”) pelo carinho. Aos meus amigos do laboratório de imunofarmacologia, agradeço por serem sempre prestativos, pela dedicação e carinho. Essa equipe é sensacional! À Rose, pessoa sempre prestativa e amorosa com a gente. À Patrícia Elaine e a “Adrianinha” pelo carinho e pela companhia durante a volta pra casa. Agradeço também à Alessandra, “Surrage”, “Zanon”, André, Isa Claudia, Edson, “Drica”, Cassiano, “Clarissinha”, Flora, Isabel, Renata, André Japiassú. À toda equipe que compõe a pós-graduação da BCM, por todo empenho e dedicação aos alunos, em especial a Daniele. Ao pessoal que compõe o Departamento de Fisiologia e farmacodinâmica pelo carinho.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

“Determinação coragem e autoconfiança são fatores decisivos para o sucesso. Se estamos possuídos por uma inabalável determinação conseguiremos superá-los. Independente das circunstancias, devemos ser sempre humildes, recatados e despidos de orgulho”.

Dalai Lama

LISTA DE ABREVIACOES

- a.C. – antes de Cristo.
- acetil:CoA – Acetilcoenzima A
- AKT – Conhecida como proteíno quinase B
- Ala - Alanina
- anti-MCP-1 – anticorpo neutralizante do MCP-1
- C5a – Complemento 5a neutralizante para o MCP-1
- SDRA – Síndrome do desconforto respiratório agudo
- Arg – Arginina
- Asn - Asparagina
- bact. - Bactéria
- BSA - Soro de Albumina Bovina, que vem do inglês
- C5a-R- Receptor do complemento 5a
- CARD – Proteína contendo domínio de recrutamento de caspase, que vem do inglês “Caspase recruitment domains”
- CASP – Peritonite causada por stent no colon ascendente, que vem do inglês “Colon ascendens stent peritonitis”
- CC quimiocinas - Quimiocinas com resíduos de cisteínas adjacentes
- CCR-2 – Receptor do MCP-1/CCL-2, que vem do inglês “chemokine (C-C motif) receptor 2”
- CCR2-/- - Animais genticamente deficientes para o receptor do MCP-1/CCL-2
- CCR-2A – Receptor do MCP-1/CCL-2 subtipo A
- CCR-2B – Receptor do MCP-1/CCL-2 subtipo B
- Cels. – Células
- Células NK – Células Exterminadoras naturais, que vem do inglês “Natural killer”.
- CLP – Ligadura e perfuração cecal, que vem do inglês “cecal ligation and puncture”
- cNOS – xido nítrico sintase constitutiva cálcio-dependente, que vem do inglês “constitutive NOS”
- C-terminal – Carboxi-terminal
- C quimiocinas - Quimiocinas com apenas uma cisteína

- CXC quimiocinas – Quimiocinas com um aminoácido qualquer entre as duas cisteínas
- CX3C quimiocinas - Quimiocinas com três aminoácidos entre as duas cisteínas
- DFP - Diisopropil fluorofosfatos
- DNA – Ácido desoxidorribonucléico
- *E.coli* – *Escherichia coli*
- ELISA – Ensaio imunoenzimático que vem do inglês Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
- eNOS ou NOS-3 – Óxido nítrico sintase de origem endotelial, que vem do inglês “Endothelial NOS”
- E-selectina – Selectina presente nas células endoteliais
- Gly- Glicina
- HDL – Lipoproteína de alta densidade, que vem do inglês “High-density lipoprotein”
- His - Histidina
- HMGB-1- Proteína de alta mobilidade do grupo box 1, que vem do inglês “high-mobility group box 1 protein”
- HSP- Proteínas do choque térmico, que vem do inglês “Heat shock protein”
- ICAM – Molécula de adesão intercelular, que vem do inglês “Inter-Cellular Adhesion Molecule”
- IFN – Interferon
- IL- Interleucina
- Ile - Isoleucina
- iNOS-/- - Animais geneticamente deficientes para Óxido nítrico sintase induzível
- iNOS ou NOS-2 - óxido nítrico sintase induzível, que vem do inglês “Inducible NOS”
- i.p - Intraperitoneal
- IPS - Fator Regulador de Interferon gama, que vem do inglês “interferon-promoter stimulator”
- IRF – Fator regulador de interferon, que vem do inglês “interferon regulatory factor”
- JNK – Proteína quinase c-Jun N-terminal, que vem do inglês “c-Jun N-terminal kinase”

- KC – Quimiocina derivada de queratinócitos, que é homóloga funcional a IL-8 humana, que vem do inglês “keratinocyte-derived chemokine”
- KDa – Quilodaltons
- Kg - Quilograma
- LAM - Lipoarabinomanana
- L-arginina – Ácido pentacóico 2-amino-5-(diaminometilideno-amino)
- LB - Luria Broth
- LBP- Proteína ligadora de LPS.
- L-citrulina – Ácido N5-Aminocarbonil-(2-5-diamino) pentanóico
- LDL – Lipoproteína de alta densidade, que vem do inglês “Low-density lipoprotein”
- liso-PAF - 1-álquil-2-liso-sn-glicero-3-fosfolina
- L-NAME – L-NG-Nitroarginina Metil Ester
- LPS – Lipopolissacarídeo
- MAPK – Proteína-quinase ativada por mitógeno, que vem do inglês “Mitogen-activated protein kinase”
- MAD-5- Gene Associado a Diferenciação de Melanoma- 5
- mCD14- CD14 ligado à membrana
- MCH-II -Complexo de Histocompatibilidade Principal de classe II, que vem do inglês “Major histocompatibility complex II”
- MCP-1 ou CCL-2 – Proteína quimiotática de monócitos, que vem do inglês “Monocyte chemotactic protein-1”
- MCP-1-/- Animais geneticamente deficientes para o MCP-1
- MD-2 – Antígeno de linfócito 2
- Mg - Miligrama
- MIF- Fator inibidor da migração de macrófagos, que vem do inglês “Macrophage migration inhibitory factor”
- MIP – Proteína inflamatória de macrófagos, que vem do inglês “Macrophage Inflammatory Proteins”
- ml - Mililitro
- motivo CpG - Oligodeoxinucleotídeo
- mRNA – Ácido Ribonucléico mensageiro
- mtNOS – Óxido nítrico sintase localizada na mitocôndria, que vem do inglês “mitochondrial NOS”

- MyD88 – Gene de resposta primária a diferenciação mielóide
- N - Normal
- NADPH oxidase - Nicotiamida-adenina dinucleotido fosfato oxidase
- NETs - Rede extracelular de neutrófilos, que vem do inglês “Neutrophil extracellular trap”
- NF-Kb – Fator nuclear kappa b, que vem do inglês “nuclear factor kappa b”
- Ng - Nanograma
- N-glicosilado – Glicosilação na posição N-acetil, formando a N-acetilglicosamina
- nM - Nanomolar
- *N. meningitidis* – *Neisseria meningitidis*
- nNOS ou NOS-1 – Óxido nítrico de origem neuronal, que vem do inglês “neuronal NOS”
- NO – Óxido nítrico, que vem do inglês “Nitric oxide”
- NOD – Domínio de oligomerização de nucleotídeo, que vem do inglês “nucleotide-binding oligomerization domain”
- NOD-LRR – NOD contendo repetições ricas em leucina
- NOS - Óxido nítrico sintases, que vem do inglês “Nitric oxide synthase”
- N-terminal – Amino-terminal
- PAF – Fator de ativação plaquetária, que vem do inglês “Platelet activating factor”
- PAF-AH – PAF-acetilhidrolase, que vem do inglês “PAF-acetylhydrolase
- PAMP – Padrões moleculares associados a patógenos, que vem do inglês “pathogen-associated molecular pattern”
- Pg - Picograma
- poli I:C – Ácido Poliinosinico:policitidílico
- pPAF-AH - PAF-AH plasmática
- PaO₂/FiO₂ – Relação entre a pressão arterial de oxigênio e a fração inspirada de oxigênio
- PBS – Tampão de sódio-potássio
- PI-3K - Quinase fosfatidilinositol-3, que vem do inglês “phosphatidylinositol”
- PRR – Receptor de reconhecimento de padrões, que vem do inglês “pattern recognition receptor”

- P-selectinas – Selectinas armazenadas em alfa-grânulos de plaquetas e corpos weibel-palade de células endoteliais
- RIG – Gene induzido por ácido retinóico 1, que vem do inglês “retinoic acid-inducible gene”
- Rip – Proteína de interação do receptor, que vem do inglês “receptor interaction protein”
- RNA – Ácido ribonucléico
- *S. aureus- Stafilococcus aureus.*
- sCD14- CD14 solúvel
- SDOM – Síndrome da disfunção orgânica múltipla
- Ser- serina
- SIRS – Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica, que vem do inglês “systemic inflammatory response syndrome”
- S-Nitrosilação - Adição de um grupo nitroso a um átomo de enxofre de um resíduo de aminoácido de proteínas
- SR27417 - [N-etil (2-dimetilamino)-N-(metil 3-piridinil) [4 - (2,4,6-triisopropylphenyl)] tiazole amina-2-il]
- *S. Typhimurium – Salmonella Thyphimurium*
- SOD - Superóxido dismutase
- TSST-1- Toxina síndrome do choque tóxico
- TCR- receptor de linfócitos T.
- TH – T auxiliar, que vem do inglês T helper
- Thr - Treonina
- TIR- Domínio intracelular homólogo ao receptor de IL-1
- TLR- Receptores semelhantes ao Toll, que vem do inglês “Toll like receptors”.
- TNFR – Receptor do Fator de necrose tumoral (TNF), que vem do inglês “TNF-receptor”
- TRIF – Domínio TIR com adaptador de indução de interferon- β
- TSA – Ágar de soja triptica, que vem do inglês “Tryptic Soy Agar”
- UFC – Unidades formadoras de colônias
- Val – Valina
- VCAM – Molécula de adesão vascular, que vem do inglês “vascular cell adhesion molecule”
- Xaa- Prolina

- μg - Micrograma
- μl - Microlitro
- μM – Micromolar

LISTA DE FIGURAS

4. INTRODUÇÃO

Figura 4.1 Curso da sepse	2
Figura 4.2- Estrutura do lipopolissacarídeo de bactérias gram negativas.....	7
Figura 4.3- Reconhecimento do LPS conjugado ao LBP por receptores CD14.....	8
Figura 4.4- Receptores da família toll (TLR) e suas vias de sinalização	10

6. MATERIAIS E MÉTODOS

Figura 6.1. Reação química da Sulfanilamida e Dihidroclotido de N-1-naptilenodiamina (NED) em condições ácidas (ácido fosfórico)	25
---	----

7. RESULTADOS

Figura 7.1- A rPAF-AH aumenta a eliminação bacteriana na cavidade peritoneal de animais 6 horas após o CLP.....	28
Figura 7.2. A rPAF-AH aumenta a eliminação bacteriana no sangue de animais 24 horas após o CLP.....	29
Figura 7.3. A rPAF-AH aumenta a eliminação bacteriana na cavidade peritoneal de animais estimulados com <i>S. Typhimurium</i>	31
Figura 7.4. A inibição da via de sinalização do PAF favorece melhor eliminação de bactérias.....	31
Figura 7.5. A rPAF-AH favorece uma melhor eliminação de bactérias por macrófagos peritoneais estimulados com a bactéria <i>E. coli</i>	32
Figura 7.6. A rPAF-AH não influencia de forma direta o crescimento das bactérias gram negativas <i>S. Typhimurium</i> e <i>E.coli</i> e da bactéria gram positiva <i>S. aureus</i>	34
Figura 7.7- O PAF e o liso-PAF não possuem efeito direto sobre o crescimento bacteriano.....	35

Figura 7.8- O A neutralização do MCP-1/CCL2 reduz a eliminação de bactérias na cavidade peritoneal de animais submetidos ao CLP.....	38
Figura 7.9- A neutralização do MCP-1/CCL2 reduz a eliminação da bactéria <i>E.coli</i> por macrófagos peritoneais.....	39
Figura 7.10- O MCP-1/CCL2 aumenta a eliminação da bactéria <i>E. coli</i> por macrófagos peritoneais.....	39
Figura 7.11- O tratamento com a rPAF-AH não foi capaz aumentar a eliminação bacteriana de animais geneticamente deficientes para o MCP-1/CCL2 (CCR2-/-) submetidos ao CLP.....	40
Figura 7.12- Aumento do número de UFC na cultura de neutrófilos provenientes de animais geneticamente deficientes para o CCR-2 quando comparados neutrófilos de animais C57Bl6.....	42
Figura 7.13- A inibição da síntese de óxido nítrico aumenta a proliferação de bactérias na cavidade peritoneal de animais submetidos ao CLP.....	44
Figura 7.14- O tratamento com a rPAF-AH aumenta os níveis de nitrito na cavidade peritoneal de animais 6 horas após o CLP.....	45
Figura 7.15- Aumento do número de UFC na cavidade peritoneal de animais geneticamente deficientes para iNOS (iNOS-/-) mesmo após o tratamento com rPAF-AH.....	47
Figura 7.16. O tratamento com a rPAF-AH aumenta os níveis de IFN-γ na cavidade peritoneal de animais 6 horas após o CLP.....	48
Figura 7.17- O MCP-1/CCL2 atua de forma cooperativa com a rPAF-AH, aumentando significativamente os níveis de nitrito liberados por macrófagos peritoneais após o estímulo com a bactéria <i>E. coli</i>.....	50

SUMÁRIO

1. PRELIMINARES

Folha de rosto	i
Ficha catalográfica.....	ii
Folha de aprovação	iii
Folha de dedicatória	iv
Folha de agradecimentos	v
Folha de epígrafe	vi
Lista de abreviações	vii
Lista de figuras	xiii
2.RESUMO	xviii
3.ABSTRACT	xix
4. INTRODUÇÃO	1
4.1. Sepsis	1
4.2- Modelos animais de sepsis	3
4.3- Resposta imune inata durante a sepsis	4
4.3.1- Receptores de reconhecimento de padrões	5
4.3.1.1- O complexo CD14-LBP	7
4.3.1.2- Receptores Toll-like	8
4.3.2- Citocinas e quimiocinas liberadas durante a sepsis	11
4.3.3- Espécies reativas do oxigênio	15
4.3.3.1- Óxido nítrico	15
4.3.4- Mediadores lipídicos na Sepsis	16
4.3.4.1- Fator de ativação plaquetária (PAF)	17
4.3.4.2- PAF-acetilhidrolase (PAF-AH).....	18
4.3.4.3- A PAF-AH na sepsis	20
5. OBJETIVOS	22

5.1 OBJETIVO GERAL	22
5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
6. MATERIAIS E MÉTODOS	23
Animais	23
Ligadura e punção cecal (CLP)	23
Desafio com a bactéria <i>Salmonella Typhimurim</i>	23
Tratamento	24
Análise do número de unidades formadoras de colônia (UFC).....	24
Cultura de macrófagos peritoneais	24
Cultura de neutrófilos peritoneais	24
Efeito direto sobre eliminação bacteriana	25
Dosagem dos níveis de Nitrito	25
Dosagem dos níveis de INF-γ	25
Análise estatística	26
7. RESULTADOS	27
7.1- Aumento da eliminação bacteriana de animais submetidos ao CLP ou ao modelo de injeção intraperitoneal da bactéria <i>S. Thyphimurium</i> após o tratamento com a rPAF-AH	27
7.2- O aumento da eliminação de bactérias é decorrente da inativação da via de sinalização PAF.....	30
7.3- Aumento da eliminação bacteriana em macrófagos peritoneais tratados com a rPAF-AH e estimulados com a bactéria <i>Escherichia coli</i>.....	30
7.4- Efeito direto da rPAF-AH sobre o crescimento bacteriano.....	33
7.5- Efeito direto do PAF e do liso-PAF sobre o crescimento bacteriano.....	33

7.6- O MCP-1/CCL2 tem um papel importante na melhor eliminação de bactérias conferida aos animais tratados com a rPAF-AH.....	36
7.7- O tratamento com a enzima rPAF-AH aumenta os níveis de nitrito na cavidade peritoneal de animais submetidos ao CLP e o óxido nítrico tem um papel importante na eliminação de bactérias.....	43
7.8- O tratamento com a rPAF-AH aumenta a síntese de interferon-gama (IFN- γ) na cavidade peritoneal dos animais seis horas após o CLP.....	46
7.9- O MCP-1 aumenta a síntese de óxido nítrico	49
8. DISCUSSÃO	51
9. CONCLUSÃO	58
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59

Efeito protetor da enzima PAF-acetilhidrolase (PAF-AH) na sepse: Efeitos sobre a eliminação bacteriana

2. RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Mariana Gisely Amarante Teixeira da Cunha

A incidência de sepse nas Unidades de Terapia Intensiva é alta e representa uma das maiores causas de mortalidade. Foi demonstrado pelo nosso laboratório que a atividade da enzima PAF-AH está reduzida no curso da sepse e que animais submetidos à sepse de origem polimicrobiana (CLP) e tratados com rPAF-AH apresentavam uma maior taxa de sobrevivência quando comparados com animais não tratados e submetidos ao CLP. O objetivo desse estudo foi analisar o efeito do tratamento com a rPAF-AH sobre a eliminação bacteriana e os mediadores envolvidos nesse processo. Analisamos a eliminação de bactérias na cavidade de animais submetidos ao CLP ou a injeção intraperitoneal da bactéria *Salmonella enterica* sorotipo Typhimurium (*S. Typhimurium*), tratados com a rPAF-AH. Analisamos também o crescimento de bactérias em culturas de macrófagos peritoneais tratados com a rPAF-AH e estimulados com a bactéria *Escherichia coli*. Observamos que o tratamento com a rPAF-AH reduziu de forma significativa o crescimento bacteriano em animais submetidos ao CLP ou desafiados com a bactéria *S. Typhimurium* quando comparados aos animais sépticos. A rPAF-AH também favorece melhor eliminação de bactérias por macrófagos peritoneais estimulados com *Escherichia coli*. Nossos resultados sugerem que uma maior produção de MCP-1 e IFN- γ pode estar relacionada a um aumento na síntese de óxido nítrico, o qual poderia aumentar a eficiência da eliminação bacteriana. Portanto, a rPAF-AH pode ser uma ferramenta terapêutica importante utilizada no tratamento de pacientes sépticos, pois é benéfica tanto durante infecções polimicrobianas (CLP), bem como em infecções causadas por apenas um microorganismo Gram negativo (como a *Escherichia coli* ou *S. Typhimurium*).

3. ABSTRACT

The incidence of sepsis is high and represents the main cause of death in Intensive Care Units. Our laboratory has demonstrated that the rPAF-AH activity is reduced during sepsis and that animals subjected to polymicrobial sepsis (CLP) and treated with rPAF-AH showed a higher survival rate when compared with untreated animals. The purpose of this study was to analyze the effect of rPAF-AH treatment on bacterial clearance and to characterize the mediators involved on this process. We analyzed the bacterial clearance of mice submitted to CLP or intraperitoneally injected with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*) after the treatment with rPAF-AH. We also analyzed the bacterial growth in peritoneal macrophage culture treated with rPAF-AH and stimulated with *Escherichia coli*. We observed that rPAF-AH administration significantly reduced the bacterial growth in animals subjected to CLP or challenged with the *S. Typhimurium* when compared to septic animals. The rPAF-AH promotes better bacterial clearance by peritoneal macrophages stimulated with *Escherichia coli*. Our results suggest that an increased production of MCP-1 and IFN- γ is related to high synthesis of nitric oxide that could lead to a more efficient bacterial clearance. Therefore rPAF-AH may be an important therapeutic tool used in treatment of septic patients, because it is beneficial either during polymicrobial infections (CLP) or in infections caused only by one Gram negative microorganism (such as *Escherichia coli* or *S. Typhimurium*).

4. INTRODUÇÃO

4.1 - Sepsis

Hipócrates foi o primeiro a descrever as manifestações clínicas da sepsis e introduziu o termo putrefação da ferida (“wound putrefaction”). Ibn Sina observou a associação entre a putrefação do sangue com a febre e esse conceito foi utilizado até o século XVIII, quando Louis Pasteur identificou a presença de bactérias e microorganismos responsáveis pelo processo de putrefação. Em 1914, Hugo Schottmüller lançou a base para a definição moderna da sepsis e identificou que a presença de um processo infeccioso era fundamental para o desenvolvimento da doença. Posteriormente Lewis Thomas descreveu: “é a nossa resposta ao microorganismo que causa a doença (sepsis) e o nosso arsenal contra a bactéria é tão forte, que pode ser mais perigoso do que a própria bactéria” (Thomas, 1972). A partir desse conceito, novos estudos foram realizados voltados para a análise da resposta do hospedeiro à infecção (Rittirsch e cols., 2008). Finalmente em 1992, a sepsis foi definida como a resposta inflamatória sistêmica associada a um processo infeccioso, envolvendo diversos microorganismos como bactérias, fungos, vírus, parasitas (Bone e cols., 1992).

Nos Estados Unidos (EUA), o número de pacientes hospitalizados com sepsis por ano aumentou de 164.072 no ano de 1979 para 659.935 casos no ano de 2000 e essa alta incidência reflete nos gastos com a internação dos pacientes. Estima-se que o gasto com cada paciente é de \$50.000, resultando num custo anual de 17 bilhões de dólares nos EUA (Angus e cols., 2001; Angus e Wax, 2001; Chalfin e cols., 1993). Os dados epidemiológicos sobre a presença de sepsis nas Unidades de Terapia Intensiva (UTIs) brasileiras ainda são escassos. Um estudo verificou no período de maio de 2001 a janeiro de 2002, a incidência de sepsis nas UTIs localizadas no estado de São Paulo e Santa Catarina. Dos 1383 pacientes analisados, 61,4% foram diagnosticados com sepsis e a taxa de mortalidade nesses pacientes foi de 34,7% (Silva e cols., 2004). Em um estudo mais recente, envolvendo 3128 pacientes internados em 75 UTIs de diversos estados Brasileiros, a incidência de sepsis foi de 19% e a taxa de mortalidade entre esses pacientes foi de aproximadamente 16%. E a mortalidade aumentou de acordo com a severidade da doença, uma vez que pacientes com sepsis grave e choque séptico apresentaram taxa de mortalidade de 34,4% e 65,3%, respectivamente (Sales Júnior e cols., 2006).

Na fase inicial da sepse ocorre a Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica (SIRS), que pode ter como conseqüências: alterações nos sistemas de coagulação sanguínea, na micro-circulação, no sistema cardiovascular e levar a disfunção orgânica múltipla (**Figura 4.1**). Na sepse severa há a presença um estado pró-coagulante exagerado, que pode afetar a perfusão sanguínea e a funcionalidade de órgãos (Cinel e Opal, 2009). Já o choque séptico ocorre quando as alterações da perfusão sanguínea não respondem a reposição volêmica e o paciente permanece no estado de hipotensão, acompanhada da disfunção orgânica múltipla, envolvendo três ou mais órgãos (Pinheiro da Silva e Nilzete, 2009). A Síndrome da Disfunção Orgânica Múltipla (SDOM) é um problema de grande relevância clínica por ser responsável por cerca de 80% dos óbitos em pacientes sépticos (Kanus e Wagner, 1989).

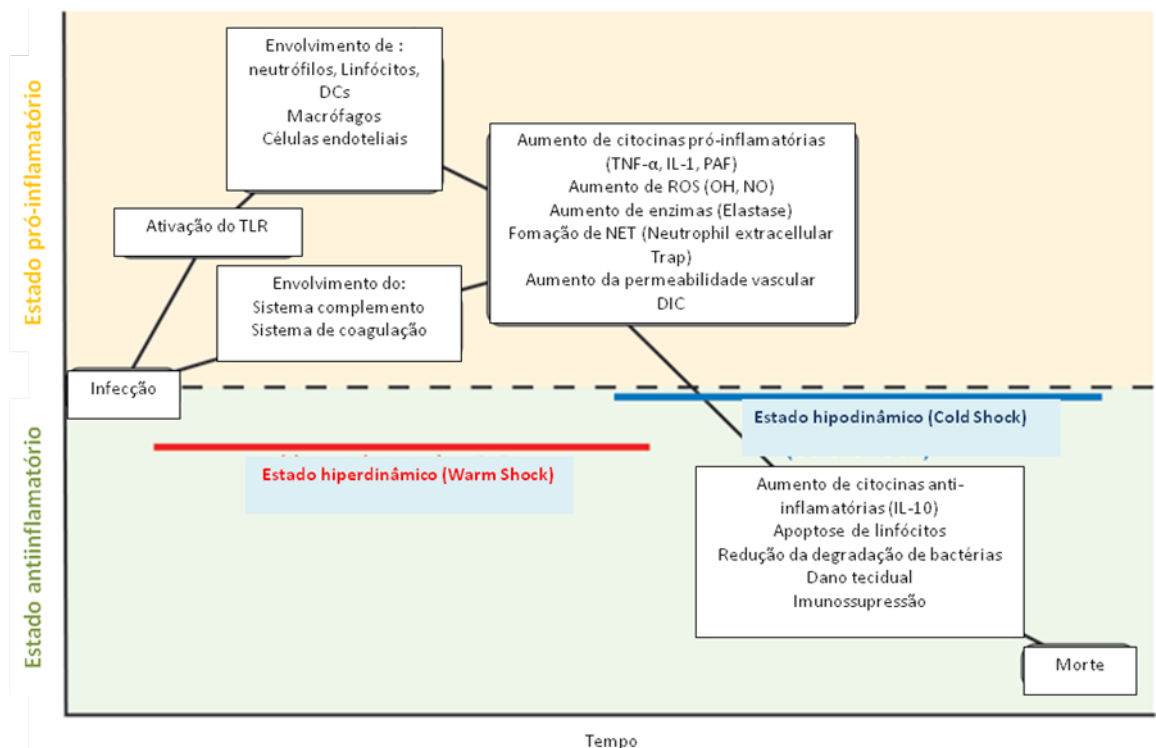


Figura 4.1 Curso da sepse. A sepse possui duas fases, um estado pró-inflamatório e outro anti-inflamatório. Fonte: (Doi e cols., 2009).

4.2- Modelos animais de sepse

Os modelos experimentais de sepse permitem um maior entendimento sobre a fisiopatologia e o tratamento da sepse. Dentre os modelos mais utilizados para o estudo da sepse temos o modelo de injeção de toxinas exógenas (LPS-endotoxemia letal), modelo de alteração da barreira protetora endógena (CLP, CASP) e o modelo de infusão ou instilação de bactérias exógenas (Doi e cols., 2009).

Na endotoxemia letal os animais são desafiados com o lipopolissacarídeo (LPS) (pelas vias: intraperitoneal, intratraqueal, intravenosa, entre outras), que leva ao aumento de mediadores pró-inflamatórios (TNF- α , IL-1, IL-6, KC e MIP-2) 4 horas após o desafio com LPS. Os níveis de citocinas e quimiocinas começam a reduzir no período de 8 horas (Remick e cols., 2000). O ponto negativo desse modelo é que não há o processo infeccioso acompanhado da replicação bacteriana, ele apenas mimetiza a síndrome da resposta inflamatória sistêmica ao ativar o receptor TLR-4. Além disso, na endotoxemia letal as citocinas são liberadas mais precocemente em relação aos animais submetidos ao modelo do CLP (Remick e cols., 2000).

Em 1980, o CLP foi desenvolvido por Wichterman e cols. (1980) e até hoje é considerado o principal modelo para o estudo da fisiopatologia da sepse por ser clinicamente relevante, pois simula a ruptura do apêndice cecal ou a diverticulite perfurada. No CLP o ceco é exposto, amarrado e perfurado abaixo da válvula ileocecal, ocorrendo o extravazamento de conteúdo fecal para a cavidade abdominal, causando peritonite polimicrobiana (Wichterman e cols., 1980). A severidade do CLP pode ser ajustada pelo aumento do tamanho (ajustado pela largura da agulha - gauge) ou do número de perfurações (Salgado Junior e cols., 2007; Wichterman e cols., 1980) e a partir da taxa de mortalidade o CLP pode ser classificado em letal (12 perfurações do ceco com agulha de 21 gauge) e sub-letal (2 perfurações do ceco com agulha de 21 gauge), como descrito por Benjamim e cols. (2000). O CLP sub-letal é marcado pelo aumento do número de neutrófilos na cavidade peritoneal, enquanto que no CLP-letal os neutrófilos migram menos para a cavidade, e essa redução do número de neutrófilos foi acompanhada pelo aumento da proliferação bacteriana tanto no peritoneo quanto no sangue (Benjamim e cols., 2000).

O modelo de CLP sub-letal (1 perfuração cecal com agulha de 18 gauge) induz inicialmente a liberação de citocinas pró-inflamatórias como L-6 e MIF (Gomes e cols., 2006). Já no CLP letal podemos estudar a sepse severa marcada por resposta pró-inflamatória inicial seguida da imunossupressão, associada com a maior produção de citocinas antiinflamatórias como a IL-10, que levam a inativação e apoptose das células de defesa (Macrófagos, neutrófilos, Células dendríticas, células T e células B), aumento do número de células T regulatórias CD4+CD25+ (Scumpia e cols., 2006) e esse conjunto de fatores predispõem a ocorrência de uma infecção secundária.

A injeção ou instilação de bactérias vivas permite o estudo do mecanismo de infecção de apenas bactérias do mesmo gênero e espécie ou de um conjunto de diferentes tipos de bactérias (co-infecção). As bactérias podem ser injetadas por diversas vias, como: intravenosa, intraperitoneal, intranasal e/ou intratraqueal (Buras e cols., 2005).

4.3- Resposta Imune Inata durante a sepse

As barreiras epiteliais impedem a entrada de agentes infecciosos no organismo e dentre elas podemos destacar:

- Barreiras Mecânicas: células epiteliais da pele, intestino, pulmões, olhos e nariz; fluxo longitudinal de ar e fluídos; movimento do muco pelos cílios.
- Barreiras Químicas: ácidos graxos da pele, baixo pH e enzimas intestinais; enzimas salivares, além dos peptídeos antibacterianos presentes na pele, intestino e pulmões.
- Barreiras Microbiológicas: a flora normal da pele e intestinal.

Quando essa linha de defesa é rompida, seja por ferimentos, queimaduras, entre outros, os micróbios invadem o organismo do hospedeiro, sendo imediatamente reconhecidos pelas células do sistema imune inato: neutrófilos, macrófagos teciduais, monócitos e células dendríticas (Janeway, 2007; Rudiger e cols., 2008). Macrófagos residentes nos tecidos, ao reconhecerem um microorganismo, secretam mediadores que irão atrair fagócitos para o local da infecção (quimiocinas). Os neutrófilos são as primeiras células recrutadas para o

local da infecção. Durante a sepse, podemos observar um aumento da migração de neutrófilos para o local da infecção durante a fase inicial (Fialkow e cols., 2006). Durante a sepse severa, pode ocorrer o processo de apoptose de neutrófilos, a anergia de monócitos e macrófagos, que podem levar ao processo de imunossupressão, impedindo o combate da infecção e favorecendo o aparecimento de infecções oportunistas. Como demonstrado por Alves-Filho e cols. (2005), animais submetidos ao modelo de CLP-letal apresentaram redução da migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal, associada ao aumento do número de bactérias tanto no sangue quanto na cavidade peritoneal, reduzindo a chance de sobrevivência dos animais.

4.3.1- Receptores de reconhecimento de padrões

Os macrófagos e os neutrófilos reconhecem patógenos através de seus receptores de superfície, como o receptor de manose de macrófagos, os receptores de varredura (que reconhecem o ácido lipoteicoico de bactérias gram positivas), o receptor CD14 presente em monócitos e macrófagos e os receptores da família toll. Quando ativados, esses receptores induzem fagocitose de microorganismos e liberação de citocinas, quimiocinas e espécies reativas do oxigênio que auxiliam na degradação dos agentes invasores (Janeway, 2007). Durante a fagocitose os microorganismos são internalizados em fagossomas. Os leucócitos possuem os lisossomas, que contém enzimas proteolíticas, proteínas e peptídeos que levam a degradação de bactérias. O fagossoma funde com o lisossoma, gerando o fagolisossoma, onde o conteúdo lisossomal é liberado para destruir o patógeno (Janeway, 2007).

Os receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) reconhecem os padrões moleculares presentes nas superfícies de patógenos (PAMPs) (Cohen, 2002; Janeway, 2007). Dentre os PAMPs podemos destacar o lipopolissacarídeo (LPS) presente em bactérias gram negativas, os peptidoglicanos, lipoarabinomanano de micobactéria (LAM), zimosan (levedura), flagelina, DNA bacteriano e RNA viral, entre outros (Cohen, 2002). Existem três grandes famílias de PRRs: Os receptores Toll-like, proteínas NOD ricas em repetições de leucina (NOD-LRR), receptores semelhantes ao RIG-1 (Gene 1 induzido por ácido retinóico - RLRs) (Cinè e Opal, 2009).

Os receptores da família NOD possuem uma região C-terminal rica em repetições de leucina e uma região N-terminal com função efetora, capaz de ativar a apoptose ou diversas vias de sinalizações intracelulares. Durante o processo infeccioso as proteínas NOD são recrutadas do citoplasma para a membrana plasmática, onde reconhecem peptídeos (Opitz e cols., 2009). O ligante para NOD1 é o diamino-pimelato de bactérias gram-negativas, enquanto que o NOD 2 reconhece o muramíl dipeptídeo do peptídeo glicano (Cinel e Opal, 2009). Quando ativados, esses receptores ativam a quinase Rip2 e o CARD9, que culmina com a ativação de NF- κ B e da MAPK (Opitz e cols., 2009).

A família de Receptores semelhantes ao RIG-1 (RLRs), presentes principalmente nas células endoteliais, é composta pelo Gene indutor de ácido retinóico 1 (RIG-1) (Andrejeva e cols., 2004; Yoneyama e Fujita, 2004), que reconhece RNA de fita simples de vírus com região 5' trifosfato (Hornung e cols., 2006; Kato e cols., 2006; Pichlmair e cols., 2006), e pelo Gene Associado a Diferenciação de Melanoma- 5 (MDA-5) (Andrejeva e cols., 2004; Yoneyama and Fujita, 2004), que é ativado por RNA de vírus e pelo DNA de fita dupla sintético poli I:C (Kato e cols., 2006). Ambos, RIG-1 e MDA-5 possuem o CARD associado à molécula adaptadora Fator Regulador de Interferon gama-1 (IPS-1) (Kawai e cols., 2005). O IPS-1 ativa a via de sinalização de IRF3/7 dependente da resposta do IFN-1 (Kawai e cols., 2005) e a resposta inflamatória dependente de NF- κ B (Kumar e cols., 2006).

A membrana externa de bactérias gram negativas é constituída por uma bicamada lipídica, separada da membrana citoplasmática interna por peptídeo glicanos. A molécula do LPS está presente na membrana externa da bactéria e é composta por uma cadeia lateral de polissacarídeo (Antígeno O), que varia entre as espécies de bactérias gram-negativas, tanto em composição quanto em comprimento. Além disso, o LPS possui em sua estrutura um núcleo, um oligossacarídeo (2-ceto-3-ácido deoxioctônico) e a porção lipídica A, que serve para ancorar o LPS à parede celular bacteriana e é o principal componente ativo e tóxico do LPS, relacionado com a habilidade da bactéria em ativar a célula do hospedeiro (**Figura 4.2**) (Cohen, 2002; Zivot e Hoffman, 1995). Já as bactérias gram-positivas produzem exotoxinas potentes relacionadas ao choque séptico. Um exemplo é a toxina da síndrome do choque tóxico (TSST-1) produzida por cepas de

Streptococcus piogênica. Essas exotoxinas exibem propriedades de superantígenos, que tem a habilidade de se ligar promiscuamente ao Complexo de Histocompatibilidade Principal de classe II (MCH-II) e ao receptor de linfócitos T (TCR). Isso desencadeia a ativação maciça de células T e a liberação de citocinas pró-inflamatórias (Cohen, 2002).

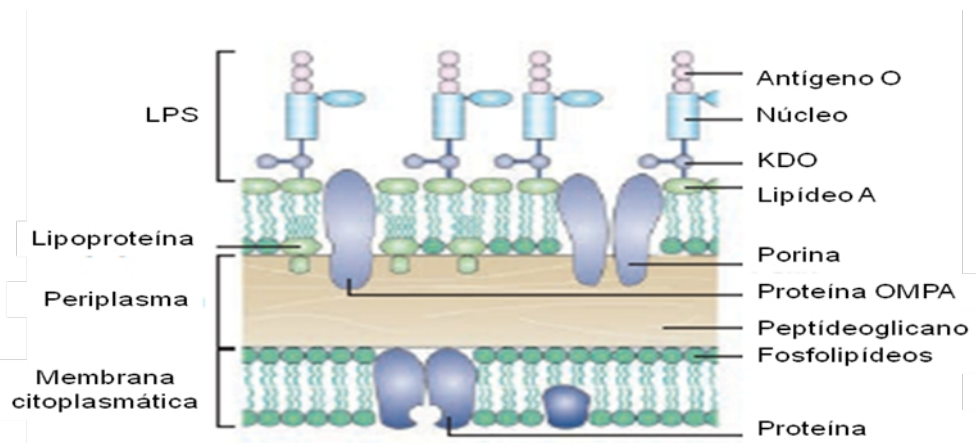


Figura 4.2- Estrutura do lipopolissacarídeo de bactérias gram negativas. KDO: 2-ceto-3-ácido deoxioctônico; LPS: Lipopolissacarídeo (Lolis e Bucala, 2003).

4.3.1.1- O complexo CD14-LBP

O CD14 é um co-receptor, capaz de mediar a ativação de monócitos e de macrófagos, quando se liga ao LPS conjugado ao LBP (proteína ligadora de LPS) (Cohen, 2002; Pugin e cols., 1993). Existem duas formas de CD14: o CD14 ligado à membrana (mCD14), que é uma molécula de glicofosfatidilinositol ancorada na superfície celular, e o CD14 solúvel (sCD14), encontrado na circulação sanguínea (Wright e cols., 1990). O sCD14 se liga ao LPS conjugado ao LBP e pode transferir o LPS ligado a ele para o mCD14 ou para o complexo TLR-4/MID-2. Além disso, o sCD14 pode promover o efluxo de LPS da membrana do leucócito, removendo o LPS ligado ao mCD14 e favorecer a ligação desse LPS a lipoproteínas (**Figura 4.3**) (Kitchens e Thompson, 2005). O sCD14 é encontrado em indivíduos saudáveis, mas seus níveis aumentam precocemente no soro de pacientes sépticos e este aumento foi diretamente relacionado com a taxa de mortalidade de pacientes sépticos (Burgmann e cols., 1996; Cohen, 2002; Landmann e cols., 1995a; Landmann e cols., 1995b). Em recém-nascidos com sepse causada por *Streptococcus agalactiae*, os

níveis elevados de sCD14 no plasma foram correlacionados com aumento dos níveis de citocinas como IL-1 β , IL-6 e IL-8 no plasma (Berner e cols., 2002).

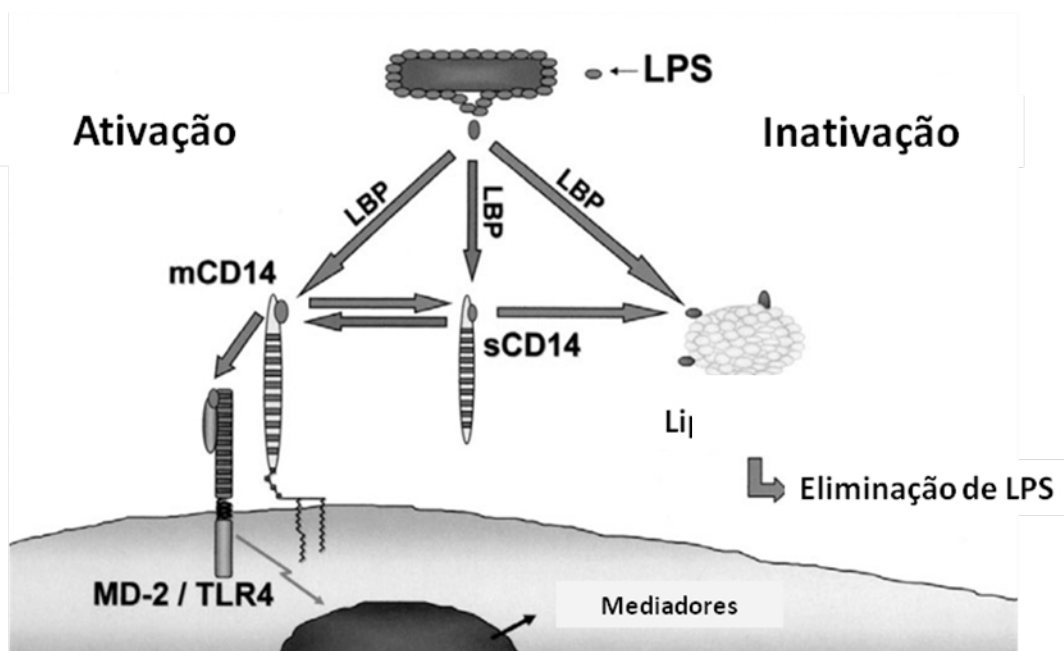


Figura 4.3- Reconhecimento do LPS conjugado ao LBP por receptores CD14. O receptor CD14 solúvel pode levar a ativação celular, através da transferência do LPS para o CD14 presente na membrana ou diretamente ao complexo TLR-4/MD-2. Além disso, o sCD14 pode promover o efluxo de LPS da parede das células inflamatórias e facilitar a ligação desse LPS a lipoproteínas, reduzindo assim a ativação celular e a resposta inflamatória. LBP: Proteína ligadora de LPS; LPS: Lipopolissacarídeo; mCD14: CD14 de membrana; MD 2: Antígeno de linfócito 2; TLR-4: Receptor toll like 4; sCD14: CD14 solúvel (Kitchens e Thompson, 2005).

4.3.1.2- Receptores Toll-like

Os receptores Toll foram inicialmente encontrados na *Drosófila melanogaster* por Christiane Nüsslein-Volhard (1985) e estão envolvidos no reconhecimento de componentes microbianos (Cohen, 2002). Posteriormente, estudos identificaram, em mamíferos, a presença de receptores homólogos aos receptores da família toll encontrados nas *Drosófilas*, sendo denominados receptores Toll-like (TLRs). Os receptores Toll-like são capazes de reconhecer os PAMPs e possuem um domínio intracelular homólogo ao receptor de IL-1 (TIR). Apesar de uma especificidade limitada, esses receptores reconhecem diversos organismos patogênicos, desencadeando a ativação e indução de sinalização intracelular através de proteínas adaptadoras, como por exemplo, o MyD88, que está presente em quase todos os receptores da família Toll, exceto no TLR-3, que possui o TRIF como molécula adaptadora. Essa via de sinalização intracelular culmina com a ativação e

translocação do fator de transcrição NFκB para o núcleo, ocorrendo síntese de citocinas e quimiocinas (Cohen, 2002; Janeway, 2007).

Estima-se que os mamíferos possuam cerca de 10 a 15 tipos de receptores toll-like (**Figura 4.4**). Dados na literatura demonstram que humanos possuem 10 TLRs, enquanto que em camundongos foram identificados 13 receptores. Os receptores TLR-1 a TLR-10 são homólogos em ambas espécies (Salomao e cols., 2008). Os receptores TLR-1, TLR-2 e TLR-6 podem formar heterodímeros (Salomao e cols., 2008). O receptor TLR-1, presente em macrófagos, monócitos, células dendríticas e linfócitos B, reconhece triacil peptídeos (Akira e Hemmi, 2003). Já o TLR-2 expresso principalmente por monócitos, macrófagos e células dendríticas, se liga a glicolipídeos, peptideoglicano de bactérias gram positivas (Schwandner e cols., 1999), lipoarabinomanana (LAM) de micobactérias, o glicofosfatidilinositol de *T. cruzi*, ácido lipoteicoico (Schwandner e cols., 1999) e ao zimozan de fungos (Sato e cols., 2003), o TLR-3 possui como ligante o DNA de fita dupla, o TLR-4 reconhece o lipopolissacarídeo, o TLR-5 a flagelina bacteriana (Hayashi e cols., 2001), o TLR-6 diacil lipopeptídeos de micobactérias, o TLR-7 e TLR-8 o RNA (Akira e Hemmi, 2003) e o TLR-9 o motivo CpG não metilado de bactérias (Bauer e cols., 2009; Bauer e cols., 2008).

O TLR-4 expresso principalmente por neutrófilos e macrófagos, também está presente em plaquetas. Quando as plaquetas são ativadas pelo LPS, elas se ligam aos neutrófilos e induzem a formação NETs (Armadilha extracelular de neutrófilos), que auxiliam na captura dos microorganismos (Clark e cols., 2007). Alguns estudos demonstraram aumento da expressão de TLR-2 e TLR-4 tanto em pacientes sépticos quanto em animais submetidos a modelos experimentais de sepse, principalmente em macrófagos esplênicos, hepáticos, células endoteliais alveolares (Andonegui e cols., 2003; Harter e cols., 2004; Tsujimoto e cols., 2005; Williams e cols., 2003). Lissauer e cols. (2009) compararam a expressão do RNA mensageiro de receptores da família toll entre pacientes sépticos e pacientes com SIRS 24 horas após o diagnóstico e observaram aumento significativo do mRNA nos leucócitos de pacientes sépticos, quando comparados aos pacientes com SIRS, para os receptores TLR-1, TLR-4, TLR-5, TLR-8. Apenas o mRNA do TLR-7 estava reduzido. Esses resultados demonstram que o aumento da expressão dos receptores TLR é decorrente resposta inflamatória associada ao processo infeccioso

e que a resposta inflamatória em si não é capaz de induzir aumento da expressão dos TLRs. Tsujimoto e cols. (2005), não observaram uma correlação entre a expressão de TLR-2 e TLR-4 com a severidade da sepse e relatam que existem poucos dados na literatura sobre essa correlação.

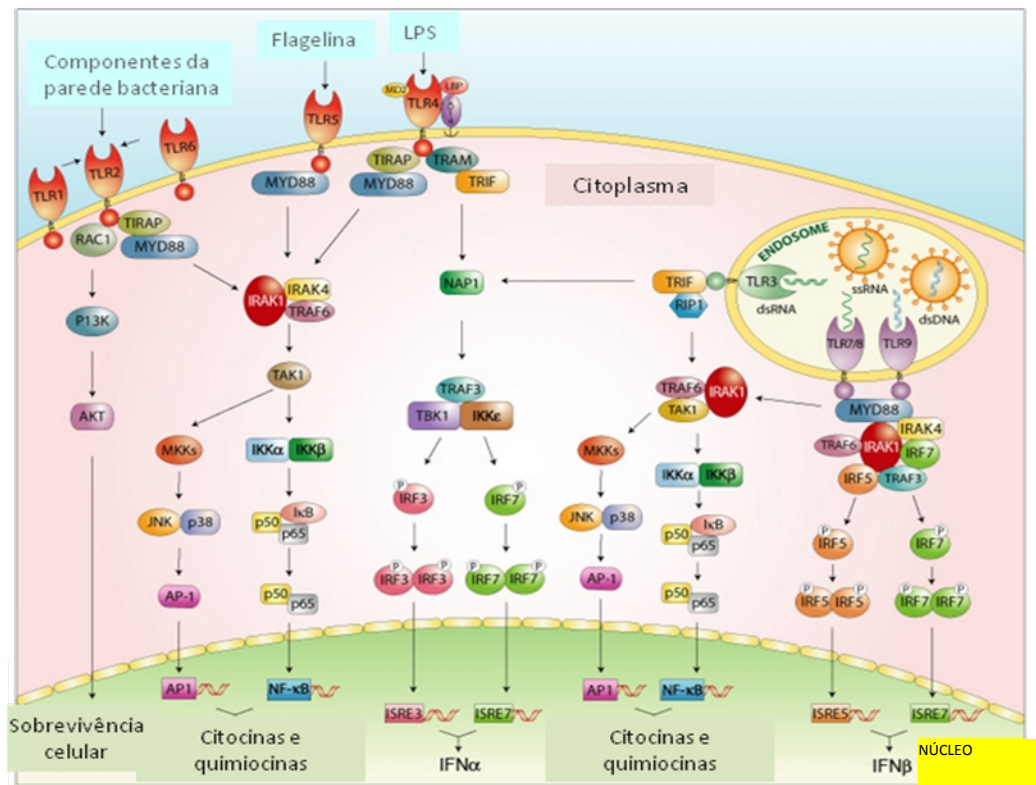


Figura 4.4- Receptores da família toll (TLR) e suas vias de sinalização (West e cols., 2006).

Alguns receptores ainda não foram totalmente caracterizados, como os receptores TLR-10, TLR-12, TLR-13 e TLR-15. O TLR-10 é altamente N-glicosilado e seu gene está localizado num locus que contém TLR-1 e TLR-6. O TLR-11 é expresso apenas em camundongos e reconhece a *E. coli* uropatogênica e a profilina do *Toxoplasma gondii* (Doi e cols., 2009; Hasan e cols., 2005; Lauw e cols., 2005; Mishra e cols., 2008; Zhang e cols., 2004). Posteriormente foi identificado o TLR-15 em estudo desenvolvido por Higgs e cols. (2006), que demonstraram que esse receptor é responsável pelo reconhecimento da bactéria *Salmonella enterica* do sorotipo Typhimurium (*S. Typhimurium*).

Além de identificarem os PAMPs, alguns receptores da família toll podem se ligar a proteínas endógenas (alarminas). O TLR-4 reconhece a fibronectina contendo o domínio-A (Okamura e cols., 2001), fibrinogênio (Smiley e cols., 2001), ácido hialurônico de oligossacarídeos, "heat shock protein"- HSP (Ohashi e cols., 2000; Vabulas e cols., 2001), HMGB-1 (Proteína de alta mobilidade do grupo box 1) (van

Zoelen e cols., 2009), oligossacarídeos (Termeer e cols., 2002), entre outros; enquanto que o TLR-2 reconhece HSP-60 e fatores liberados durante a necrose (Vabulas e cols., 2001). A ligação desses receptores a alarminas propaga ainda mais o processo inflamatório, por induzir maior produção de citocinas e quimiocinas. O HMGB aumenta a síntese de IL-6, TNF- α , MCP-1/CCL2, do complexo trombina-antitrombina e induz um maior recrutamento de neutrófilos via TLR-4 (van Zoelen e cols., 2009). Macrófagos expostos ao fibrinogênio, possuem aumento da expressão de mRNA (RNA mensageiro) de MIP-1 α , MIP-2 e MCP-1/CCL2 (Smiley e cols., 2001).

4.3.2- Citocinas e Quimiocinas liberadas durante a sepse

Durante a sepse, ocorre a liberação de diversas citocinas como a interleucina-1 β (IL-1), interleucina-6 (IL-6), interferon-gama (IFN- γ), fator inibidor da migração de macrófagos (MIF), interleucina-12 (IL-12), interleucina-17 (IL-17), fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α), entre outras. Os mediadores antiinflamatórios liberados durante a sepse são a IL-10 (interleucina 10), IL-4 (interleucina 4), antagonista do receptor de IL-1 (IL-1ra), IL-13, entre outros. Em termos funcionais, a IL-10 possui atividade supressora para macrófagos, inibindo a síntese de mediadores pró-inflamatórios. Já a IL-13 é capaz de inibir a produção de IL-8 (Interleucina 8) por polimorfonucleares estimulados com LPS (Marie e cols., 1996).

A IL-1 e o TNF- α induzem a síntese de outras citocinas, como IL-6 e IL-8 (Lobo e Lobo, 2007). O TNF- α é um dos mediadores responsáveis pela disfunção orgânica e aumento da letalidade durante a sepse (Gaur e Aggarwal, 2003; Gordon e cols., 2004; Leon e cols., 1998). Essa citocina é liberada principalmente por macrófagos e células endoteliais ativadas durante a infecção e possui efeitos sistêmicos (Janeway, 2007; Old, 1985): induzindo a liberação de proteínas de fase aguda por hepatócitos; promovendo a ativação de neutrófilos, macrófagos e células; estimula a produção de citocinas (Gaur e Aggarwal, 2003) e a expressão de ICAM-1, E-selectina e VCAM-1 (envolvidas com a adesão de leucócitos) em células endoteliais via ativação de NF κ B e MAPK (Mackay e cols., 1993); induz o processo de apoptose através da sinalização do receptor TNFR-1 (Micheau e Tschopp, 2003; Wajant e cols., 2003). Durante a fase de imunossupressão associada à sepse o TNF- α possui efeito protetor, uma vez que o tratamento com TNF- α recombinante

aumenta a sobrevivência de animais submetidos ao CLP e co-infectados com *S. typhimurium* ou *Listeria monocytogenes* (Echtenacher e cols., 2003).

A IL-6 é considerada como biomarcador de severidade da sepse, onde seus níveis estavam elevados em cerca de 60 a 100% dos pacientes com sepse (Gogos e cols., 2000; Kox e cols., 2000). O aumento persistente de IL-6 foi associado com a disfunção orgânica múltipla (Pinsky e cols., 1993) e morte (Tanaka e cols., 1996). Essa citocina aumenta a expressão de C5a-R (Receptor do complemento C5a) no fígado, rim, coração e pulmão. O C5a por sua vez, induz a síntese de mediadores pró-inflamatórios e a liberação de espécies reativas do oxigênio, que pode levar a disfunção orgânica (Ramnath e cols., 2008; Riedemann e cols., 2003a; Riedemann e cols., 2003b). Além disso, a IL-6 pode agir em sinergismo com o IL-1 e com o TNF- α , induzindo a síntese de proteínas de fase aguda, particularmente a proteína C reativa e a pró-calcitonina por hepatócitos (Bozza e cols., 2005; Hengst, 2003; Janeway, 2007).

Outra citocina pró-inflamatória liberada durante a sepse é o MIF, capaz de regular positivamente a expressão de TLR-4 e a produção de TNF por macrófagos estimulados com LPS (Roger e cols., 2001a; Roger e cols., 2001b). O MIF é uma proteína pré-formada presente na glândula pituitária, em células T e em macrófagos e foi detectado aumentado no plasma de pacientes com sepse e choque séptico (Bacher e cols., 1996; Bernhagen e cols., 1993; Calandra e cols., 1994). A injeção de MIF recombinante em animais submetidos aos modelos de endotoxemia letal por LPS, aumenta a taxa de mortalidade dos animais (Bacher e cols., 1997) e a neutralização dessa citocina, aumenta a taxa de sobrevivência de animais submetidos aos modelos de endotoxemia letal (Bozza e cols., 1999), CLP e nas infecções por *Escherichia coli* (*E.coli*) (Calandra e cols., 2000) e *Pseudomonas aeruginosa* (Bozza e cols., 1999). Um estudo realizado pelo nosso grupo de pesquisa demonstrou que o MIF pode ser considerado um biomarcador da sepse, uma vez que a partir dos seus níveis foi possível discriminar pacientes sépticos sobreviventes e não sobreviventes. Pacientes sépticos não sobreviventes possuem níveis mais elevados dessa citocina (cerca de 1710 pg/ml) quando comparado aos pacientes sobreviventes (aproximadamente 965 pg/ml) (Bozza e cols., 2004).

O IFN- γ é importante para a montagem da resposta imune inata (Qiu e cols., 2001), ativando mecanismos anti-bactericidas (aumentando a apresentação de antígenos, fagocitose e a liberação de citocinas TH1) (Seki, 2000). Inicialmente os interferons foram designados como moléculas que interferem na replicação viral (Isaacs e Lindenmann, 1957; Isaacs e cols., 1957), liberadas principalmente por células TCD4+, células T CD8+ e células Natural Killer (Bach e cols., 1997; Young, 1996). Atualmente foi descrito que essa citocina também é sintetizada e liberada por células apresentadoras de antígeno (monócitos, macrófagos e células dendríticas), podendo ativar a célula que a produziu ou células vizinhas (Frucht e cols., 2001; Gessani e Belardelli, 1998).

O HMGB 1 é uma proteína citosólica e nuclear com 30kDa liberada principalmente por macrófagos. Tem sido descrita como um marcador tardio da inflamação e sepse (Lobo e Lobo, 2007; Wang e cols., 2004) e está envolvido com o desenvolvimento de falência orgânica múltipla (Ueno e cols., 2009). O HMGB pertence ao grupo dos padrões moleculares associados ao perigo (DAMPs), levando ao aumento da expressão de TLRs, o que amplifica a resposta inflamatória. O HMGB-1 atua também como alarmina, aumentando a síntese de IL-6, TNF- α , MCP-1/CCL2 e induz um maior recrutamento de neutrófilos via TLR-4 (van Zoelen e cols., 2009).

A IL-12 é uma citocina heterodimérica. A IL-12 aumenta a proteção de animais submetidos ao CLP (Moreno e cols., 2006) e de animais infectados com *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) (Hultgren e cols., 2001) ou com *Pseudomonas aeruginosa* (Yamaguchi e cols., 2000), por elevar os níveis de IFN- γ , que aumenta a produção de óxido nítrico e conseqüentemente, favorece uma melhor eliminação bacteriana, que confere maior sobrevivência aos animais (Moreno e cols., 2006; Yamaguchi e cols., 2000).

Dentre as quimiocinas liberadas durante a sepse podemos destacar o MCP-1/CCL2, IL-8/KC, MIP-1 α . As quimiocinas são classificadas de acordo com o posicionamento dos resíduos de cisteína próximas a região aminoterminal em: CC quimiocinas, com resíduos de cisteínas adjacentes; CXC quimiocinas, com um aminoácido entre as cisteínas; as CX3C quimiocinas, com três aminoácidos entre as

cisteínas e C quimiocinas, com apenas uma cisteína (Janeway, 2007; Vermont e cols., 2006).

A IL-8 (ou KC em murinos) promove o recrutamento de neutrófilos para o sítio da infecção, enquanto que o MCP-1/CCL2 e o MIP-1 α atraem monócitos, linfócitos, basófilos, eosinófilos e células Natural Killer (Vermont e cols., 2006). O MCP-1/CCL2, pertence a família das CC quimiocinas e é sintetizado por células endoteliais, fibroblatos, células epiteliais, músculo liso, astrócitos, monócitos e células da micróglia, constitutivamente ou após estímulos, como o estresse oxidativo, citocinas, fatores de crescimento e durante o processo infeccioso. Essa quimiocina exerce sua atividade biológica ao se ligar ao CCR2. Existem dois tipos de CCR2: O CCR2A, expresso por células mononucleares e células da musculatura lisa dos vasos e o CCR2B, expresso por monócitos e células NK - Natural killer (Deshmane e cols., 2009). Um estudo realizado por (Speyer e cols., 2004) demonstrou que polimorfonucleares de camundongos sépticos (CLP) expressam CCR2, o que torna o MCP-1/CCL2 quimiotático também para neutrófilos. O MCP-1/CCL2 pode induzir a quimiotaxia direta ou indiretamente, através da produção de leucotrieno B₄ (Matsukawa e cols., 1999). Em animais sépticos o MCP-1/CCL2 é capaz de modular a resposta inflamatória, relacionada com redução dos níveis de mediadores pró-inflamatórios, como KC e IL-6 (24 horas após o CLP) e de MIF (6 e 24 horas após o CLP), bem como aumento dos níveis de IL-10 (24 horas após o CLP) (Gomes e cols., 2006b; Matsukawa e cols., 1999).

A IL-8 é produzida por macrófagos e células endoteliais e é armazenada nas vesículas weibel-palade (Janeway, 2007; Utgaard e cols., 1998). O recrutamento de neutrófilos é mediado pela quimiocina IL-8 na superfície endotelial ligada ao seu receptor em neutrófilos, que age em cooperação com a E-selectina ligada a porção sialil-lewis sulfatado (glicoproteínas de neutrófilos) e com ICAM-1 ligada ao CD11a/CD18 ou ao CD11b/CD18 (MAC-1) (Baggiolini e Clark-Lewis, 1992; Janeway, 2007; Utgaard e cols., 1998). Recentemente foi atribuído a IL-8 aumento da produção de espécies reativas do oxigênio e do nitrogênio em células endoteliais via ativação de NADPH oxidase, o que pode contribuir para a progressão da sepse severa, uma vez que o NO promove a vasodilatação, aumentando o estado de hipotensão do paciente (Miyoshi e cols., 2010).

4.3.3- Espécies reativas

Macrófagos e neutrófilos ativados durante a sepse produzem uma variedade de moléculas tóxicas, que auxiliam na degradação de patógenos. Podemos destacar o óxido nítrico, o ânion superóxido e o peróxido de hidrogênio. Durante a respiração oxidativa, o superóxido formado a partir da NADPH oxidase é convertido em peróxido de hidrogênio pela superóxido dismutase. A peroxidase converte o peróxido de hidrogênio em radical hidroxila e em íons hipoclorito e hipobromito (Janeway, 2007).

4.3.3.1- Óxido nítrico

O óxido nítrico (NO) é um mediador produzido por uma família de enzimas denominadas óxido nítrico sintases (NOS). Duas enzimas são bem conhecidas, a isoforma constitutiva cálcio-dependente, chamada cNOS e a isoforma induzida cálcio-independente, a óxido nítrico sintase induzível, iNOS (NOS-2) (McCall e cols., 1989), expressa nos leucócitos, eritrócitos, e alguns órgãos como rim (Kan e cols., 2004; Liu e cols., 1993; Mundel e cols., 1992; Tojo e cols., 1994), fígado (Geller e cols., 1990), pâncreas (Kan e cols., 2004) e pulmão (Kan e cols., 2004; Knowles e cols., 1990). As cNOS são subdivididas em: nNOS ou NOS-1, de origem neuronal (Bredt e cols., 1991; Hope e cols., 1991) e eNOS ou NOS-3, de origem endotelial, que foi descrita por Palmer e cols. em 1989) Recentemente, uma terceira isoforma tem sido descrita, a mtNOS, localizada na mitocôndria de diferentes organismos (Ghafourifar e Richter, 1997; Richter e cols., 1997) que é uma variação da nNOS (Elfering e cols., 2002).

A iNOS precisa formar homodímeros para exercer sua atividade biológica, a conversão da L-arginina em L-citrulina e óxido nítrico (Janeway e cols., 2007). Existem diversas moléculas responsáveis pelo aumento da expressão da enzima iNOS, onde podemos destacar os componentes bacterianos (DNA, LPS, ácido lipoteicóico, RNA) e citocinas, como por exemplo o IFN- γ , o IFN- α/β , o TNF- α e a IL-1 β (Korhonen e cols., 2005).

Os dados na literatura sobre o papel do NO são controversos. Alguns autores demonstram que o NO aumenta a síntese de citocinas, o dano tecidual renal e hepático (Eum e cols., 2007; Heemskerk e cols., 2006; Hickey e cols., 2002), leva a disfunção miocárdica e a está relacionado com o aumento da mortalidade durante a

sepsis (Hauser e cols., 2005; Hauser e cols., 2008). De forma contrária, no modelo de infecção pulmonar crônica por *Pseudomonas aeruginosa*, o óxido nítrico tem um papel importante na prevenção do dano pulmonar, bem como na redução de mediadores pró-inflamatórios, como a IL-6 (Hopkins e cols., 2006). Esse mediador é importante também para a proteção de animais durante a sepsis, onde animais geneticamente deficientes para a iNOS submetidos ao CLP possuem uma taxa de mortalidade superior aos animais que expressam a enzima (Cobb e cols., 1999). No modelo do CLP-letal, o NO reduz a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal o que não é observado no CLP sub-letal (Benjamim e cols., 2000). O NO reduz a adesão de leucócitos a parede endotelial, via modulação de CD11/CD18 (Yang e cols., 1997), um efeito divergente ao PAF, que aumenta a expressão dessa $\beta 2$ integrina (Prescott e cols., 2000).

O peroxinitrito que é produto da reação do peróxido de hidrogênio com o NO e pode ter efeitos tanto de oxidação quanto de nitratação. Os efeitos de oxidação irão levar a degradação do DNA, a peroxidação de lipídeos, o que altera a permeabilidade de agentes invasores, que culmina com a morte da bactéria. Entretanto, o processo de nitratação é responsável pela redução de prostaglandina sintase I_2 , inibição da superóxido dismutase (SOD), das cicloxigenases 1 e 2, e da ribonucleotídeo redutase (Korhonen e cols., 2005).

4.3.4- Mediadores lipídicos na sepsis

O ácido araquidônico é formado a partir da clivagem de fosfolipídeos de membrana por enzimas, como as fosfolipases C e A. Após esse processo, o ácido araquidônico pode ser degradado pelas vias: da cicloxigenase (onde são formados leucotrienos e prostaglandinas) e da lipoxigenase, no qual a 15-lipoxigenase catalisa a formação de lipoxinas e, a 5-lipoxigenase, participa da síntese de leucotrienos (Miller, 1983). Neutrófilos produzem principalmente prostaglandina E_2 , enquanto que macrófagos e monócitos liberam leucotrienos (que são quimioatraentes para diversos tipos celulares, como neutrófilos), tromboxano A_2 que induz a agregação plaquetária e a constricção de vasos e brônquios (Rang e cols., 2007). Já o PAF é formado a partir de duas vias, a via de remodelamento, que inicia com a hidrólise do alquil fosfolipídeo (1-O-alkyl-2-araquidonoil-sn-glicero-3-fosfolina para 1-O-alkyl-

sn-glicero-3-fosfocolina) por fosfolipases A2 e a via de novo, onde o PAF é formado pela enzima acetil:CoA: Liso-PAF (Castro Faria Neto e cols., 2005).

4.3.4.1- Fator de ativação plaquetária (PAF)

Dentre os mediadores lipídicos liberados durante a sepse, o PAF (1-o-alkil-2-acetil-sn-glicero-3-fosfocolina) tem um papel central. O PAF é uma molécula pró-inflamatória gerada por leucócitos, células mielóides, plaquetas, mastócitos, e células endoteliais, em resposta aos estímulos inflamatórios (Castro Faria Neto e cols., 2005).

Depois de formado, o PAF, ao se ligar ao seu receptor (PAF-R) induz uma sinalização intracelular via proteína G, que amplifica a resposta inflamatória. Em macrófagos esse fosfolípido induz a atividade pró-coagulante proteino-quinase C (Kucey e cols., 1992). Em neutrófilos pode atuar de forma cooperativa com a P-selectina participando do processo de adesão de neutrófilos às células endoteliais (Lorant e cols., 1995; Zimmerman, 1992), além de induzir a desgranulação de neutrófilos, e a geração de radicais livres do oxigênio (Kuijpers e cols., 2001; Prescott e cols., 2000; Zimmerman, 1992).

Níveis elevados de PAF têm sido encontrados no lavado broncoalveolar de pacientes com síndrome do desconforto respiratório agudo e no plasma de pacientes com sepse (Matsumoto e cols., 1992; Opal e cols., 2004; Sorensen e cols., 1994). A instilação intratraqueal de PAF induziu, de forma dose-dependente: acúmulo de macrófagos no espaço alveolar; degeneração e necrose do epitélio alveolar; acúmulo de neutrófilos e plaquetas no lúmen do capilar alveolar com alterações nas células endoteliais (Camussi e cols., 1983) e, está associado ao aumento da permeabilidade vascular pulmonar (Kroegel, 1988; Nakos e cols., 1998; Opal e cols., 2004; Prescott e cols., 2000). A inibição do PAF durante a bacteremia por *E.coli* preveniu o desenvolvimento da hipertensão e do edema pulmonar (Clavijo e cols., 2000). Foi observado que esse fosfolípido está associado com aumento taxa de mortalidade de animais com pneumonia induzida através da instilação intratraqueal de *Klebsiella pneumoniae*, bem como durante a infecção por *E. coli* (Makrithatis e cols., 1993).

Diversas estratégias terapêuticas estão sendo desenvolvidas na tentativa de reduzir os efeitos deletérios decorrentes do aumento dos níveis de PAF, onde podemos ressaltar a utilização de antagonistas do receptor do PAF, que competem pelo sítio de ligação do PAF, assim como pela administração da enzima responsável por sua degradação, a PAF-AH. Entretanto, os resultados obtidos utilizando antagonistas do receptor PAF não foram muito significativos. Por isso, novos ensaios têm sido realizados utilizando a PAF-acetilhidrolase recombinante (Gomes e cols., 2006a).

4.3.4.2- PAF-acetilhidrolase (PAF-AH)

A PAF-AH pertence ao grupo das fosfolipases A2 cálcio independentes, com atividades acetilhidrolase e transacetilase (Lio e Dennis, 1998), responsável pela hidrólise do éster acetil na posição Sn-2 do PAF. Atualmente são descritas duas isoformas dessa enzima, intracelular (Ib e II) e plasmática (Karasawa, 2006).

A forma intracelular Ib, expressa principalmente no cérebro bovino, possui subunidades: alfa 1/2 (45kDa) com atividade catalítica (Ho e cols., 1997) e beta (30kDa), semelhante a proteína humana lisencefália-1 (LIS-1), que atua no controle do processo de formação do córtex. Já a PAF-AH II apresenta peso molecular de 40 kDa e é encontrada principalmente no rim e fígado (Arai e cols., 2002; Samanta e Bahnson, 2008).

A PAF-AH plasmática (pPAF-AH) é um polipeptídeo monomérico de 45kDa extensamente N-glicosilado (nos aminoácidos Asn-423 e Asn 433), composto por 441 resíduos de aminoácidos e possui a seqüência Gly-Xaa-Ser-Xaa-Gly (GX SXG), geralmente encontrada em lípases e esterases (Samanta e Bahnson, 2008). A enzima encontra-se associada com as lipoproteínas de alta e de baixa densidade (LDL e HDL), o que modula a sua atividade. Geralmente associação com o LDL facilita a degradação de fosfolípidos pró-inflamatórios produzidos durante o estresse oxidativo em partículas de LDL (Castro Faria Neto e cols., 2005). Já o HDL funcionaria como reservatório de pPAF-AH, que pode ser utilizada em situações onde há excesso de PAF ou de fosfolípidos "PAF-like". A enzima é expressa por diversos tipos celulares, desde células hematopoiéticas a hepatócitos. Macrófagos e mastócitos sintetizam pPAF-AH em resposta a um estímulo inflamatório, como por

exemplo ao LPS, após a ativação do receptor do PAF e durante a diferenciação de monócitos para macrófagos (Karasawa, 2006).

Cada subtipo da enzima possui afinidade a um determinado grupo de fosfolipídeos “PAF-like”. A PAF-AH Ib tem grande afinidade a fosfoglicerídeos com grupo acetil na posição sn-2, enquanto que a PAF-AH II e a pPAF-AH, são mais específicas para análogos de PAF contendo propionil e butiroil na posição sn-2. Existem enzimas do soro que também são capazes de hidrolisar o PAF, como por exemplo, a lecitina:colesterol acetiltransferase e a paraoxonase I. Isso é importante, pois elas podem compensar parcialmente as alterações que podem ocorrer na atividade das PAF-AHs, tanto em decorrência de mutações quanto pela inativação por inibidores de serino-proteases, como o Diisopropil fluorofosfatos (DFP) (Castro Faria Neto e cols., 2005; Karasawa, 2006).

A atividade da enzima pPAF-AH encontra-se alterada na asma (Henderson e cols., 2000; Henig e cols., 2000), na sepse (Gomes e cols., 2006a), no lúpus eritematoso sistêmico (Cederholm e cols., 2004), na artrite reumatóide juvenil (Tselepis e cols., 1999), na doença de Crohn (Oshimoto e cols., 2005), em distúrbios envolvendo o sistema nervoso (onde sua atividade encontra-se reduzida) (Seet e cols., 2010), e em doenças cardiovasculares (Karasawa, 2006). Alguns estudos sugerem que a pPAF-AH pode ser inibida por inibidores de serino proteases, como o Diisopropil fluorofosfatos, indicando que sua atividade hidrolase é serino-dependente.

O PAF tem um papel importante na fisiopatologia da asma, onde a expressão desse fosfolipídeo encontra-se aumentada no pulmão de pacientes asmáticos. Além disto, a instilação intra-traqueal desse fosfolipídeo, induziu a broncoconstricção, o aumento da secreção de muco e aumento da permeabilidade, que são características observadas na asma (Henderson e cols., 2000). Então, estratégias para bloquear a ação biológica desse fosfolipídeo têm sido utilizadas. Henderson e cols. (2000) demonstraram, que animais submetidos ao modelo de indução de asma e tratados com a enzima PAF-AH recombinante (rPAF-AH), possuem redução da resposta inflamatória, caracterizada por diminuição da migração de células, da secreção de muco e da hiperreatividade brônquica. Entretanto, num estudo de fase

Ila com indivíduos asmáticos tratados com a enzima na dose de 1 mg/kg, esse efeito protetor não foi observado (Henig e cols., 2000).

Foram detectados níveis elevados de PAF no lavado broncoalveolar de pacientes com Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo (SDRA), associados tanto com mutações do gene da enzima PAF-AH (Arg92His, Ile198Thr, e Ala379Val), quanto com a redução da sua atividade enzimática e com a taxa de mortalidade. A SDRA possui uma alta taxa de mortalidade e é caracterizada pela presença de infiltrados pulmonares bilaterais, hipoxemia refratária, relação PaO₂/FiO₂ inferior a 200, edema pulmonar não cardiogênico. Como fatores etiológicos, podemos destacar as causas pulmonares (como aspiração, inalação, infecção pulmonar) e os eventos extrapulmonares (como a sepse e trauma) (Li e cols., 2009).

4.3.4.3- A PAF-AH na sepse

Gomes e cols. (2006a) demonstraram que a atividade de PAF-AH reduz de forma tempo dependente em animais submetidos ao modelo de meningococemia (pela injeção da bactéria *N. meningitidis*) e de endotoxemia letal, através da injeção intraperitoneal de LPS e no CLP. A diminuição dos níveis de PAF-AH está relacionada diretamente com o aumento da incidência da falência múltipla dos órgãos e a morte (Schuster e cols., 2003).

Em 1995, a PAF-AH foi clonada e, a partir daí, diversos estudos foram desenvolvidos para analisar seu papel terapêutico (Tjoelker e cols., 1995). Em animais submetidos a modelos experimentais de sepse, o tratamento com a PAF-AH promoveu um balanço da resposta inflamatória e conseqüentemente, um aumento na taxa de sobrevida (Gomes e cols., 2006a). Entretanto antes da realização dos ensaios pré-clínicos, foi publicado um estudo clínico de fase II, envolvendo pacientes com pneumonia, demonstrando que o tratamento com a PAF-AH, na dose de 1mg/Kg, foi associado com o aumento da sobrevida e com a redução da incidência de Síndrome do desconforto Respiratório Agudo (Schuster e cols., 2003). Já um estudo de fase III, que compreendeu um largo espectro de pacientes, com sepse de diversas origens, o efeito protetor da PAF-AH não foi observado (Opal e cols., 2004).

Como houve uma divergência de resultados nos estudos de fase IIb e III, nosso grupo resolveu investigar os mecanismos de ação da rPAF-AH. Inicialmente foi caracterizado o efeito protetor dessa enzima em animais submetidos ao CLP, onde a rPAF-AH possui um papel importante na modulação da resposta inflamatória e confere uma maior sobrevivência desses animais. Como essa enzima aumenta a sobrevivência desses animais, resolvemos investigar o efeito do tratamento com a rPAF-AH sobre a eliminação bacteriana. Os modelos de escolha foram o CLP (ligadura e perfuração cecal) e a injeção intraperitoneal da bactéria *S. Typhimurium*, bem como analisamos o efeito do tratamento com a rPAF-AH em culturas de macrófagos peritoneais estimulados com a bactéria *Escherichia coli*. Em seguida, resolvemos caracterizar os mecanismos envolvidos com essa melhor eliminação bacteriana. Inicialmente averiguamos se a enzima possuía efeito sobre a parede bacteriana. Posteriormente, identificamos a participação de mediadores, como o MCP-1/CCL-2, IFN- γ e o óxido nítrico na degradação de bactérias e as possíveis vias de sinalização envolvidas.

5. OBJETIVOS

5.1 - OBJETIVO GERAL

O presente estudo tem como objetivo investigar o efeito do tratamento com a enzima rPAF-AH sobre a eliminação de bactérias, analisando a participação de mediadores como o óxido nítrico, IFN- γ e MCP-1/CCL2.

5.2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar o efeito do tratamento com a rPAF-AH sobre a eliminação bacteriana, através dos modelos de peritonite polimicrobiana (CLP) e injeção intraperitoneal de bactéria *S. Typhimurium*;
- Verificar se a enzima rPAF-AH favorece melhor eliminação bacteriana por macrófagos peritoneais estimulados com a bactéria *E. coli*;
- Analisar se a enzima rPAF-AH possui efeito direto, na ausência de células, sobre o crescimento de bactérias gram negativas, como a *S. Typhimurium* e *E. coli*, e da bactéria gram positiva *S. aureus*;
- Caracterizar os mecanismos e os mediadores envolvidos com a eliminação bacteriana mediada pelo tratamento com a enzima rPAF-AH, analisando a participação do MCP-1/CCL2, óxido nítrico e do IFN- γ .

6. MATERIAIS E MÉTODOS

Animais

Foram utilizados nesse estudo Camundongos Swiss e C57Bl6 machos, bem como animais geneticamente deficientes para o receptor do MCP-1/CCL-2 (CCR2^{-/-}) e animais geneticamente deficientes para a enzima iNOS (iNOS^{-/-}), provenientes da Fundação Oswaldo Cruz, pesando de 20 a 25 gramas.

Ligadura e perfuração cecal (CLP)

Camundongos foram anestesiados com ketamina (80 mg / Kg) e tiopental (40 mg / Kg) diluídos em salina estéril, administrados por via intraperitoneal. Posteriormente, foi realizada a abertura da cavidade abdominal até a exposição do ceco. Em seguida, o ceco foi ligado na região abaixo da válvula íleo-cecal e perfurado 1 vez, com uma agulha de 18 gauge. Após esse procedimento, o ceco foi reposicionado na cavidade abdominal e, o peritônio e a pele suturados em planos com linha de sutura de nylon de 3-0. Em seguida, realizamos reposição volêmica de 0,5 ml de salina estéril. Os animais controle (conhecidos também como falso operados ou “sham”) são submetidos a um procedimento similar, porém não é realizada a perfuração e ligadura cecal. Após o CLP, os camundongos foram tratados com uma dose intraperitoneal de rPAF-AH (1 mg / Kg) 15 minutos após CLP. A taxa de sobrevivência foi analisada por 144 horas. Entretanto, alguns animais foram sacrificados em tempos determinados para a coleta do lavado peritoneal e do sangue por punção cardíaca, para a contagem total e diferencial de células inflamatórias, análises da proliferação bacteriana (contagem das unidades formadoras de colônias –UFC), dosagem de mediadores (óxido nítrico, quimiocinas e citocinas).

Desafio com a bactéria *Salmonella* Typhimurim

A bactéria *Salmonella entérica* sorotipo Typhimurium (*S. Typhimurium*) (5×10^5 bactérias - IOC 5302/04) foi injetada por via intraperitoneal e 15 minutos depois os animais foram tratados com a rPAF-AH (1 mg / kg, i.p). Após 6 horas, os animais foram sacrificados, o lavado peritoneal recolhido para contagem do número de unidades formadoras de colônia (UFC).

Tratamento

Os animais submetidos ao CLP ou a injeção intra-peritoneal da bactéria *S. Typhimurium* foram tratados com rPAF-AH por via intraperitoneal (ICOS corporation) 15 minutos após o CLP ou ao desafio com a *S. Typhimurium* na dose de 1 mg / Kg, L-NAME por via intraperitoneal (SIGMA) na dose 10 mg / kg 2 horas após o CLP, PAF (SIGMA) por via intraperitoneal na dose de 20 ug / kg 15 min após o CLP, SR27417 (SIGMA) por via intraperitoneal na dose de 1 mg / Kg, anti-MCP-1/CCL2 (PeProtech) na dose de 10 ng / kg.

Análise do número de unidades formadoras de colônia (UFC)

O sangue, lavado peritoneal ou o sobrenadante das culturas de células foram semeados em placas contendo TSA. As placas foram colocadas na estufa a 37°C e 24 horas após as UFCs foram contadas.

Cultura de macrófagos peritoneais

Os animais Swiss, C57Bl6, CCR2^{-/-}, iNOS^{-/-} receberam uma dose intraperitoneal de 3ml tioglicolato a 3% (SIGMA). Três dias após foram sacrificados, o lavado peritoneal recolhido e os macrófagos peritoneais foram plaqueados (1X10⁶ células por poço) em placas de 24 poços. A placa foi colocada por 2 horas na estufa de CO₂ a 37°C para a adesão de macrófagos na superfície da placa. Todas as células não aderentes foram removidas através de 3 lavagens com PBS. Os macrófagos foram tratados com rPAF-AH (20 ug / ml), MCP-1/CCL2 recombinante (100 ng / ml, da Peprotech), PAF(500 ng / ml), LPS de *E. coli* 0111:B4 (300 ug / ml, da Sigma), anticorpo anti-MCP-1/CCL2 (10 ng / ml) e uma hora após, estimulados com as bactérias *S. Typhimurium* (IOC 5302/04) ou *Escherichia coli* (*E.coli*) (10⁵ bactérias / ml) por meia hora. Em seguida, o sobrenadante da cultura foi recolhido para a contagem do número de UFC e dosagem dos níveis de nitrito.

Cultura de neutrófilos peritoneais

Os animais receberam injeção de 3ml de tioglicolato a 3% (Sigma Aldrich) por via intraperitoneal. Dois dias após foram sacrificados, tiveram suas cavidades peritoneais lavadas com PBS 1X estéril. Os neutrófilos foram separados através do gradiente de Percoll (GE Healthcare). Foram plaqueados 10⁶ neutrófilos por poço,

em placa de 24 poços, e em seguida estimulados com a bactéria *E.coli* (10^5 bact. / ml) por meia hora. O sobrenadante foi recolhido para a contagem de UFC.

Efeito direto sobre a eliminação bacteriana

As bactérias *E. coli*, *S. Typhimurium* ou *S. aureus*, foram colocadas em contato direto com a enzima rPAF-AH (20 ug / ml) (ICOS corporation), PAF(500 ng / ml) (SIGMA) ou Liso-PAF (485 ug / ml) (CAYMAN), suspensa em meio de crescimento bacteriano, o LB(Luria Broth da BD– Tryptone, Yeast extract, Sodium Chloride), e duas horas após a solução foi alíquotada em placas contendo TSA, para a contagem do número de UFC.

Dosagem dos níveis de Nitrito

O nitrito é um dos produtos do óxido nítrico. Os níveis de nitrito, no lavado peritoneal dos animais ou no sobrenadante das culturas de neutrófilos e macrófagos, foram determinados a partir do ensaio de Griess utilizando o kit da SIGMA, que é baseado na reação química da Sulfanilamida e Dihidrocloreto de N-1-naptilenodiamina (NED) em condições ácidas (ácido fosfórico).

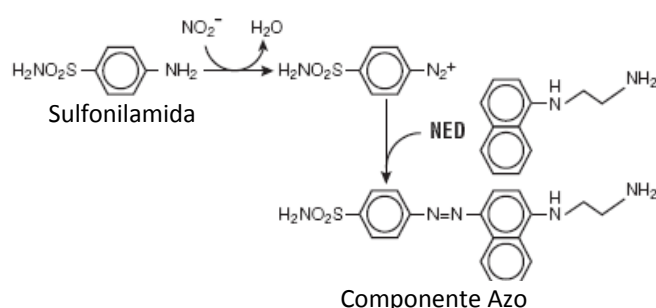


Figura 6.1. Reação química da Sulfanilamida e Dihidrocloreto de N-1-naptilenodiamina (NED) em condições ácidas (ácido fosfórico).

Dosagem dos níveis de INF- γ

Os níveis de IFN- γ presentes no lavado peritoneal dos animais foram quantificados utilizando o kit de ELISA sanduíche da R&D systems.

Foi aplicado 50ul do anticorpo de captura do IFN- γ por poço em placa de 96 poços, responsável pelo reconhecimento da citocina e 24 horas após, os poços foram lavados com PBS tween a 0,05%, para remoção dos anticorpos não aderentes à superfície da placa. Esse procedimento foi seguido do bloqueio com

PBS com 2% Soro de Albumina Bovina (BSA) por cerca de uma hora. O bloqueio foi realizado para evitar que ocorram ligações inespecíficas. Após o bloqueio a placa foi lavada novamente por três vezes com PBS tween a 0,05% e então foram aplicadas as amostras a serem analisadas e o anticorpo recombinante do IFN- γ , diluído de forma seriada em cada poço da placa de 96 poços. No dia seguinte, a placa foi lavada por quatro vezes com PBS tween a 0,05% e, posteriormente, foi aliqotado o anticorpo de detecção biotilado do IFN- γ (BD pharmingen). Após 1 hora a placa foi lavada seis vezes com PBS tween a 0,05%, e aplicamos a estreptavidina conjugada a peroxidase, que se liga a biotina. Meia hora após a placa foi lavada 8 vezes com PBS tween a 0,05%, e foi adicionada a solução de TMB (3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina da sigma), que é o substrato da peroxidase. Em seguida, nós utilizamos uma solução de parada com ácido sulfúrico a 12 N, que foi lida no comprimento de onda de 450 nm em leitora de microplacas e os dados foram analisados utilizando o programa Softmax Pro 5.

Análise estatística

Os resultados foram representados como média e erro padrão da média (EPM) e avaliados estatisticamente através do teste T-Student para comparação entre dois grupos, considerando significativos os valores de $P \leq 0,05$.

7. RESULTADOS

7.1 - Aumento da eliminação bacteriana de animais submetidos ao CLP ou ao modelo de injeção intraperitoneal da bactéria *S. Typhimurium* após o tratamento com a rPAF-AH

A PAF-AH é responsável pela hidrólise e consequente inativação do PAF, levando a formação do liso-PAF. Gomes e cols. (2006a), demonstraram que o tratamento com a rPAF-AH aumenta a sobrevivência de animais submetidos ao CLP ou ao modelo endotoxemia letal.

Para avaliar se o tratamento com a rPAF-AH interfere na eliminação bacteriana, animais submetidos ao CLP e tratados com a rPAF-AH (15 minutos depois) tiveram suas cavidades peritoneais lavadas após 6 horas. O lavado peritoneal foi recolhido e alíquotas deste lavado foram plaqueadas em placas contendo meio de cultura para crescimento bacteriano (TSA) e 24 horas após o plaqueamento, o número de unidades formadoras de colônia (UFC) foi contado. Como podemos observar na **figura 7.1**, o tratamento com a rPAF-AH diminuiu o número de UFC no lavado peritoneal dos animais submetidos ao CLP.

Com a finalidade de investigar o número de UFC, no sangue de animais tratados com a rPAF-AH, 24 horas após o CLP foi feita punção cardíaca nesses animais e o plasma foi plaqueado para determinação do número de UFC. **Na figura 7.2**, observamos uma redução no número de UFC no grupo tratado com a rPAF-AH quando comparamos com o grupo controle. Esses resultados sugerem que a rPAF-AH, aumenta a eliminação bacteriana tanto no foco da infecção quanto no sangue de animais submetidos ao CLP.

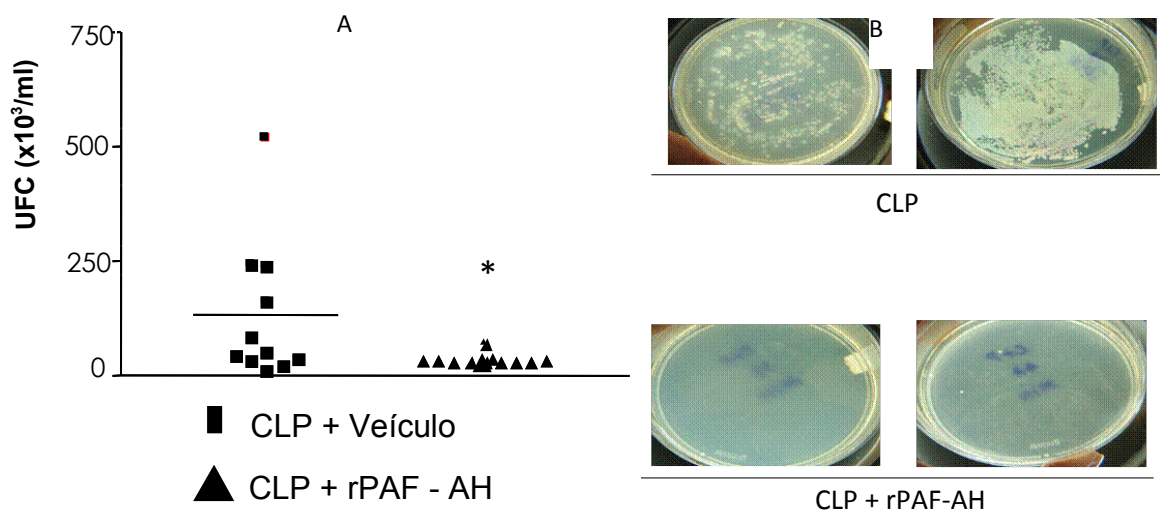


Figura 7.1- A rPAF-AH aumenta a eliminação bacteriana na cavidade peritoneal de animais 6 horas após o CLP. Os grupos experimentais consistem de 13 animais, sendo representado um experimento de três realizados com resultados similares. O gráfico representa o número de unidades formadoras de colônia (UFC) na cavidade peritoneal de animais submetidos ao CLP, tratados ou não com a rPAF-AH (1 mg / kg, i.p). A análise foi feita 6 horas após o CLP. A linha horizontal representa a média do grupo analisado (A). Figura ilustrativa do gráfico exposto (B). O asterisco (*) representa diferença estatisticamente significativa quando comparamos o grupo CLP+rPAF-AH ao grupo CLP + Veículo, com um $P \leq 0,05$ (teste T-Student).

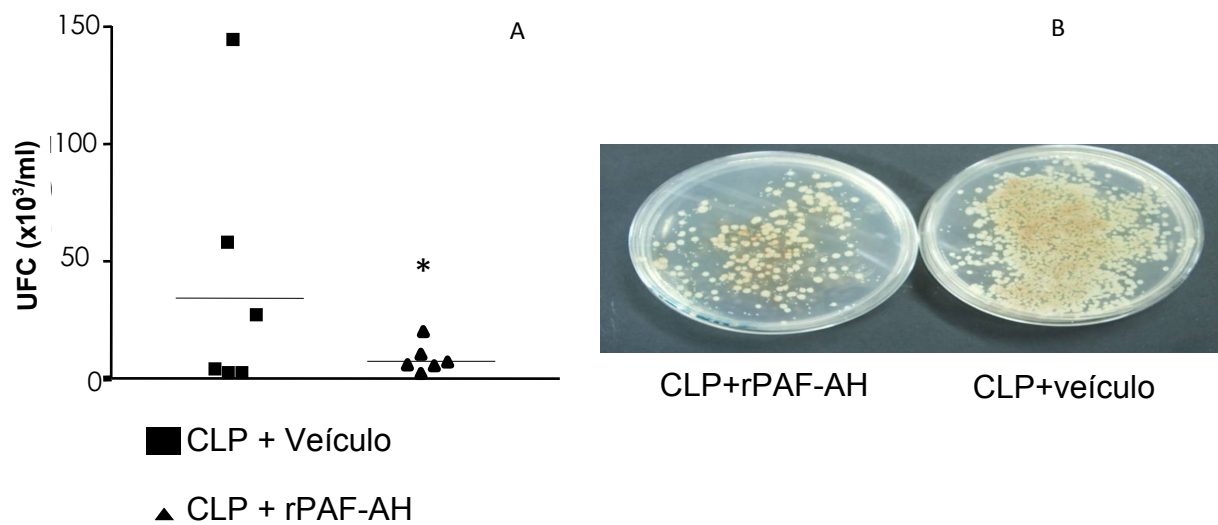


Figura 7.2- A rPAF-AH aumenta a eliminação bacteriana no sangue de animais 24 horas após o CLP. Os grupos experimentais consistem de 10 animais, sendo representado um experimento de três realizados com resultados similares. O gráfico representa o número de unidades formadoras de colônia (UFC) no plasma de animais submetidos ao CLP, tratados ou não com a rPAF-AH (1 mg / kg, i.p). A análise foi feita 24 horas após o CLP. A linha horizontal representa a média do grupo analisado (A). O asterisco (*) representa diferença estatisticamente significativa quando comparamos o grupo CLP+rPAF-AH ao grupo CLP + Veículo, com um $P \leq 0,05$ (teste T-Student). Figura ilustrativa do gráfico exposto (B).

Como o CLP é um modelo de sepse polimicrobiana, decidimos investigar o efeito do tratamento com a rPAF-AH na eliminação bacteriana no modelo de injeção de bactérias gram-negativas vivas, onde a bactéria de escolha foi a *S. Typhimurium*. Os animais foram estimulados intraperitonealmente com a bactéria *S. Typhimurium* (5×10^5 bactérias / cav.) e tratados com a rPAF-AH (15 minutos depois). Após 6 horas, os animais tiveram suas cavidades peritoneais lavadas, o lavado peritoneal recolhido e alíquotas deste lavado foram plaqueadas em placas contendo TSA para contagem de UFC. Como podemos observar na **figura 7.3**, o tratamento com a rPAF-AH diminuiu o número UFC no lavado peritoneal dos animais estimulados com *S. Typhimurium*. Esse resultado sugere que a rPAF-AH favorece melhor eliminação de bactérias tanto na sepse polimicrobiana causada pelo prodecimento do CLP, quanto durante a infecção por apenas um tipo de bactéria, como a *S. Typhimurium*.

7.2- O aumento da eliminação de bactérias é decorrente da inativação da via de sinalização PAF

Para analisar se a melhor eliminação bacteriana era dependente da inativação do PAF, fizemos um pré-tratamento com SR27417 (1 mg / Kg), que é antagonista do receptor do PAF. Uma hora após submetemos os animais ao CLP. Seis horas após os animais tiveram suas cavidades peritoneais lavadas e realizamos a contagem de UFC na cavidade peritoneal desses animais. O grupo de animais pré-tratados com o SR27417 apresentou redução do número de UFC (**Figura 7.4**). Esse resultado sugere que a inibição da via de sinalização do PAF pelo antagonista do receptor do PAF, favorece melhor eliminação de bactérias.

7.3- Aumento da eliminação bacteriana em macrófagos peritoneais tratados com a rPAF-AH e estimulados com a bactéria *Escherichia coli*

Analisamos também o efeito do tratamento com a rPAF-AH na eliminação bacteriana de macrófagos peritoneais estimulados com *E.coli*. Macrófagos peritoneais foram pré-tratados com a rPAF-AH (20 ug / ml) por 1 hora e em seguida estimulados com a bactéria *E. coli* por 30 minutos. Posteriormente, o sobrenadante da cultura foi alíquotado em placas contendo TSA, para a contagem de UFC. Como podemos observar na **figura 7.5**, o tratamento com a rPAF-AH reduz o número de UFC. Esse resultado sugere que a rPAF-AH aumenta a eliminação bacteriana de macrófagos peritoneais estimulados com a *E. coli*.

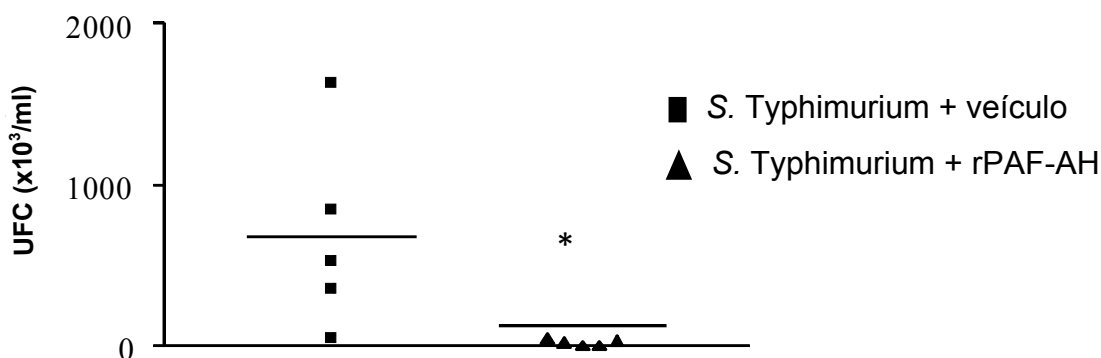


Figura 7.3- A rPAF-AH aumenta a eliminação bacteriana na cavidade peritoneal de animais estimulados com *S. Typhimurium*. Os animais foram estimulados com a bactéria *S. Typhimurium* (5×10^5 bactérias / cav.) e 15 minutos depois tratados com a rPAF-AH (1 mg / kg, i.p). Após 6 horas, os animais foram sacrificados, e o lavado peritoneal foi recolhido para contagem do número de unidades formadoras de colônia (UFC). Os grupos experimentais consistem de 6 animais, sendo representado um experimento de dois realizados com resultados similares. O asterisco (*) representa diferença estatisticamente significativa quando comparamos o grupo *S. Typhimurium*+rPAF-AH com o grupo *S. Typhimurium*+veículo, com um $P \leq 0,05$ (teste T-Student).

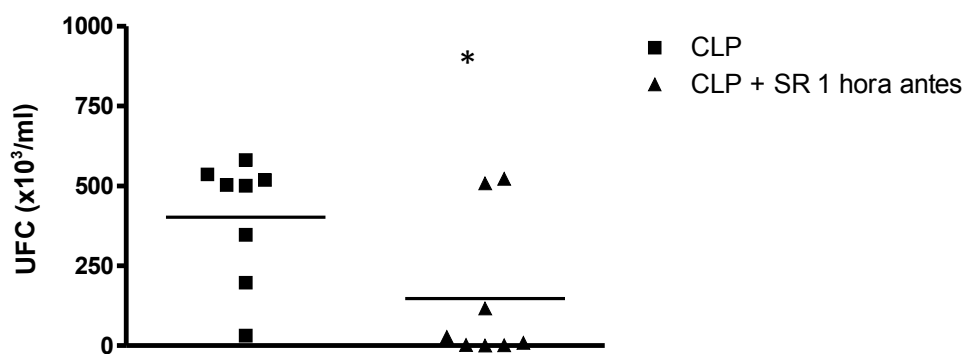


Figura 7.4- A inibição da via de sinalização do PAF favorece melhor eliminação de bactérias. Animais pré-tratados com SR27417 (1 mg / Kg) e submetidos ao CLP tiveram suas cavidades peritoniais lavadas. A solução foi aliquotada em placas de TSA para a contagem do UFC. O gráfico representa três experimentos diferentes, e as linhas horizontais representam a média da contagem de UFC. O asterisco (*) representa diferença estatisticamente significativa entre o grupo CLP+SR, quando comparado com o grupo de animais não tratados e submetidos ao CLP, com um $P \leq 0,05$ (teste T-Student).

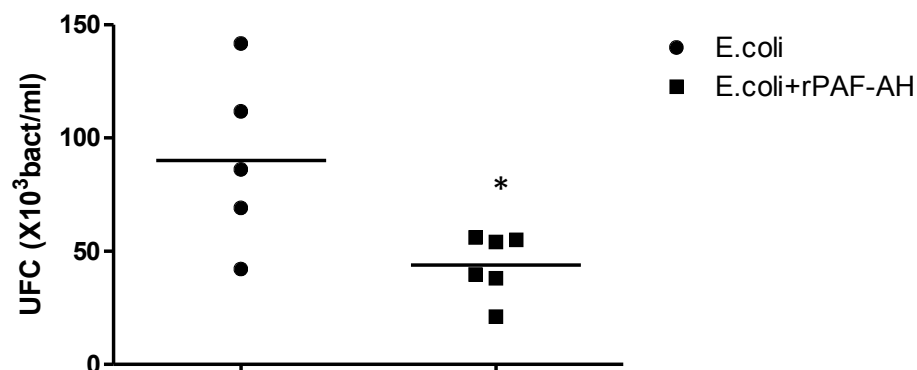


Figura 7.5- A rPAF-AH favorece uma melhor eliminação de bactérias por macrófagos peritoneais estimulados com a bactéria *E. coli*. Os macrófagos foram pré-tratados com a rPAF-AH (20 ug/ml) e 1 hora após estimulados com a bactéria *E. coli*. Meia hora após, o sobrenadante foi alíquotado com placas contendo TSA para contagem do número de unidades formadoras de colônia (UFC). Os grupos experimentais consistem de 6 animais, sendo representado um experimento de dois realizados com resultados similares. O asterisco (*) representa diferença estatisticamente significativa quando comparamos o grupo *E.coli* +rPAF-AH com o grupo *E.coli*, com um $P \leq 0,05$ (teste T-Student).

7.4- Efeito direto da rPAF-AH sobre o crescimento bacteriano

Para investigar se a melhor eliminação bacteriana era um mecanismo dependente da ação direta da rPAF-AH sobre o crescimento bacteriano, resolvemos colocar as bactérias *E.coli*, *S.Typhimurium* e *S. aureus* em contato direto com a enzima, em meio LB e na ausência de células. Os resultados demonstram que a enzima não possui efeito direto sobre o crescimento de bactérias gram positivas, quanto gram negativas, uma vez que as bactérias (*E. coli*, *S. Typhimurium* e *S. aureus*) em contato com a rPAF-AH possuem o mesmo número de UFC que o grupo de bactérias não estimulado com a enzima (**Figura 7.6**).

7.5- Efeito direto do PAF e do liso-PAF sobre o crescimento bacteriano

Durante a reação de hidrólise da PAF-AH sobre a cadeia do glicerol do PAF, ocorre liberação da forma biologicamente inativa, o liso-PAF. Por isso, investigamos o efeito da ação direta do PAF ou liso-PAF sobre o crescimento bacteriano. Como podemos observar na **figura 7.7**, não houve diferença na contagem de UFC após incubação da *S. Typhimurium* com PAF ou liso-PAF, o que sugere que tanto o PAF quanto o liso-PAF influenciam de forma direta o crescimento bacteriano.

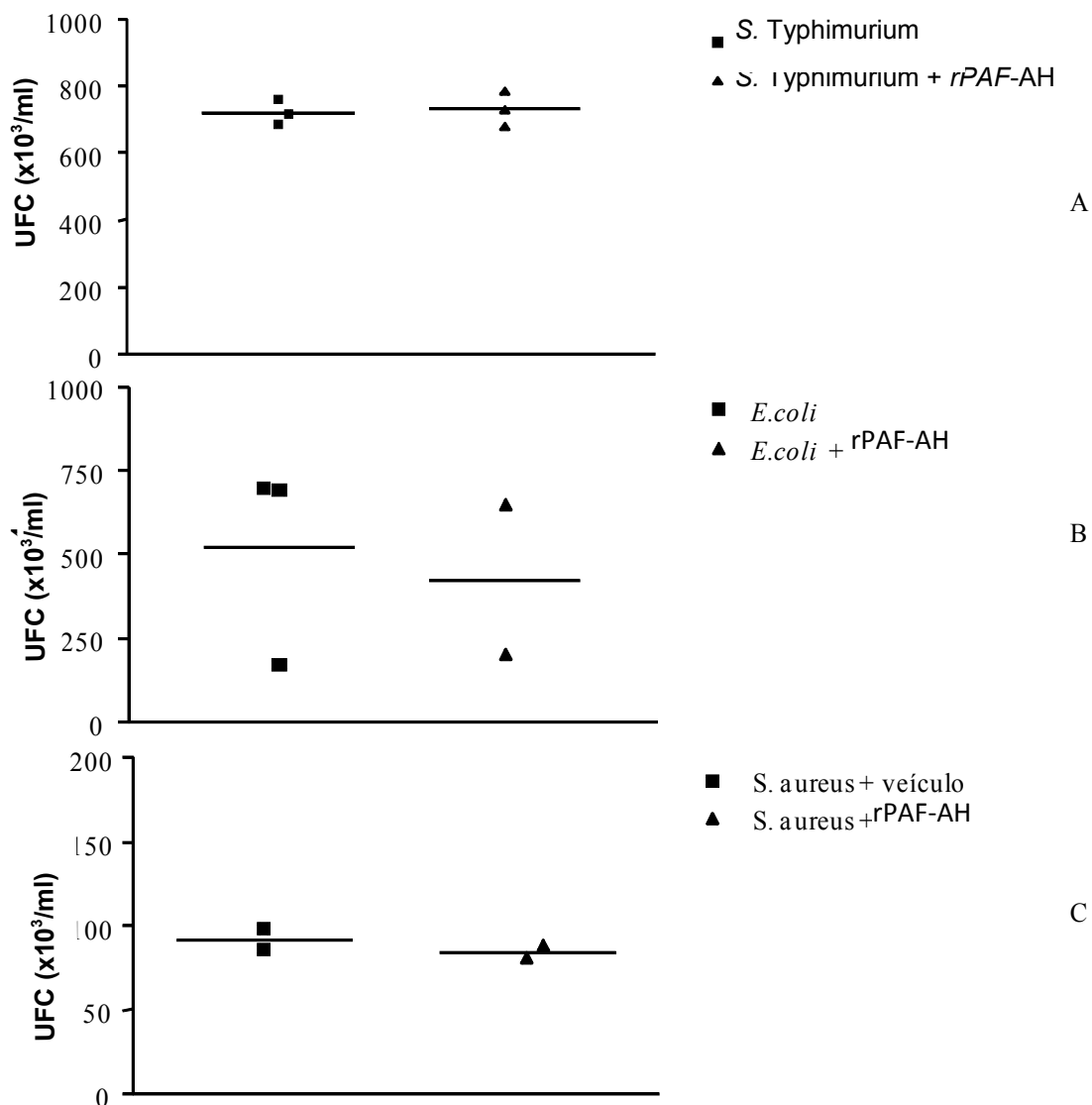


Figura 7.6- A rPAF-AH não influencia de forma direta o crescimento das bactérias gram negativas *S. Typhimurium* e *E. coli* e da bactéria gram positiva *S. aureus*. Triplicatas das soluções contendo bactérias foram colocadas em contato direto com a enzima, suspensas em meio de crescimento bacteriano (Luria Broth-LB) e duas horas após as soluções foram aliqüotadas em placas contendo TSA, para a contagem de UFC. (A) representa a solução de 10^5 *S. Typhimurium* / ml, com e sem rPAF-AH (20 ug / ml). (B) representa a solução de 10^5 *Escherichia coli* / ml, com e sem rPAF-AH (20 ug / ml). (C) representa a solução de 10^5 *S. aureus* / ml, com e sem rPAF-AH (20 ug / ml). Os gráficos representam três experimentos diferentes, e as linhas horizontais representam a média da contagem de UFC.

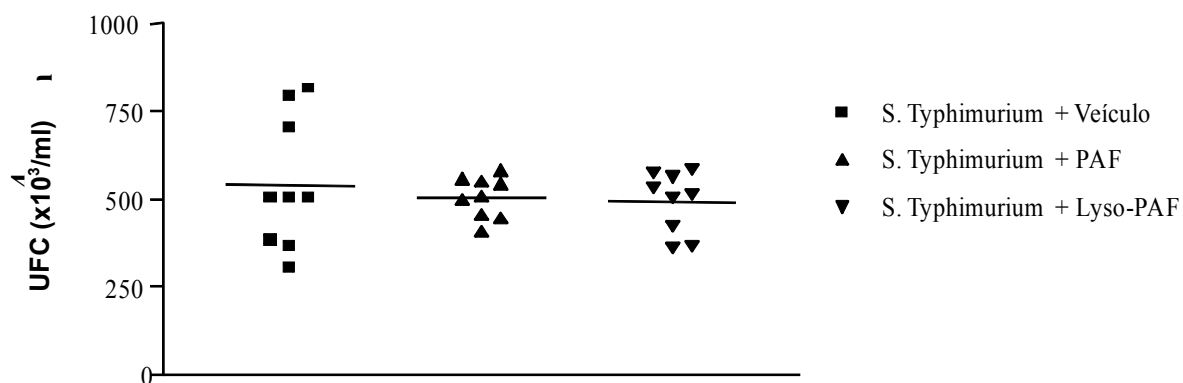


Figura 7.7- O PAF e o liso-PAF não possuem efeito direto sobre o crescimento bacteriano. Triplicatas das soluções contendo 10^5 bactérias *S.Typhimurim* foram colocadas em contato direto com o PAF (500ng/ml) ou liso-PAF (485ug/ml), suspensas em meio de crescimento bacteriano (LB) e duas horas após as soluções foram aliqüotadas em placas contendo TSA, para a contagem de UFC. O gráfico representa três experimentos diferentes, e as linhas horizontais representam a média da contagem de UFC.

7.6- O MCP-1/CCL2 tem um papel importante na melhor eliminação de bactérias conferida aos animais tratados com a rPAF-AH

Nosso grupo demonstrou que o tratamento com a rPAF-AH aumentou os níveis da quimiocina MCP-1/CCL2 (Gomes e cols., 2006a). Em outro estudo nosso grupo mostrou que a quimiocina MCP-1/CCL2 tem um papel protetor na sepse, aumentando a sobrevivência dos animais e favorecendo um balanço dos níveis de citocinas pró e antiinflamatórias (Gomes e cols., 2006a; Gomes e cols., 2006b). Uma vez que o MCP-1/CCL2 aumenta a sobrevivência dos animais submetidos ao CLP, resolvemos analisar a participação do MCP-1/CCL2 na melhor eliminação de bactérias. Para isso, animais foram pré-tratados com anticorpo anti-MCP-1/CCL2 (10 ug / ml) e 1 hora após submetidos ao CLP e podemos observar aumento do número de UFC quando comparamos ao grupo de animais não tratados (**Figura 7.8**). Uma vez que a ação biológica do MCP-1/CCL2 é importante para o processo de eliminação bacteriana, resolvemos verificar se o tratamento com o MCP-1/CCL2 recombinante (rMCP-1/CCL2) aumentaria a eliminação bacteriana por macrófagos peritoneais. Fizemos uma cultura de macrófagos peritoneais tratados com anticorpo anti-MCP-1/CCL2 (10 ug / ml) (**Figura 7.9**) ou com rMCP-1/CCL2 (100 ng / ml) (**Figura 7.10**) ou e uma hora após estimulados com a bactéria *E.coli*. O sobrenadante da cultura foi alíquotado em placas contendo TSA para contagem de UFC. Como podemos observar o tratamento com rMCP-1/CCL2 reduz o número de UFC no sobrenadante da cultura de macrófagos estimulados com as bactérias *E.coli* (**Figura 7.10**) e esse aumento da eliminação bacteriana não é observado após o tratamento com o anticorpo anti-MCP-1/CCL2 no sobrenadante da cultura de macrófagos estimulados com *E. coli*, que possuem aumento do número de UFC quando comparamos com o grupo estimulado com a *E.coli* não tratado com o anti-MCP-1/CCL2 (**Figuras 7.9**).

Com base nesses dados, avaliamos o papel do MCP-1/CCL2 na maior eliminação bacteriana observada após o tratamento com a rPAF-AH. Para isso, submetemos ao CLP animais geneticamente deficientes do receptor do MCP-1/CCL2 (CCR2^{-/-}), tratamos com a rPAF-AH e fizemos a contagem de UFC na cavidade peritoneal (**Figura 7.11**). O grupo de animais CCR2^{-/-} submetidos ao CLP possui aumento do número de UFC e quando esses animais foram tratados com a rPAF-AH não observamos redução do número de UFC. Esse resultado sugere a

participação do MCP-1/CCL2 na melhor eliminação bacteriana observada após o tratamento com a rPAF-AH.

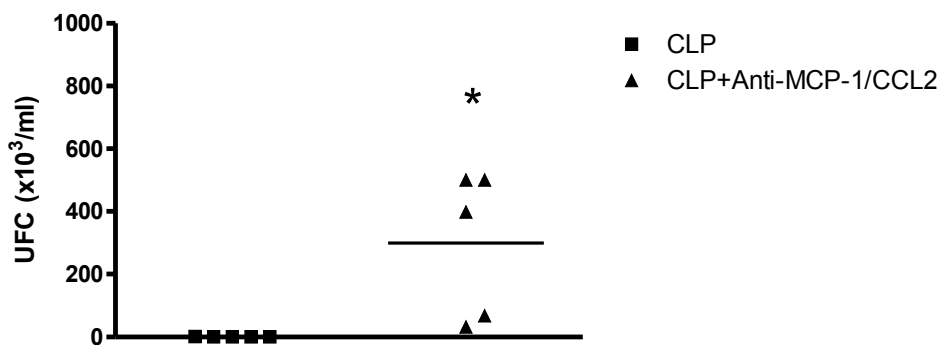


Figura 7.8- A neutralização do MCP-1/CCL2 reduz a eliminação de bactérias na cavidade peritoneal de animais submetidos ao CLP. Os animais foram tratados com anti-MCP-1/CCL2 (10 ng / Kg) e uma hora após, submetidos ao CLP. Seis horas após, os animais tiveram suas cavidades peritoneais lavadas para a contagem de UFC. Os grupos experimentais consistem de 5 animais no grupo CLP e 5 animais no grupo CLP+anti-MCP-1/CCL2, sendo representado um experimento de três realizados com resultados similares. O asterisco (*) representa diferença estatisticamente significativa entre o grupo CLP+anti-MCP-1/CCL2 quando comparado com o grupo CLP, com um $P \leq 0,05$ (teste T-Student).

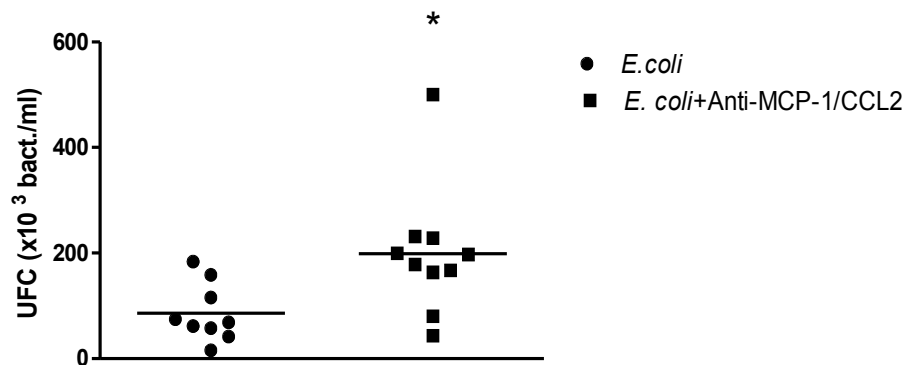


Figura 7.9- A neutralização do MCP-1/CCL2 reduz a eliminação da bactéria *E.coli* por macrófagos peritoneais. Macrófagos peritoneais de animais Swiss foram tratados com anti-MCP-1/CCL2 (10 ng / ml) e uma hora após estimulados com *E.coli* (10⁵ bact. / ml). Meia hora após o sobrenadante foi aliqotado em placas contendo TSA, para a contagem de UFC. O gráfico representa três experimentos diferentes, e as linhas horizontais representam a média da contagem de UFC. O asterisco (*) representa diferença estatisticamente significativa no grupo *E.coli*+anti-MCP-1/CCL2 quando comparado com o grupo *E.coli*, com um P≤0,05 (teste T-Student).

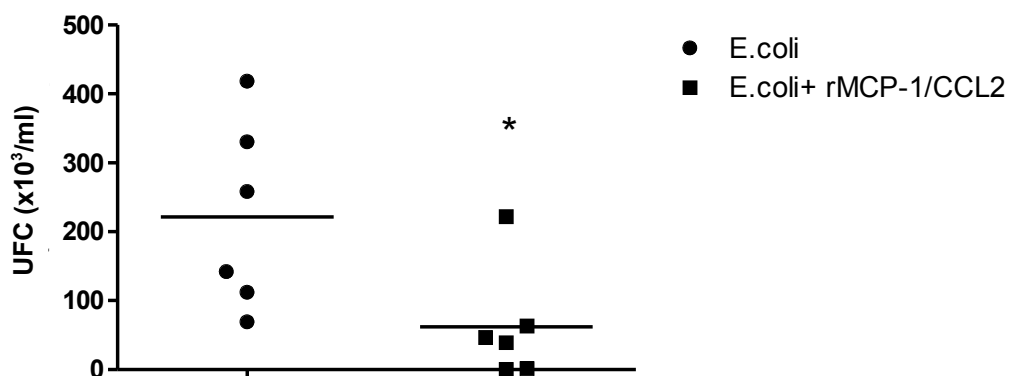


Figura 7.10- O MCP-1/CCL2 aumenta a eliminação da bactéria *E. coli* por macrófagos peritoneais. Os macrófagos peritoneais provenientes de animais Swiss foram plaqueados em placa de 24 poços (10⁶ Cél. / poço), tratados com rMCP-1/CCL2 (100 ng / ml) e uma hora após estimulados com *E.coli* (10⁵ bact. / ml) por 30 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi aliqotado em placas contendo TSA, para a contagem do UFC. O asterisco (*) representa diferença estatisticamente significativa do grupo *E.coli*+MCP-1/CCL2 quando comparado com o grupo *E.coli*, com um P≤0,05 (teste T-Student).

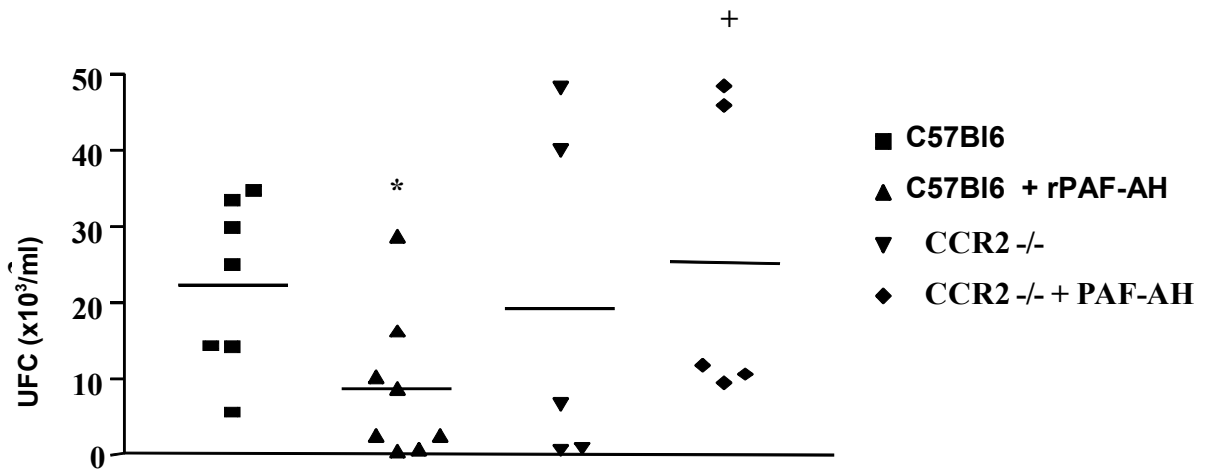


Figura 7.11- O tratamento com a rPAF-AH não foi capaz aumentar a eliminação bacteriana de animais geneticamente deficientes para o MCP-1/CCL2 (CCR2-/-) submetidos ao CLP. Animais C57BI6 (“background genético”) e animais CCR2-/- foram submetidos ao CLP e 15 minutos depois tratados com a rPAF-AH (1 mg / kg, i.p). Após 6 horas, os animais foram sacrificados, o lavado peritoneal recolhido para contagem do número de unidades formadoras de colônia (UFC). Os grupos experimentais consistem de 6 animais, sendo representado um experimento de três realizados com resultados similares. O asterisco (*) representa diferença estatisticamente significativa quando do grupo C57BI6+rPAF-AH comparado com o grupo C57BI6, com um $P \leq 0,05$ (teste T-Student). O (+) representa diferença estatisticamente significativa quando do grupo CCR2 -/- +rPAF-AH comparado com o grupo C57BI6+rPAF-AH, com um $P \leq 0,05$ (teste T-Student).

Um estudo realizado por Speyer e cols. (2004) demonstrou que polimorfonucleares de camundongos sépticos (CLP) expressam CCR2, o que torna o MCP-1/CCL2 quimiotático para neutrófilos. Para averiguar se o MCP-1/CCL2 também influencia a eliminação bacteriana mediada por neutrófilos, fizemos a contagem do UFC do sobrenadante de neutrófilos provenientes de animais geneticamente deficientes para o CCR2 (CCR2^{-/-}) estimulados com *E.coli*. Os neutrófilos peritoneais de animais geneticamente deficientes para o CCR2 possuem aumento do número de UFC quando comparamos com o grupo de animais C67bl6. (**Figura 7.12**), o que indica que o MCP-1/CCL2 pode ter papel importante no aumento da eliminação de bactérias via neutrófilos. No entanto, são necessários mais ensaios para confirmar essa hipótese.

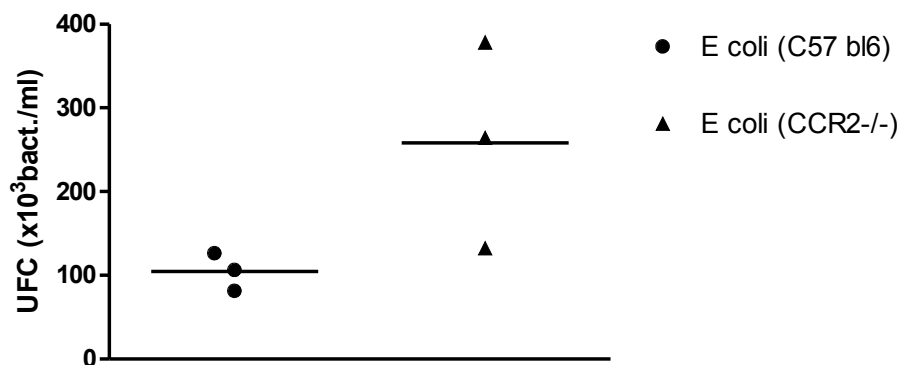


Figura 7.12- Aumento do número de UFC na cultura de neutrófilos provenientes de animais geneticamente deficientes para o CCR2 quando comparados neutrófilos de animais C57BI6. Neutrófilos peritoneais de animais C57BI6 e CCR2-/- foram isolados através de gradiente de percoll, plaqueados em placas de 24 poços (10^6 céls. / poço) e estimulados com a bactéria *E. coli* (10^5 bact. / ml). Meia hora após o sobrenadante foi aliqotado em placas contendo TSA, para a contagem do UFC. As linhas horizontais representam a média da contagem de UFC.

7.7- O tratamento com a enzima rPAF-AH aumenta os níveis de nitrito na cavidade peritoneal de animais submetidos ao CLP e o óxido nítrico tem um papel importante na eliminação de bactérias

O óxido nítrico é um mediador importante envolvido na eliminação bacteriana. O peroxidonitrito, produto da reação do NO com o ânion superóxido, promove peroxidação dos lipídios de membrana de agentes invasores (alterando assim a permeabilidade das membranas celulares), inibição de funções mitocondriais no microorganismo, bem como a fragmentação do DNA bacteriano, que culmina com a morte celular (Hauser e cols., 2005). Para analisar a participação do óxido nítrico na melhor eliminação bacteriana, submetemos animais ao CLP e tratamos com L-NAME 2 horas após. O L-NAME é um análogo da arginina que inibe a síntese de NO e como podemos visualizar na **figura 7.13**, o tratamento aumentou o número de UFC na cavidade peritoneal dos animais submetidos ao CLP, o que confirma a importância do NO na degradação de bactérias, que já está bem descrita na literatura.

Sabendo que o tratamento com a enzima rPAF-AH aumenta a eliminação bacteriana, resolvemos então dosar os níveis de nitrito na cavidade peritoneal de animais submetidos ao CLP e tratados com a rPAF-AH. Como podemos observar na **figura 7.14**, o tratamento com a rPAF-AH induz um aumento nos níveis de nitrito no lavado peritoneal de animais submetidos ao CLP.

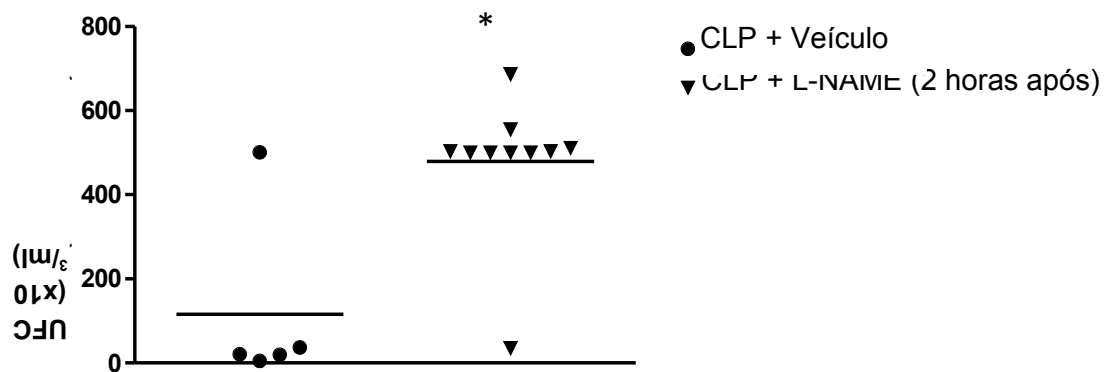


Figura 7.13- A inibição da síntese de óxido nítrico aumenta a proliferação de bactérias na cavidade peritoneal de animais submetidos ao CLP. Os animais Swiss foram submetidos ao CLP e 2 horas após tratados com L-NAME (10 mg / kg- i.p.). Após 6 horas, os animais foram sacrificados, o lavado peritoneal recolhido para contagem do número de unidades formadoras de colônia (UFC). Os grupos experimentais consistem de 5 animais para o grupo CLP e 10 para o grupo CLP+L-NAME, sendo representado um experimento de dois realizados com resultados similares. A linha horizontal corresponde a média da contagem do UFC. O asterisco (*) representa diferença estatisticamente significativa entre o grupo CLP+L-NAME quando comparado com o grupo CLP+veículo, com um $P \leq 0,05$ (teste T-Student).

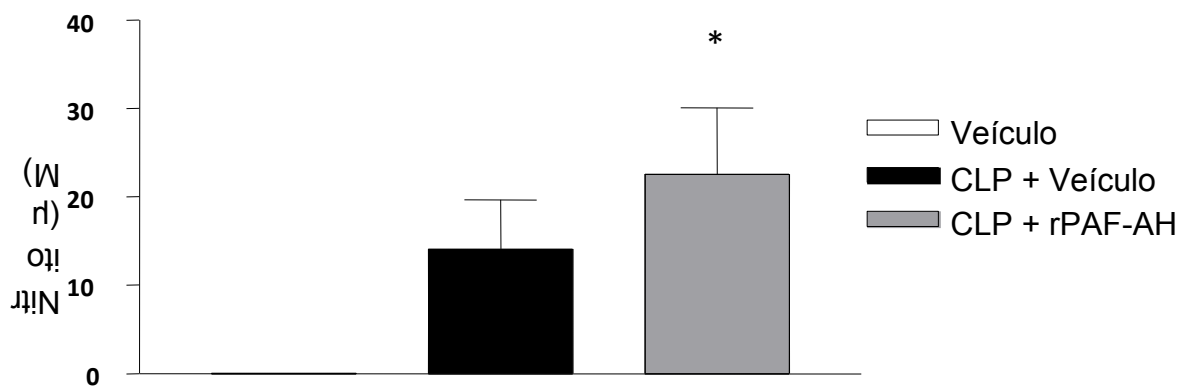


Figura 7.14- O tratamento com a rPAF-AH aumenta os níveis de nitrito na cavidade peritoneal de animais 6 horas após o CLP. Os animais foram submetidos ao CLP e 15 minutos depois tratados com a rPAF-AH (1 mg / kg- i.p.). Após 6 horas, os animais foram sacrificados, o lavado peritoneal recolhido para dosagem de nitrito, pelo método de Griess. Os grupos experimentais consistem de 6 animais, sendo representado um experimento de três realizados com resultados similares. O asterisco (*) representa diferença estatisticamente significativa entre o grupo CLP+rPAF-AH quando comparado com o grupo CLP+Veículo, com um $P \leq 0,05$ (teste T-Student).

Além disso, submetemos animais geneticamente deficientes para a enzima iNOS (animais iNOS^{-/-}) ao CLP e tratamos os animais com a enzima rPAF-AH. Os animais iNOS^{-/-} possuem aumento do número de UFC e a rPAF-AH não reduzir o número de UFC nesses animais (iNOS^{-/-}) (**Figura 7.15**). Sugerindo então que a rPAF-AH, através da maior produção de NO na cavidade peritoneal, aumenta a eliminação de bactérias.

7.8- O tratamento com a rPAF-AH aumenta a síntese de interferon-gama (IFN- γ) na cavidade peritoneal dos animais seis horas após o CLP

Como a rPAF-AH aumenta a eliminação de bactérias via produção de óxido nítrico, resolvemos dosar os níveis de IFN- γ na cavidade peritoneal de animais tratados com a rPAF-AH, uma vez que o IFN- γ aumenta a expressão da iNOS, que é a enzima responsável pela síntese do óxido nítrico (Sheffler e cols., 1995). Para isso animais submetidos ao CLP e tratados com a rPAF-AH, tiveram suas cavidades peritoneais lavadas e os níveis de IFN- γ foram dosados através de método ELISA. Como podemos observar, o tratamento com a rPAF-AH aumenta os níveis de IFN- γ seis horas após o CLP (**Figura 7.16**).

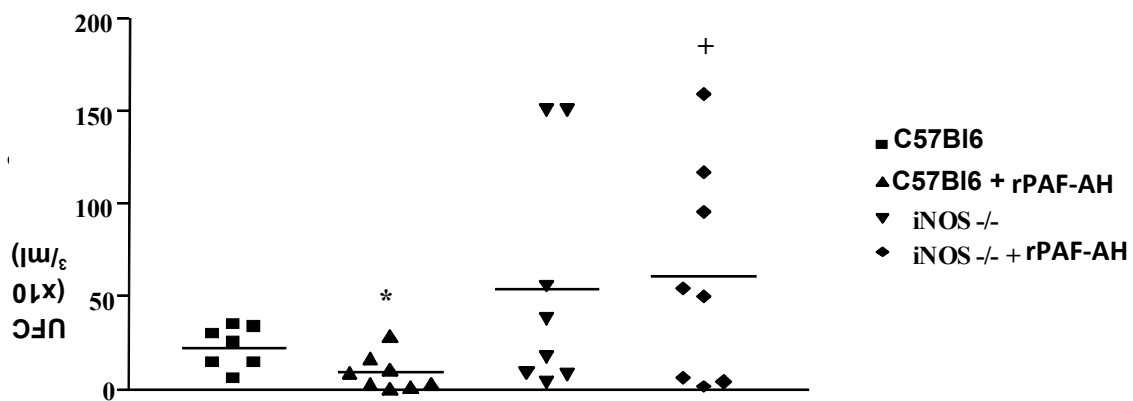


Figura 7.15- Aumento do número de UFC na cavidade peritoneal de animais geneticamente deficientes para iNOS (iNOS^{-/-}) mesmo após o tratamento com rPAF-AH. Os animais selvagens (C57BL/6) e animais iNOS^{-/-} foram submetidos ao CLP e 15 minutos depois tratados com a rPAF-AH (1 mg / kg- i.p.). Após 6 horas, os animais foram sacrificados, o lavado peritoneal recolhido para contagem do número de unidades formadoras de colônia (UFC). Os grupos experimentais consistem de 6 animais, sendo representado um experimento de dois realizados com resultados similares. A linha horizontal corresponde a média da contagem do UFC. O asterisco (*) representa diferença estatisticamente significativa do grupo C57BL/6+rPAF-AH quando comparado com o grupo controle não-tratado (C57BL/6), com um $P \leq 0,05$ (teste T-Student). O (+) representa diferença estatisticamente significativa do grupo iNOS+rPAF-AH quando comparado com o grupo C57BL/6+rPAF-AH, com um $P \leq 0,05$ (teste T-Student).

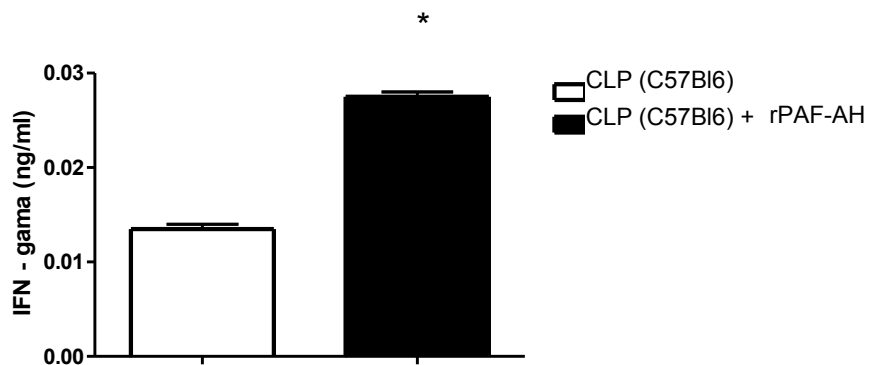


Figura 7.16- O tratamento com a rPAF-AH aumenta os níveis de IFN- γ na cavidade peritoneal de animais 6 horas após o CLP. Os animais foram submetidos ao CLP e 15 minutos depois tratados com a rPAF-AH (1 mg / kg, i.p). Após 6 horas, os animais foram sacrificados e o lavado peritoneal foi recolhido para a dosagem de IFN- γ através do método ELISA. Os dados representam três experimentos diferentes. O asterístico (*) representa diferença estatisticamente significativa do grupo CLP+rPAF-AH quando comparamos com o grupo CLP ($P \leq 0,05$).

7.9- O MCP-1/CCL2 aumenta a síntese de Óxido Nítrico

Dados do nosso laboratório demonstram que em cultura de macrófagos peritoneais o MCP-1/CCL2 age em sinergismo com IFN- γ (Dado não mostrado). Além disso, macrófagos de animais geneticamente deficientes para o MCP-1/CCL2 estimulados com LPS, IFN- γ e LPS+ IFN- γ , produzem menos NO, quando comparamos macrófagos provenientes de animais C57Bl6 (Dado não mostrado). Como o NO e o MCP-1/CCL2 são importantes para a eliminação bacteriana e estão aumentados após o tratamento com a enzima rPAF-AH, resolvemos verificar se há uma correlação entre esses dois mediadores. Para isso, analisamos os níveis de nitrito no sobrenadante da cultura de macrófagos peritoneais estimulados com o rMCP-1/CCL2 e com a rPAF-AH. Observamos que macrófagos peritoneais tratados com rMCP-1/CCL2 e rPAF-AH simultaneamente produzem níveis elevados de óxido nítrico, após o estímulo com a bactéria *E.coli* (**Figura 7.17**).

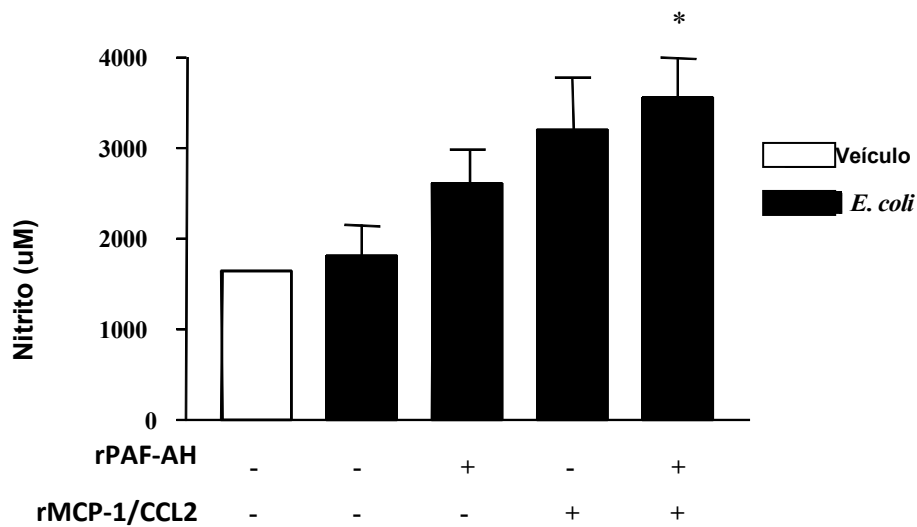


Figura 7.17- O MCP-1/CCL2 atua de forma cooperativa com a rPAF-AH, aumentando significativamente os níveis de nitrito liberados por macrófagos peritoneais após o estímulo com a bactéria *E. coli*. Macrófagos peritoneais foram incubados com rMCP-1/CCL2 (100 ng / ml) e rPAF-AH (0,025 mg / poço) ou ambos e estimulados com *E. coli* (10^5 bact./poço). Após 24 horas, o sobrenadante da cultura foi obtido para determinação dos níveis de nitrito através do ensaio de Griess. Os dados representam três experimentos diferentes (média \pm EPM). O asterístico (*) representa diferença estatisticamente significativa do grupo *E.coli*+rPAF-AH+rMCP-1/CCL2 quando comparamos com o grupo *E.coli* ($P \leq 0,05$).

8. DISCUSSÃO

Dentre os mediadores lipídicos liberados durante a sepse, o PAF tem um papel central na interação entre as células do sistema imune, aumentando a adesão de leucócitos às células endoteliais, agindo em sinergia com P-selectinas ou induzindo a expressão de $\beta 2$ integrinas (CD11/CD18), além de aumentar a polarização, a liberação de enzimas granulares e a redistribuição dos ligantes de superfície em leucócitos. Adicionalmente o PAF pode propagar a resposta inflamatória, decorrente da maior expressão de TLR-4 e NF-kB em macrófagos (Kuijpers e cols., 2001; Lorant e cols., 1995; Prescott e cols., 2000). Estratégias terapêuticas estão sendo desenvolvidas na tentativa de antagonizar ou inativar esse fosfolípídeo e conseqüentemente reduzir seus efeitos biológicos, onde podemos ressaltar a utilização de antagonistas do receptor do PAF, que competem com o PAF pelo sítio de ligação do seu receptor, assim como a administração da enzima rPAF-AH, que hidrolisa e inativa o PAF. O estudo clínico de fase II, envolvendo pacientes com sepse severa com foco pulmonar principalmente, demonstrou que o tratamento com a rPAF-AH (1mg/Kg) foi associado com a redução da incidência de disfunção orgânica múltipla, com conseqüente aumento da sobrevida (Schuster e cols., 2003). Já em um estudo de fase III, que compreendeu 2522 pacientes internados em 146 Unidades de Terapia Intensiva de 9 países da América do Norte, Europa, Israel e África do Sul, com sepse severa de diversas origens, o efeito protetor da rPAF-AH não foi observado (Opal e cols., 2004). O ponto negativo desse estudo foi que os pesquisadores não verificaram a atividade da rPAF-AH nesses pacientes, análise que foi realizada durante o estudo de fase IIb. Esse conhecimento é importante, pois seriam selecionados os pacientes com a atividade da enzima reduzida, que poderiam ser favorecidos pelo tratamento. Outro fator que explicaria o motivo pelo qual esse estudo não obteve resultados positivos seria que os ensaios clínicos foram realizados antes dos experimentos na bancada, que são necessários para caracterização do mecanismo de ação da droga, se a mesma possui efeitos colaterais, para quais tipos de bactérias ela se mostra mais eficaz e a partir daí direcionar o tratamento àqueles pacientes em que a administração da enzima rPAF-AH seria benéfica.

Em 2006, o nosso grupo de pesquisa publicou o primeiro artigo envolvendo experimentos de bancada, onde tratamento com a rPAF-AH aumentou a sobrevivência dos animais com peritonite polimicrobiana gerada pelo CLP e esse efeito protetor está relacionado com o balanço da resposta inflamatória, marcado pela redução dos níveis de IL-6 e MIF e aumento de MCP-1/CCL2 e IL-10 (Gomes e cols., 2006a). Como a rPAF-AH aumenta a sobrevivência dos animais submetidos ao CLP e já foi descrito que ela promove um balanço da resposta inflamatória resolvemos analisar se a rPAF-AH aumenta também a eliminação bacteriana. O CLP foi o modelo de escolha para este estudo, pois é clinicamente relevante por simular a diverticulite perforada e a ruptura de apêndice cecal (Buras e cols., 2005). Nesse modelo ocorre o desenvolvimento de peritonite polimicrobiana associado à translocação de bactérias da flora intestinal para o sangue (Wichterman e cols., 1980). O tratamento com a rPAF-AH aumenta a eliminação de bactérias tanto na cavidade peritoneal 6 horas após o CLP (**Figura 7.1**), quanto no sangue 24 horas após o CLP (**Figura 7.2**). Esses resultados sugerem que a rPAF-AH pode ser uma estratégia terapêutica importante, pois aumenta a eliminação de bactérias tanto no foco da infecção (cavidade peritoneal), quanto atua de forma sistêmica reduzindo o número de UFC no sangue dos animais submetidos ao CLP e esse aumento da eliminação bacteriana também foi observado na cavidade peritoneal de animais 6 horas após o desafio com a bactéria *S. Typhimurium* (**Figura 7.3**).

Nós demonstramos que a melhor eliminação de bactérias foi decorrente da inibição da atividade biológica do PAF, uma vez que animais pré-tratados com o SR27417 (antagonista do receptor do PAF) submetidos ao CLP possuem aumento da eliminação de bactérias (**Figura 7.4**). O SR27417 se mostrou eficaz durante o pré-tratamento, mas novos estudos são necessários para confirmar se ele é eficaz também durante o pós-tratamento. Dados na literatura sobre a utilização de antagonistas do PAF são controversos. Alguns estudos demonstram que os antagonistas do PAF podem atuar como agonistas parciais (como o SRI 63-441, CV 3988, WEB 2170, WEB 2086, entre outros), induzindo efeitos decorrentes da ativação do receptor do PAF (Chen e cols., 1992; Hu e cols., 1993), como por exemplo, a indução da vasoconstrição (Chen e cols., 1992; Hu e cols., 1993). Por isso, os ensaios atuais têm focado na utilização da enzima rPAF-AH. Nosso grupo demonstrou que a rPAF-AH possuiu eficácia tanto 15 minutos quanto 6 horas após o

CLP (Gomes e cols., 2006a), o que a torna clinicamente viável, por permitir um tratamento pós-diagnóstico de sepse.

A rPAF-AH reduz a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal (Gomes e cols., 2006a), mas não altera o número de mononucleares na cavidade (Gomes, 2006), que pode ser explicado pelo aumento dos níveis de MCP-1/CCL2 (Gomes e cols., 2006a). Como o perfil celular na cavidade peritoneal dos animais submetidos ao CLP após o tratamento com a rPAF-AH é composto principalmente por células mononucleares, resolvemos investigar o papel dos macrófagos no processo de eliminação bacteriana. O tratamento com a rPAF-AH aumenta a eliminação bacteriana na cultura de macrófagos peritoneais estimulados com a *E.coli* (**Figura 7.5**).

A redução do crescimento bacteriano observada após o tratamento com a rPAF-AH pode ser decorrente da inativação do PAF, uma vez que nosso grupo de pesquisa observou que macrófagos peritoneais tratados com PAF e estimulados com *E. coli* possuem redução da eliminação bacteriana (dado não mostrado). E esse dado já foi descrito na literatura, onde Zaitseva e cols. (1998), observaram que o PAF reduziu a atividade fagocítica de macrófagos obtidos de animais desafiados com LPS (proveniente de *Pseudomonas aeruginosa*). Então quando a célula é ativada pelo LPS, ela produz diversos mediadores, dentre eles o PAF. Quando essas células entram em contato novamente com o PAF, elas se tornam anérgicas. Esta hipótese foi confirmada nesse mesmo estudo, onde macrófagos provenientes de animais tratados com PAF reestimulados com o PAF *in vitro* possuem redução da atividade fagocítica. A redução da atividade fagocítica pode ocorrer devido à redução da expressão do receptor do PAF, bem como pela redução da afinidade deste fosfolípídeo ao seu receptor. O processo de anergia também ocorre devido à dessensibilização heteróloga, onde fator de transferência liberado por um tipo de macrófago tornaria macrófagos residentes em outros tecidos hiporresponsivos ao PAF, com redução da fagocitose. Isso também foi observado por Zaitseva e cols. (1998), no qual macrófagos peritoneais expostos a fatores de transferência liberados por macrófagos esplênicos e tratados com o PAF possuem redução da atividade fagocítica. Esses fatores de transferências se ligam aos antígenos de maneira específica (memória imunológica) e transmitem a informação imunológica de uma célula ativada a uma célula *naive* (Rosenfeld e Dressler, 1974), aumentando a síntese de citocinas (Kirkpatrick, 1993).

A rPAF-AH aumenta a eliminação de bactérias tanto na cavidade peritoneal e no sangue de animais submetidos ao CLP quanto na cultura de macrófagos peritoneais estimulados com a *E.coli*. Nossos resultados sugerem que essa maior eliminação de bactérias não é decorrente da ação direta da rPAF-AH (**figura 7.6**), do PAF ou do liso-PAF sobre o crescimento bacteriano (**Figura 7.7**). Não está descrito na literatura se a rPAF-AH influencia de forma direta o crescimento bacteriano, no entanto um estudo realizado por Seo e cols. (2006) demonstrou que a rPAF-AH hidrolisa e inativa fosfolipídeos “PAF-like” como o ácido lipoteicoico (LTA) ancorado à parede de bactérias gram positivas, uma vez que bactérias gram-positivas *Streptococcus mutans* e *Streptococcus* do grupo B colocadas em contato direto com a rPAF-AH não foram hábeis em ativar macrófagos, tanto de camundongos quanto de humanos.

O MCP-1/CCL2 possui um papel importante no processo de eliminação de bactérias mediado pela rPAF-AH, onde animais pré-tratados com anticorpo anti-MCP-1/CCL2 e submetidos CLP, possuem aumento do número de UFC (**Figura 7.8**). Quando os macrófagos peritoneais foram tratados com MCP-1/CCL2 e estimulados com *E.coli* (**Figura 7.10**) observamos melhor eliminação bacteriana, que foi inibida quando macrófagos estimulados com a *E.coli* foram pré-tratados com o anti-MCP-1/CCL2 (**Figura 7.9**). Analisamos a participação do MCP-1/CCL2 na eliminação de bactérias, uma vez que nós anteriormente demonstramos que o MCP-1/CCL2 está aumentado após o tratamento com a enzima rPAF-AH (Gomes e cols., 2006a). Em animais geneticamente deficientes para o CCR2 e submetidos ao CLP, a rPAF-AH não foi capaz de aumentar a eliminação de bactérias (**Figura 7.11**). Adicionalmente. Em outro estudo demonstramos que o papel protetor do MCP-1/CCL2, que foi capaz de modular a resposta inflamatória de animais submetidos ao CLP, reduzindo os níveis de MIF, IL-6 e KC, e aumentando os níveis da citocina antiinflamatória, a IL-10 (Gomes e cols., 2006b). Feterowski e cols. (2004) demonstraram que na sepse severa, induzida por CASP, a ativação da via de sinalização do CCR2 inibe a síntese de IL-10, reduzindo assim a imunossupressão mediada por esta citocina, favorecendo a morte de bactérias. Nossos resultados também demonstraram o efeito desta quimiocina sobre a degradação bacteriana, no entanto observamos que o MCP-1/CCL2 aumenta os níveis de IL-10. O MCP-1/CCL2 também tem um papel importante na regulação da eliminação de bactérias

por neutrófilos, como demonstrado na **figura 7.12**. Neutrófilos provenientes de animais geneticamente deficientes para o CCR2 estimulados com *E.coli*, possuem aumento do número de UFC. No entanto, novos ensaios são necessários para comprovar essa hipótese. Dados da literatura descrevem a ação direta do MCP-1/CCL2 sobre neutrófilos, aumentando a atividade da mieloperoxidase e o recrutamento de neutrófilos (Ramnath e cols., 2008), de forma direta ou indireta, através da produção de leucotrieno B₄ (Matsukawa e cols., 1999). O leucotrieno B₄ aumenta o número de neutrófilos no sítio de infecção e a eliminação bacteriana de microorganismos (Rios-Santos e cols., 2003). No entanto, Winter e cols. (2009), associam o efeito protetor do MCP-1/CCL2 com o recrutamento preferencial de macrófagos e células dendríticas para o local da infecção. Gomes e cols. (2006a) também sugerem que o MCP-1/CCL2 regula o perfil celular na cavidade peritoneal de animais com sepse, ao observarem uma redução no número de mononucleares na cavidade abdominal associado ao aumento da migração de neutrófilos em animais geneticamente deficientes para o CCR2.

Como a rPAF-AH não possui efeito direto sobre o crescimento bacteriano, a melhor eliminação de bactérias envolve a produção de mediadores pelos leucócitos. Nós demonstramos que o NO tem participação na redução do crescimento bacteriano, uma vez que o tratamento com L-NAME (inibidor da síntese de NO) reduziu a eliminação de bactérias (**Figura 7.13**). Adicionalmente nós demonstramos que o tratamento com a rPAF-AH aumenta os níveis de nitrito na cavidade peritoneal de animais submetidos ao CLP (**Figura 7.14**). Corroborando a participação do NO na melhor eliminação de bactérias nós demonstramos que em animais geneticamente deficientes para iNOS, o tratamento com a rPAF-AH não foi capaz de reduzir o número de UFC na cavidade peritoneal (**Figura 7.15**), indicando que a melhor eliminação de bactérias observada após o tratamento com a rPAF-AH é dependente da produção de NO. O efeito microbicida do NO já está bem descrito na literatura. O NO atua: na redução da replicação do DNA bacteriano; no aumento da síntese espécies oxidantes reativas como o peroxidonitrito; em sinergismo com radical hidroxila levando a degradação da fita dupla de DNA; inibindo de metaloenzimas antioxidantes, como a catalase, a qual eleva os níveis de peróxido de hidrogênio e do radical hidroxila (De Groote e cols., 1995). Quando o NO encontra-se em níveis exacerbados no curso da sepse, ele pode ter efeitos

sistêmicos e está envolvido com a disfunção da microcirculação hepática, vasodilatação sistêmica e a depressão miocárdica, que leva o indivíduo ao choque (Duke e cols., 1997; Eum e cols., 2007). No entanto, em nosso estudo observamos um aumento de nitrito apenas na cavidade abdominal dos animais tratados com a rPAF-AH e esse aumento de nitrito no local da infecção parece favorecer a melhor eliminação de bactérias.

Nós sugerimos também que a maior produção de NO observada após o tratamento com a rPAF-AH 6 horas após o CLP pode ser decorrente do aumento dos níveis de IFN- γ na cavidade peritoneal dos animais (**Figura 7.16**) e essa hipótese está de acordo com dados descritos na literatura, que demonstram que o IFN- γ aumenta a expressão da iNOS, e conseqüentemente a produção de óxido nítrico (MacMicking e cols., 1997). Adicionalmente o IFN- γ induz a maior expressão da argininosuccinato sintase, que leva a formação da L-arginina (substrato da iNOS) (Nussler e cols., 1994). O IFN- γ também tem um papel importante para a montagem da resposta imune inata (Qiu e cols., 2001), ativando mecanismos bactericidas (aumentando a apresentação de antígenos e a fagocitose) (Seki, 2000) e mecanismos tumoricidas (Douvas e cols., 1985; Young, 1996).

Algumas evidências sugerem que o MCP-1/CCL2 aumenta a síntese de NO. Dados do nosso laboratório demonstraram que macrófagos peritoneais estimulados com rMCP-1/CCL2 concomitantemente com o INF- γ produzem níveis mais elevados de NO (dado não mostrado). Além disso, nosso grupo observou que os macrófagos peritoneais provenientes de animais geneticamente deficientes para a quimiocina MCP-1/CCL2 (MCP-1/CCL2 $^{-/-}$), produzem níveis significativamente reduzidos de nitrito quando estimulados com LPS, IFN- γ ou ambos (dado não mostrado). O MCP-1/CCL2 pode agir em cooperação com a rPAF-AH, aumentando a síntese de NO (**Figura 7.17**). A participação do MCP-1/CCL2 na indução da síntese de NO já foi sugerida por alguns autores. Okuma e cols. (2006) descreveram que o MCP-1/CCL2 reduz a injúria pulmonar aguda induzida pela hiperóxia via produção de óxido nítrico. Biswas e cols. (2001) observaram que a via de sinalização do MCP-1/CCL2 envolvida com a produção de NO por macrófagos peritoneais, envolve a quinase fosfatidilinositol-3 (PI3K), a proteína quinase C, e as MAPK p42/44, além de ser regulada pela via cálcio/calmodulina. A ativação da via da PI3 quinase/AKT confere proteção durante a sepse, com redução dos níveis de IL-6, TNF- α , e IL-10 seis horas

após o CLP e aumento da atividade oxidativa e a fagocitose de neutrófilos via C5a (Wrann e cols., 2007). A ativação desta via poderia explicar o efeito protetor do MCP-1/CCL2. Adicionalmente, alguns autores relatam que o óxido nítrico também tem um papel importante na modulação da expressão de MCP-1/CCL2 (Tsao e cols., 1997; Zeiher e cols., 1995) e essa regulação pode ocorrer em virtude da regulação do NFkB (Korhonen e cols., 2005).

Durante a sepse os níveis de PAF encontram-se aumentados, devido à redução da atividade da enzima PAF-AH e isso parece impactar no desfecho de animais com sepse (Gomes e cols., 2006a). A PAF-AH leva a inativação do PAF, modulando a resposta inflamatória durante o processo infeccioso, aumentando os níveis de mediadores antiinflamatórios como a IL-10 e o MCP-1/CCL2/CCL-2 e reduzindo as citocinas pró-inflamatórias KC, IL-6, TNF- α e MIF. A rPAF-AH não possui efeito direto sobre a proliferação bacteriana e essa modulação da resposta inflamatória é importante para o processo o controle da infecção, via produção de IFN- γ e MCP-1/CCL2, que aumentam a síntese de NO. São necessárias mais investigações para esclarecer a via de sinalização pelo qual o MCP-1/CCL2 aumenta a síntese de óxido nítrico e se há um sinergismo entre MCP-1/CCL2 e IFN- γ durante o tratamento com a rPAF-AH. Com uma melhor eliminação bacteriana ocorre uma maior sobrevida dos animais tratados com a rPAF-AH. A rPAF-AH pode ser uma ferramenta importante utilizada no tratamento de pacientes sépticos, no entanto novos estudos são necessários para confirmar essa hipótese.

9. CONCLUSÃO

O tratamento com a rPAF-AH aumenta a eliminação bacteriana em animais submetidos ao modelo de sepse polimicrobiana. Essa melhor eliminação bacteriana também é observada durante a infecção pela bactéria gram negativa *S. Typhimurium*, bem como em macrófagos pré-tratados com a rPAF-AH e estimulados com a *E. coli*.

Quando colocamos a enzima rPAF-AH em contato direto com a bactéria, na ausência de células, observamos que essa enzima não possui efeito direto sobre o crescimento bacteriano. Uma vez que a rPAF-AH não possui efeito bactericida, essa melhor eliminação bacteriana é decorrente da produção de mediadores, como o IFN- γ e o MCP-1/CCL2, que aumentam a síntese de óxido nítrico.

A rPAF-AH pode ser uma ferramenta terapêutica importante utilizada no tratamento de pacientes sépticos, pois é benéfica tanto durante infecções polimicrobianas (CLP), bem como em infecções causadas por apenas um agente gram negativo (como a *E.coli* e *S. Typhimurium*). No entanto, novos estudos são necessários para definir as condições ideais onde este tratamento poderia beneficiar pacientes sépticos.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akira S, and H Hemmi. Recognition of pathogen-associated molecular patterns by TLR family. *Immunol Lett* 2003.85:85-95.
- Alves-Filho JC, C Benjamim, BM Tavares-Murta, and FQ Cunha. Failure of neutrophil migration toward infectious focus in severe sepsis: a critical event for the outcome of this syndrome. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2005.100 Suppl 1:223-6.
- Andonegui G, CS Bonder, F Green, SC Mullaly, L Zbytnuik, E Raharjo, and P Kubes. Endothelium-derived Toll-like receptor-4 is the key molecule in LPS-induced neutrophil sequestration into lungs. *J Clin Invest* 2003.111:1011-20.
- Andrejeva J, KS Childs, DF Young, TS Carlos, N Stock, S Goodbourn, and RE Randall. The V proteins of paramyxoviruses bind the IFN-inducible RNA helicase, mda-5, and inhibit its activation of the IFN-beta promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004.101:17264-9.
- Angus DC, WT Linde-Zwirble, J Lidicker, G Clermont, J Carcillo, and MR Pinsky. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med* 2001.29:1303-10.
- Angus DC, and RS Wax. Epidemiology of sepsis: an update. *Crit Care Med* 2001.29:S109-16.
- Arai H, H Koizumi, J Aoki, and K Inoue. Platelet-activating factor acetylhydrolase (PAF-AH). *J Biochem* 2002.131:635-40.
- Bach EA, M Aguet, and RD Schreiber. The IFN gamma receptor: a paradigm for cytokine receptor signaling. *Annu Rev Immunol* 1997.15:563-91.
- Bacher M, A Meinhardt, HY Lan, W Mu, CN Metz, JA Chesney, T Calandra, D Gemsa, T Donnelly, RC Atkins, and R Bucala. Migration inhibitory factor expression in experimentally induced endotoxemia. *Am J Pathol* 1997.150:235-46.
- Bacher M, CN Metz, T Calandra, K Mayer, J Chesney, M Lohoff, D Gemsa, T Donnelly, and R Bucala. An essential regulatory role for macrophage migration inhibitory factor in T-cell activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996.93:7849-54.
- Baggiolini M, and I Clark-Lewis. Interleukin-8, a chemotactic and inflammatory cytokine. *FEBS Lett* 1992.307:97-101.
- Bauer S, T Muller, and S Hamm. Pattern recognition by Toll-like receptors. *Adv Exp Med Biol* 2009.653:15-34.
- Bauer S, S Pigisch, D Hangel, A Kaufmann, and S Hamm. Recognition of nucleic acid and nucleic acid analogs by Toll-like receptors 7, 8 and 9. *Immunobiology* 2008.213:315-28.
- Benjamim CF, SH Ferreira, and FQ Cunha. Role of nitric oxide in the failure of neutrophil migration in sepsis. *J Infect Dis* 2000.182:214-23.
- Berner R, B Furll, F Stelter, J Drose, HP Muller, and C Schutt. Elevated levels of lipopolysaccharide-binding protein and soluble CD14 in plasma in neonatal early-onset sepsis. *Clin Diagn Lab Immunol* 2002.9:440-5.
- Bernhagen J, T Calandra, RA Mitchell, SB Martin, KJ Tracey, W Voelter, KR Manogue, A Cerami, and R Bucala. MIF is a pituitary-derived cytokine that potentiates lethal endotoxaemia. *Nature* 1993.365:756-9.
- Biswas SK, A Sodhi, and S Paul. Regulation of nitric oxide production by murine peritoneal macrophages treated in vitro with chemokine monocyte chemoattractant protein 1. *Nitric Oxide* 2001.5:566-79.
- Bone RC, WJ Sibbald, and CL Sprung. The ACCP-SCCM consensus conference on sepsis and organ failure. *Chest* 1992.101:1481-3.

Bozza FA, PT Bozza, and HC Castro Faria Neto. Beyond sepsis pathophysiology with cytokines: what is their value as biomarkers for disease severity? *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2005.100 Suppl 1:217-21.

Bozza FA, RN Gomes, AM Japiassu, M Soares, HC Castro-Faria-Neto, PT Bozza, and MT Bozza. Macrophage migration inhibitory factor levels correlate with fatal outcome in sepsis. *Shock* 2004.22:309-13.

Bozza M, AR Satoskar, G Lin, B Lu, AA Humbles, C Gerard, and JR David. Targeted disruption of migration inhibitory factor gene reveals its critical role in sepsis. *J Exp Med* 1999.189:341-6.

Bredt DS, Glatt CE, Hwang PM, Fotuhi M, Dawson TM, and SH Snyder. Nitric oxide synthase protein and mRNA are discretely localized in neuronal populations of the mammalian CNS together with NADPH diaphorase. *Neuron* 1991. 7(4): 615-24.

Buras JA, B Holzmann, and M Sitkovsky. Animal models of sepsis: setting the stage. *Nat Rev Drug Discov* 2005.4:854-65.

Burgmann H, S Winkler, GJ Locker, E Presterl, K Laczika, T Staudinger, S Knapp, F Thalhammer, C Wenisch, K Zedwitz-Liebenstein, M Frass, and W Graninger. Increased serum concentration of soluble CD14 is a prognostic marker in gram-positive sepsis. *Clin Immunol Immunopathol* 1996.80:307-10.

Calandra T, J Bernhagen, RA Mitchell, and R Bucala. The macrophage is an important and previously unrecognized source of macrophage migration inhibitory factor. *J Exp Med* 1994.179:1895-902.

Camussi G, M Aglietta, F Malavasi, C Tetta, W Piacibello, F Sanavio, and F Bussolino. The release of platelet-activating factor from human endothelial cells in culture. *J Immunol* 1983.131:2397-403.

Castro Faria Neto HC, DM Stafforini, SM Prescott, and GA Zimmerman. Regulating inflammation through the anti-inflammatory enzyme platelet-activating factor-acetylhydrolase. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2005.100 Suppl 1:83-91.

Cederholm A, E Svenungsson, D Stengel, GZ Fei, AG Pockley, E Ninio, and J Frostegard. Platelet-activating factor-acetylhydrolase and other novel risk and protective factors for cardiovascular disease in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2004.50:2869-76.

Chalfin DB, ME Holbein, AM Fein, and GC Carlon. Cost-effectiveness of monoclonal antibodies to gram-negative endotoxin in the treatment of gram-negative sepsis in ICU patients. *JAMA* 1993.269:249-54.

Chen CR, NF Voelkel, and SW Chang. Pulmonary vascular reactivity: effect of PAF and PAF antagonists. *J Appl Physiol* 1992.73:1762-9.

Cinel I, and SM Opal. Molecular biology of inflammation and sepsis: a primer. *Crit Care Med* 2009.37:291-304.

Clark SR, AC Ma, SA Tavener, B McDonald, Z Goodarzi, MM Kelly, KD Patel, S Chakrabarti, E McAvoy, GD Sinclair, EM Keys, E Allen-Vercoe, R Devinney, CJ Doig, FH Green, and P Kubes. Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. *Nat Med* 2007.13:463-9.

Clavijo LC, MB Carter, PJ Matheson, LA Wills-Frank, MA Wilson, WB Wead, and RN Garrison. Platelet-activating factor and bacteremia-induced pulmonary hypertension. *J Surg Res* 2000.88:173-80.

Cobb JP, RS Hotchkiss, PE Swanson, K Chang, Y Qiu, VE Laubach, IE Karl, and TG Buchman. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) gene deficiency increases the mortality of sepsis in mice. *Surgery* 1999.126:438-42.

Cohen J. The immunopathogenesis of sepsis. *Nature* 2002.420:885-91.

De Groote, MA, D Granger, Y Xu, G Campbell, R Prince, and FC Fang. Genetic and redox determinants of nitric oxide cytotoxicity in a *Salmonella typhimurium* model. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995.92: 6399-6403.

Deshmane SL, S Kremlev, S Amini, and BE Sawaya. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. *J Interferon Cytokine Res* 2009.29:313-26.

Doi K, A Leelahavanichkul, PS Yuen, and RA Star. Animal models of sepsis and sepsis-induced kidney injury. *J Clin Invest* 2009.119:2868-78.

Douvas GS, DL Looker, AE Vatter, and AJ Crowle. Gamma interferon activates human macrophages to become tumoricidal and leishmanicidal but enhances replication of macrophage-associated mycobacteria. *Infect Immun* 1985.50:1-8.

Duke T, M South, and A Stewart. Activation of the L-arginine nitric oxide pathway in severe sepsis. *Arch Dis Child* 1997.76:203-9.

Echtenacher B, R Urbaschek, K Weigl, MA Freudenberg, and DN Mannel. Treatment of experimental sepsis-induced immunoparalysis with TNF. *Immunobiology* 2003.208:381-9.

Elfering SL, Sarkela TM, and C Giulivi. Biochemistry of mitochondrial nitric oxide synthase. *J Biol Chem* 2002. 277(38): 79–86.

Eum HA, SW Park, and SM Lee. Role of nitric oxide in the expression of hepatic vascular stress genes in response to sepsis. *Nitric Oxide* 2007.17:126-33.

Feterowski C, M Mack, H Weighardt, B Bartsch, S Kaiser-Moore, and B Holzmann. CC chemokine receptor 2 regulates leukocyte recruitment and IL-10 production during acute polymicrobial sepsis. *Eur J Immunol* 2004.34:3664-73.

Fialkow L, L Fochesatto Filho, MC Bozzetti, AR Milani, EM Rodrigues Filho, RM Ladniuk, P Pierozan, RM de Moura, JC Prolla, E Vachon, and GP Downey. Neutrophil apoptosis: a marker of disease severity in sepsis and sepsis-induced acute respiratory distress syndrome. *Crit Care* 2006.10:R155.

Frucht DM, T Fukao, C Bogdan, H Schindler, JJ O'Shea, and S Koyasu. IFN-gamma production by antigen-presenting cells: mechanisms emerge. *Trends Immunol* 2001.22:556-60.

Gaur U, and BB Aggarwal. Regulation of proliferation, survival and apoptosis by members of the TNF superfamily. *Biochem Pharmacol* 2003.66:1403-8.

Geller DA, Nussler AK, Di Silvio M, Lowenstein CJ, Shapiro RA, Wang SC, Simmons RL, and Billiar TR. Cytokines, endotoxin and glucocorticoids regulate the expression of inducible nitric oxide synthase in hepatocytes. *Proc Nat. Acad Sci* 1992. 90: 522-526.

Gessani S, and F Belardelli. IFN-gamma expression in macrophages and its possible biological significance. *Cytokine Growth Factor Rev* 1998.9:117-23.

Ghafourifar P, and C Richter. Nitric oxide synthase activity in mitochondria. *FEBS Lett* 1997. 418 (3): 291-6.

Gogos CA, E Drosou, HP Bassaris, and A Skoutelis. Pro- versus anti-inflammatory cytokine profile in patients with severe sepsis: a marker for prognosis and future therapeutic options. *J Infect Dis* 2000.181:176-80.

Gomes RN. 2006. Potencial terapêutico da PAF-acetilhidrolase (PAF-AH) no controle da sepse. In Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular. Vol. Doutorado. Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. 154.

Gomes RN, FA Bozza, RT Amancio, AM Japiassu, RC Vianna, AP Lorangeira, JM Gouvea, MS Bastos, GA Zimmerman, DM Stafforini, SM Prescott, PT Bozza, and HC Castro-Faria-Neto. Exogenous platelet-activating factor acetylhydrolase reduces

mortality in mice with systemic inflammatory response syndrome and sepsis. *Shock* 2006a.26:41-9.

Gomes RN, RT Figueiredo, FA Bozza, P Pacheco, RT Amancio, AP Laranjeira, HC Castro-Faria-Neto, PT Bozza, and MT Bozza. 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* 2006b.26:457-63.

Gordon AC, AL Lagan, E Aganna, L Cheung, CJ Peters, MF McDermott, JL Millo, KI Welsh, P Holloway, GA Hitman, RD Piper, CS Garrard, and CJ Hinds. TNF and TNFR polymorphisms in severe sepsis and septic shock: a prospective multicentre study. *Genes Immun* 2004.5:631-40.

Harter L, L Mica, R Stocker, O Trentz, and M Keel. Increased expression of toll-like receptor-2 and -4 on leukocytes from patients with sepsis. *Shock* 2004.22:403-9.

Hasan U, C Chaffois, C Gaillard, V Saulnier, E Merck, S Tancredi, C Guiet, F Briere, J Vlach, S Lebecque, G Trinchieri, and EE Bates. Human TLR10 is a functional receptor, expressed by B cells and plasmacytoid dendritic cells, which activates gene transcription through MyD88. *J Immunol* 2005.174:2942-50.

Hauser B, H Bracht, M Matejovic, P Radermacher, and B Venkatesh. Nitric oxide synthase inhibition in sepsis? Lessons learned from large-animal studies. *Anesth Analg* 2005.101:488-98.

Hauser B, M Matejovic, and P Radermacher. Nitric oxide, leukocytes and microvascular permeability: causality or bystanders? *Crit Care* 2008.12:104.

Hayashi F, KD Smith, A Ozinsky, TR Hawn, EC Yi, DR Goodlett, JK Eng, S Akira, DM Underhill, and A Aderem. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* 2001.410:1099-103.

Heemskerk S, P Pickkers, MP Bouw, A Draisma, JG van der Hoeven, WH Peters, P Smits, FG Russel, and R Masereeuw. Upregulation of renal inducible nitric oxide synthase during human endotoxemia and sepsis is associated with proximal tubule injury. *Clin J Am Soc Nephrol* 2006.1:853-62.

Henderson WR, Jr., J Lu, KM Poole, GN Dietsch, and EY Chi. Recombinant human platelet-activating factor-acetylhydrolase inhibits airway inflammation and hyperreactivity in mouse asthma model. *J Immunol* 2000.164:3360-7.

Hengst JM. The role of C-reactive protein in the evaluation and management of infants with suspected sepsis. *Adv Neonatal Care* 2003.3:3-13.

Henig NR, ML Aitken, MC Liu, AS Yu, and WR Henderson, Jr. Effect of recombinant human platelet-activating factor-acetylhydrolase on allergen-induced asthmatic responses. *Am J Respir Crit Care Med* 2000.162:523-7.

Hickey MJ, E Sihota, A Amrani, P Santamaria, LD Zbytniuk, ES Ng, W Ho, KA Sharkey, and P Kubes. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) in endotoxemia: chimeric mice reveal different cellular sources in various tissues. *FASEB J* 2002.16:1141-3.

Higgs R, P Cormican, S Cahalane, B Allan, AT Lloyd, K Meade, T James, DJ Lynn, LA Babiuk, and C O'Farrelly. Induction of a novel chicken Toll-like receptor following *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection. *Infect Immun* 2006.74:1692-8.

Ho YS, L Swenson, U Derewenda, L Serre, Y Wei, Z Dauter, M Hattori, T Adachi, J Aoki, H Arai, K Inoue, and ZS Derewenda. Brain acetylhydrolase that inactivates platelet-activating factor is a G-protein-like trimer. *Nature* 1997.385:89-93.

Hope BT, Michael GJ, Knigge KM, and SR Vincent. Neuronal NADPH diaphorase is a nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci* 1991. 88:2811-14.

Hopkins N, Y Gunning, DF O'Croinin, JG Laffey, and P McLoughlin. Anti-inflammatory effect of augmented nitric oxide production in chronic lung infection. *J Pathol* 2006.209:198-205.

Hornung V, J Ellegast, S Kim, K Brzozka, A Jung, H Kato, H Poeck, S Akira, KK Conzelmann, M Schlee, S Endres, and G Hartmann. 5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I. *Science* 2006.314:994-7.

Hu W, IK McNicholl, PC Choy, and RY Man. Partial agonist effect of the platelet-activating factor receptor antagonists, WEB 2086 and WEB 2170, in the rat perfused heart. *Br J Pharmacol* 1993.110:645-50.

Hultgren OH, M Stenson, and A Tarkowski. Role of IL-12 in Staphylococcus aureus-triggered arthritis and sepsis. *Arthritis Res* 2001.3:41-7.

Isaacs A, and J Lindenmann. Virus interference. I. The interferon. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 1957.147:258-67.

Isaacs A, J Lindenmann, and RC Valentine. Virus interference. II. Some properties of interferon. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 1957.147:268-73.

Janeway CAT, P.; Walport, M.; Shlomchick, M.J. 2007. *Imunobiologia: O sistema imunológico na saúde e na doença*. . Artmed. 824 pp.

Kan W, Zhao KS, Jiang Y, Yan W, Huang Q, Wang J, Qin Q, Huang X, and S Wang. Lung, spleen, and kidney are the major places for inducible nitric oxide synthase expression in endotoxic shock: role of p38 mitogen-activated protein kinase in signal transduction of inducible nitric oxide synthase expression. *Shock* 2004. 21: 281–287.

Karasawa K. Clinical aspects of plasma platelet-activating factor-acetylhydrolase. *Biochim Biophys Acta* 2006.1761:1359-72.

Kato H, O Takeuchi, S Sato, M Yoneyama, M Yamamoto, K Matsui, S Uematsu, A Jung, T Kawai, KJ Ishii, O Yamaguchi, K Otsu, T Tsujimura, CS Koh, C Reis e Sousa, Y Matsuura, T Fujita, and S Akira. Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. *Nature* 2006.441:101-5.

Kawai T, K Takahashi, S Sato, C Coban, H Kumar, H Kato, KJ Ishii, O Takeuchi, and S Akira. IPS-1, an adaptor triggering RIG-I- and Mda5-mediated type I interferon induction. *Nat Immunol* 2005.6:981-8.

Kirkpatrick CH. Structural nature and functions of transfer factors. *Ann N Y Acad Sci* 1993.685:362-8.

Kitchens RL, and PA Thompson. Modulatory effects of sCD14 and LBP on LPS-host cell interactions. *J Endotoxin Res* 2005.11:225-9.

Knaus WA, and DP Wagner. Multiple systems organ failure: epidemiology and prognosis. *Crit Care Clin* 1989.5:221-32.

Knowles RG, Merrett M, Salter M, and Moncada, S. Differential induction of brain, lung and liver nitric oxide synthase by endotoxin in the rat. *Biochem J* 1990. 270 (3): 833-6.

Korhonen R, A Lahti, H Kankaanranta, and E Moilanen. Nitric oxide production and signaling in inflammation. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 2005.4:471-9.

Kox WJ, T Volk, SN Kox, and HD Volk. Immunomodulatory therapies in sepsis. *Intensive Care Med* 2000.26 Suppl 1:S124-8.

Kroegel C. The potential pathophysiological role of platelet-activating factor in human diseases. *Klin Wochenschr* 1988.66:373-8.

Kucey DS, PY Cheung, and OD Rotstein. Platelet-activating factor modulates endotoxin-induced macrophage procoagulant activity by a protein kinase C-dependent mechanism. *Infect Immun* 1992.60:944-50.

Kuijpers TW, JM van den Berg, AT Tool, and D Roos. The impact of platelet-activating factor (PAF)-like mediators on the functional activity of neutrophils: anti-inflammatory effects of human PAF-acetylhydrolase. *Clin Exp Immunol* 2001.123:412-20.

Kumar H, T Kawai, H Kato, S Sato, K Takahashi, C Coban, M Yamamoto, S Uematsu, KJ Ishii, O Takeuchi, and S Akira. Essential role of IPS-1 in innate immune responses against RNA viruses. *J Exp Med* 2006.203:1795-803.

Landmann R, T Calandra, and W Zimmerli. Soluble CD14 in septic shock. *Prog Clin Biol Res* 1995a.392:375-80.

Landmann R, W Zimmerli, S Sansano, S Link, A Hahn, MP Glauser, and T Calandra. Increased circulating soluble CD14 is associated with high mortality in gram-negative septic shock. *J Infect Dis* 1995b.171:639-44.

Lauw FN, DR Caffrey, and DT Golenbock. Of mice and man: TLR11 (finally) finds profilin. *Trends Immunol* 2005.26:509-11.

Leon LR, AA White, and MJ Kluger. Role of IL-6 and TNF in thermoregulation and survival during sepsis in mice. *Am J Physiol* 1998.275:R269-77.

Li S, L Stuart, Y Zhang, GU Meduri, R Umberger, and CR Yates. Inter-individual variability of plasma PAF-acetylhydrolase activity in ARDS patients and PAFAH genotype. *J Clin Pharm Ther* 2009.34:447-55.

Lio YC, and EA Dennis. Interfacial activation, lysophospholipase and transacylase activity of group VI Ca²⁺-independent phospholipase A2. *Biochim Biophys Acta* 1998.1392:320-32.

Liu S, Adcock IM, Old RW, Barnes PJ, Evans TW. Lippolysaccharidae treatment in vivo induces widespread tissue expression of inducible nitric oxide synthase mRNA. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1993. 196: 1208-1213.

Lissauer ME, SB Johnson, GV Bochicchio, CJ Feild, AS Cross, JD Hasday, CC Whiteford, WA Nussbaumer, M Towns, and TM Scalea. Differential expression of toll-like receptor genes: sepsis compared with sterile inflammation 1 day before sepsis diagnosis. *Shock* 2009.31:238-44.

Lobo SM, and FRM Lobo. Markers and mediators of inflammatory response in infection and sepsis. *Rev. Bras. Ter. Intensiva.* 2007.19:210-215.

Lolis E, and R Bucala. Therapeutic approaches to innate immunity: severe sepsis and septic shock. *Nat Rev Drug Discov* 2003.2:635-45.

Lorant DE, GA Zimmerman, TM McIntyre, and SM Prescott. Platelet-activating factor mediates procoagulant activity on the surface of endothelial cells by promoting leukocyte adhesion. *Semin Cell Biol* 1995.6:295-303.

Mackay F, H Loetscher, D Stueber, G Gehr, and W Lesslauer. Tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha)-induced cell adhesion to human endothelial cells is under dominant control of one TNF receptor type, TNF-R55. *J Exp Med* 1993.177:1277-86.

MacMicking J, QW Xie, and C Nathan. Nitric oxide and macrophage function. *Annu Rev Immunol* 1997.15:323-50.

Makristathis A, F Stauffer, SM Feistauer, and A Georgopoulos. Bacteria induce release of platelet-activating factor (PAF) from polymorphonuclear neutrophil granulocytes: possible role for PAF in pathogenesis of experimentally induced bacterial pneumonia. *Infect Immun* 1993.61:1996-2002.

Marie C, C Pitton, C Fitting, and JM Cavillon. Regulation by anti-inflammatory cytokines (IL-4, IL-10, IL-13, TGFbeta) of interleukin-8 production by LPS- and/ or TNFalpha-activated human polymorphonuclear cells. *Mediators Inflamm* 1996.5:334-40.

Matsukawa A, CM Hogaboam, NW Lukacs, PM Lincoln, RM Strieter, and SL Kunkel. 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* 1999.163:6148-54.

Matsumoto K, F Taki, Y Kondoh, H Taniguchi, and K Takagi. Platelet-activating factor in bronchoalveolar lavage fluid of patients with adult respiratory distress syndrome. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1992.19:509-15.

Mccall TB, Boughton-Smith NK, Palmer RMJ, Whittle BJR, and Moncada S. Synthesis of nitric oxide from L-arginine by neutrophils. *Biochem J* 1989. 261: 293-296.

Micheau O, and J Tschopp. Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell* 2003.114:181-90.

Miller MJ. 1983. *Pathophysiology: Principles of Disease*. . Hardcover. 506 pp.

Mishra BB, UM Gundra, and JM Teale. Expression and distribution of Toll-like receptors 11-13 in the brain during murine neurocysticercosis. *J Neuroinflammation* 2008.5:53.

Miyoshi T, K Yamashita, T Arai, K Yamamoto, K Mizugishi, and T Uchiyama. The role of endothelial interleukin-8/NADPH oxidase 1 axis in sepsis 2010. *Immunology*.

Moreno SE, JC Alves-Filho, TM Alfaya, JS da Silva, SH Ferreira, and FY Liew. IL-12, but not IL-18, is critical to neutrophil activation and resistance to polymicrobial sepsis induced by cecal ligation and puncture. *J Immunol* 2006.177:3218-24.

Mundel P, Bachmann S, Bader M, Fischer A, Kummer W, Mayer B, and W Kriz. Expression of nitric oxide synthase in kidney macula densa cells. *Kidney Int* 1992. 42:1017-1019.

Nakos G, El Kitsioui, I Tsangaris, and ME Lekka. Bronchoalveolar lavage fluid characteristics of early intermediate and late phases of ARDS. Alterations in leukocytes, proteins, PAF and surfactant components. *Intensive Care Med* 1998.24:296-303.

Nussler AK, TR Billiar, ZZ Liu, and SM Morris, Jr. Coinduction of nitric oxide synthase and argininosuccinate synthetase in a murine macrophage cell line. Implications for regulation of nitric oxide production. *J Biol Chem* 1994.269:1257-61.

Ohashi K, V Burkart, S Flohe, and H Kolb. Cutting edge: heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the toll-like receptor-4 complex. *J Immunol* 2000.164:558-61.

Okamura Y, M Watari, ES Jerud, DW Young, ST Ishizaka, J Rose, JC Chow, and JF Strauss, 3rd. The extra domain A of fibronectin activates Toll-like receptor 4. *J Biol Chem* 2001.276:10229-33.

Okuma T, Y Terasaki, N Sakashita, K Kaikita, H Kobayashi, T Hayasaki, WA Kuziel, H Baba, and M Takeya. MCP-1/CCR2 signalling pathway regulates hyperoxia-induced acute lung injury via nitric oxide production. *Int J Exp Pathol* 2006.87:475-83.

Old LJ. Tumor necrosis factor (TNF). *Science* 1985.230:630-2.

Opal S, PF Laterre, E Abraham, B Francois, X Wittebole, S Lowry, JF Dhainaut, B Warren, T Dugernier, A Lopez, M Sanchez, I Demeyer, L Jauregui, JA Lorente, W McGee, K Reinhart, S Kljucar, S Souza, and J Pribble. Recombinant human platelet-activating factor acetylhydrolase for treatment of severe sepsis: results of a phase III, multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled, clinical trial. *Crit Care Med* 2004.32:332-41.

Opitz B, J Eitel, K Meixenberger, and N Suttorp. Role of Toll-like receptors, NOD-like receptors and RIG-I-like receptors in endothelial cells and systemic infections. *Thromb Haemost* 2009.102:1103-9.

Oshimoto H, S Okamura, T Iida, T Ishikawa, K Hosaka, and M Mori. Diagnostic value of the serum platelet-activating factor acetylhydrolase activity in inflammatory bowel disease. *Tohoku J Exp Med* 2005.207:65-71.

Palmer RM, and Moncada S. A novel citrulline-forming enzyme implicated in the formation of nitric oxide by vascular endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res Commun* 1989. 158:348–352.

Pichlmair A, O Schulz, CP Tan, TI Naslund, P Liljestrom, F Weber, and C Reis e Sousa. RIG-I-mediated antiviral responses to single-stranded RNA bearing 5'-phosphates. *Science* 2006.314:997-1001.

Pinheiro da Silva F, and V Nizet. Cell death during sepsis: integration of disintegration in the inflammatory response to overwhelming infection. *Apoptosis* 2009.14:509-21.

Pinsky MR, JL Vincent, J Deviere, M Alegre, RJ Kahn, and E Dupont. Serum cytokine levels in human septic shock. Relation to multiple-system organ failure and mortality. *Chest* 1993.103:565-75.

Prescott SM, GA Zimmerman, DM Stafforini, and TM McIntyre. Platelet-activating factor and related lipid mediators. *Annu Rev Biochem* 2000.69:419-45.

Pugin J, CC Schurer-Maly, D Leturcq, A Moriarty, RJ Ulevitch, and PS Tobias. Lipopolysaccharide activation of human endothelial and epithelial cells is mediated by lipopolysaccharide-binding protein and soluble CD14. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993.90:2744-8.

Qiu G, C Wang, R Smith, K Harrison, and K Yin. Role of IFN-gamma in bacterial containment in a model of intra-abdominal sepsis. *Shock* 2001.16:425-9.

Ramnath RD, SW Ng, A Guglielmotti, and M Bhatia. Role of MCP-1 in endotoxemia and sepsis. *Int Immunopharmacol* 2008.8:810-8.

Rang H, M Dale, J Ritter, and R Flower. 2007. RANG & DALE'S PHARMACOLOGY. CHURCHILL LIVINGSTONE. 844 pp.

Remick DG, DE Newcomb, GL Bolgos, and DR Call. Comparison of the mortality and inflammatory response of two models of sepsis: lipopolysaccharide vs. cecal ligation and puncture. *Shock* 2000.13:110-6.

Richter C, Ghafourifar P, Schweizer M, and R Lafranchi. Nitric oxide and mitochondrial Ca²⁺. *Biochem Soc Trans* 1997. 25(3):914-8.

Riedemann NC, RF Guo, and PA Ward. A key role of C5a/C5aR activation for the development of sepsis. *J Leukoc Biol* 2003a.74:966-70.

Riedemann NC, TA Neff, RF Guo, KD Bernacki, IJ Laudes, JV Sarma, JD Lambris, and PA Ward. Protective effects of IL-6 blockade in sepsis are linked to reduced C5a receptor expression. *J Immunol* 2003b.170:503-7.

Rios-Santos F, CF Benjamim, D Zavery, SH Ferreira, and Q Cunha Fde. A critical role of leukotriene B₄ in neutrophil migration to infectious focus in cecal ligation and puncture sepsis. *Shock* 2003.19:61-5.

Rittirsch D, MA Flierl, and PA Ward. Harmful molecular mechanisms in sepsis. *Nat Rev Immunol* 2008.8:776-87.

Roger T, J David, MP Glauser, and T Calandra. MIF regulates innate immune responses through modulation of Toll-like receptor 4. *Nature* 2001a.414:920-4.

Roger T, MP Glauser, and T Calandra. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) modulates innate immune responses induced by endotoxin and Gram-negative bacteria. *J Endotoxin Res* 2001b.7:456-60.

Rosenfeld S, and D Dressler. Transfer factor: a subcellular component that transmits information for specific immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1974.71:2473-7.

Rudiger A, M Stotz, and M Singer. Cellular processes in sepsis. *Swiss Med Wkly* 2008.138:629-34.

Sales Júnior JAL, David CM, Hatum R, Souza PCSP, Japiassú A, Pinheiro CTS, Friedman G, Silva OB, Dias MD, Koterba E, FS Dias, and C. Piras. Grupo de estudo de Sepse do Fundo AMIB, Luiz, R.R . An Epidemiological Study of Sepsis in Intensive Care Units. Sepsis Brazil Study. *Revista Brasileira Terapia Intensiva*. 2006.18:9-17.

Salgado Junior W, JS Santos, and Q Cunha Fde. Development of a lethal model of peritonitis for assessment of laparoscopic and laparotomic treatments in rats. *Acta Cir Bras* 2007.22:39-42.

Salomao R, PS Martins, MK Brunialti, L Fernandes Mda, LS Martos, ME Mendes, NE Gomes, and O Rigato. TLR signaling pathway in patients with sepsis. *Shock* 2008.30 Suppl 1:73-7.

Samanta U, and BJ Bahnson. Crystal structure of human plasma platelet-activating factor acetylhydrolase: structural implication to lipoprotein binding and catalysis. *J Biol Chem* 2008.283:31617-24.

Sato M, H Sano, D Iwaki, K Kudo, M Konishi, H Takahashi, T Takahashi, H Imaizumi, Y Asai, and Y Kuroki. Direct binding of Toll-like receptor 2 to zymosan, and zymosan-induced NF-kappa B activation and TNF-alpha secretion are down-regulated by lung collectin surfactant protein A. *J Immunol* 2003.171:417-25.

Schuster DP, M Metzler, S Opal, S Lowry, R Balk, E Abraham, H Levy, G Slotman, E Coyne, S Souza, and J Pribble. Recombinant platelet-activating factor acetylhydrolase to prevent acute respiratory distress syndrome and mortality in severe sepsis: Phase IIb, multicenter, randomized, placebo-controlled, clinical trial. *Crit Care Med* 2003.31:1612-9.

Schwandner R, R Dziarski, H Wesche, M Rothe, and CJ Kirschning. Peptidoglycan- and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by toll-like receptor 2. *J Biol Chem* 1999.274:17406-9.

Seet RC, CY Lee, EC Lim, JJ Tan, AM Quek, WL Chong, WF Looi, SH Huang, H Wang, YH Chan, and B Halliwell. Oxidative damage in Parkinson disease: Measurement using accurate biomarkers. *Free Radic Biol Med* 2010.48:560-6.

Seki S, Habu, Y., Kawamura, T., Takeda, K., Dobashi, H., Ohkawa, T., Hiraide, H. The liver as a crucial organ in the first line of host defense: the roles of Kupffer cells, natural killer (NK) cells and NK1.1 Ag+ T cells in T helper 1 immune responses. *Immunol. Rev.* 2000.174:35-46.

Seo HS, JH Kim, and MH Nahm. Platelet-activating factor-acetylhydrolase can monodeacylate and inactivate lipoteichoic acid. *Clin Vaccine Immunol* 2006.13:452-8.

Silva E, A Pedro Mde, AC Sogayar, T Mohovic, CL Silva, M Janiszewski, RG Cal, EF de Sousa, TP Abe, J de Andrade, JD de Matos, E Rezende, M Assuncao, A Avezum, PC Rocha, GF de Matos, AM Bento, AD Correa, PC Vieira, and E Knobel. Brazilian Sepsis Epidemiological Study (BASES study). *Crit Care* 2004.8:R251-60.

Smiley ST, JA King, and WW Hancock. Fibrinogen stimulates macrophage chemokine secretion through toll-like receptor 4. *J Immunol* 2001.167:2887-94.

Sorensen J, B Kald, C Tagesson, and M Lindahl. Platelet-activating factor and phospholipase A2 in patients with septic shock and trauma. *Intensive Care Med* 1994.20:555-61.

Speyer CL, H Gao, NJ Rancilio, TA Neff, GB Huffnagle, JV Sarma, and PA Ward. Novel chemokine responsiveness and mobilization of neutrophils during sepsis. *Am J Pathol* 2004.165:2187-96.

Tanaka H, K Ishikawa, M Nishino, T Shimazu, and T Yoshioka. Changes in granulocyte colony-stimulating factor concentration in patients with trauma and sepsis. *J Trauma* 1996.40:718-25; discussion 725-6.

Termeer C, F Benedix, J Sleeman, C Fieber, U Voith, T Ahrens, K Miyake, M Freudenberg, C Galanos, and JC Simon. Oligosaccharides of Hyaluronan activate dendritic cells via toll-like receptor 4. *J Exp Med* 2002.195:99-111.

Thomas L. Germs. *N Engl J Med* 1972.287:553-5.

Tjoelker LW, C Wilder, C Eberhardt, DM Stafforini, G Dietsch, B Schimpf, S Hooper, H Le Trong, LS Cousens, GA Zimmerman, and et al. Anti-inflammatory properties of a platelet-activating factor acetylhydrolase. *Nature* 1995.374:549-53.

Tojo A, Gross SS, Zhang L, Tisher CC, Schmidt HHHW, Wilcox CS, Madsen KM. Immunocytochemical localisation of distinct isoforms of nitric oxide synthase in the juxtaglomerular apparatus of normal rat kidney. *J Am Soc Nephrol* 1994. 4:1438-1447.

Tsao PS, B Wang, R Buitrago, JY Shyy, and JP Cooke. Nitric oxide regulates monocyte chemotactic protein-1. *Circulation* 1997.96:934-40.

Tselepis AD, M Elisaf, S Besis, SA Karabina, MJ Chapman, and A Siamopoulou. Association of the inflammatory state in active juvenile rheumatoid arthritis with hypo-high-density lipoproteinemia and reduced lipoprotein-associated platelet-activating factor acetylhydrolase activity. *Arthritis Rheum* 1999.42:373-83.

Tsujimoto H, S Ono, T Majima, N Kawarabayashi, E Takayama, M Kinoshita, S Seki, H Hiraide, LL Moldawer, and H Mochizuki. Neutrophil elastase, MIP-2, and TLR-4 expression during human and experimental sepsis. *Shock* 2005.23:39-44.

Ueno T, T Ikeda, K Ikeda, H Taniuchi, S Suda, MY Yeung, and N Matsuno. HMGB-1 as a Useful Prognostic Biomarker in Sepsis-Induced Organ Failure in Patients Undergoing PMX-DHP. *J Surg Res* 2009.

Utgaard JO, FL Jahnsen, A Bakka, P Brandtzaeg, and G Haraldsen. Rapid secretion of prestored interleukin 8 from Weibel-Palade bodies of microvascular endothelial cells. *J Exp Med* 1998.188:1751-6.

Vabulas RM, P Ahmad-Nejad, C da Costa, T Miethke, CJ Kirschning, H Hacker, and H Wagner. Endocytosed HSP60s use toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 to activate the toll/interleukin-1 receptor signaling pathway in innate immune cells. *J Biol Chem* 2001.276:31332-9.

van Zoelen MA, H Yang, S Florquin, JC Meijers, S Akira, B Arnold, PP Nawroth, A Bierhaus, KJ Tracey, and T van der Poll. Role of toll-like receptors 2 and 4, and the receptor for advanced glycation end products in high-mobility group box 1-induced inflammation in vivo. *Shock* 2009.31:280-4.

Vermont CL, JA Hazelzet, ED de Kleijn, GP van den Dobbelsteen, and R de Groot. CC and CXC chemokine levels in children with meningococcal sepsis accurately predict mortality and disease severity. *Crit Care* 2006.10:R33.

Wajant H, K Pfizenmaier, and P Scheurich. Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ* 2003.10:45-65.

Wang H, H Yang, and KJ Tracey. Extracellular role of HMGB1 in inflammation and sepsis. *J Intern Med* 2004.255:320-31.

West AP, AA Koblansky, and S Ghosh. Recognition and signaling by toll-like receptors. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2006.22:409-37.

Wichterman KA, AE Baue, and IH Chaudry. Sepsis and septic shock--a review of laboratory models and a proposal. *J Surg Res* 1980.29:189-201.

Williams DL, T Ha, C Li, JH Kalbfleisch, J Schweitzer, W Vogt, and IW Browder. Modulation of tissue Toll-like receptor 2 and 4 during the early phases of polymicrobial sepsis correlates with mortality. *Crit Care Med* 2003.31:1808-18.

Winter C, W Herbold, R Maus, F Langer, DE Briles, JC Paton, T Welte, and UA Maus. Important role for CC chemokine ligand 2-dependent lung mononuclear phagocyte recruitment to inhibit sepsis in mice infected with *Streptococcus pneumoniae*. *J Immunol* 2009.182:4931-7.

Wrann CD, NA Tabriz, T Barkhausen, A Klos, M van Griensven, HC Pape, DO Kendoff, R Guo, PA Ward, C Krettek, and NC Riedemann. The phosphatidylinositol 3-kinase signaling pathway exerts protective effects during sepsis by controlling C5a-mediated activation of innate immune functions. *J Immunol* 2007.178:5940-8.

Wright SD, RA Ramos, PS Tobias, RJ Ulevitch, and JC Mathison. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science* 1990.249:1431-3.

Yamaguchi T, Y Hirakata, K Izumikawa, Y Miyazaki, S Maesaki, K Tomono, Y Yamada, S Kohno, and S Kamihira. Prolonged survival of mice with *Pseudomonas aeruginosa*-induced sepsis by rIL-12 modulation of IL-10 and interferon-gamma. *J Med Microbiol* 2000.49:701-7.

Yang BC, P Mehta, and JL Mehta. Nitric Oxide Synthesis Inhibition and Role of P-selectin in Leukocyte Adhesion to Vascular Tissues. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 1997.2:107-114.

Yoneyama M, and T Fujita. [RIG-I: critical regulator for virus-induced innate immunity]. *Tanpakushitsu Kakusan Koso* 2004.49:2571-8.

Young HA. Regulation of interferon-gamma gene expression. *J Interferon Cytokine Res* 1996.16:563-8.

Zaitseva LG, M Vaisburd, V Shebzukhov lu, and EB Mysiakin. [The role of platelet activating factor in regulation of the phagocytic function of macrophages from different organs]. *Biull Eksp Biol Med* 1998.125:315-8.

Zeiber AM, B Fisslthaler, B Schray-Utz, and R Busse. Nitric oxide modulates the expression of monocyte chemoattractant protein 1 in cultured human endothelial cells. *Circ Res* 1995.76:980-6.

Zhang D, G Zhang, MS Hayden, MB Greenblatt, C Bussey, RA Flavell, and S Ghosh. A toll-like receptor that prevents infection by uropathogenic bacteria. *Science* 2004.303:1522-6.

Zimmerman G, Prescott, S., McIntyre, T. . Platelet-activating factor: A fluid-phase and cell-associated mediator of inflammation. *Inflammation. Basic Principles and Clinical Correlates*. Raven Press 1992.2:289-304.

Zivot JB, and WD Hoffman. Pathogenic effects of endotoxin. *New Horiz* 1995.3:267-75.

