

Regina de Sordi

**PAPEL DUAL DA LIPOXINA A₄ NAS ALTERAÇÕES
INFLAMATÓRIAS E CARDIOVASCULARES NA SEPSE**

Tese defendida no Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Doutor em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Jamil Assreuy

Co-orientador: Dr. Octávio Menezes de Lima Jr

Florianópolis

2013

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Sordi, Regina de
Papel dual da Lipoxina A4 nas alterações inflamatórias e
cardiovasculares na sepse / Regina de Sordi ; orientador,
Jamil Assreuy ; co-orientador, Octávio Menezes de Lima
Júnior. - Florianópolis, SC, 2013.
149 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-
Graduação em Farmacologia.

Inclui referências

1. Farmacologia. 2. resolução da inflamação. 3.
lipoxinas. 4. sepse. 5. infecção. I. Assreuy, Jamil. II.
Menezes de Lima Júnior, Octávio. III. Universidade Federal
de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em
Farmacologia. IV. Título.

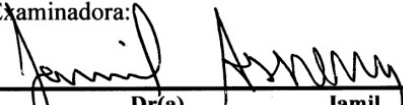
“PAPEL DUAL DA LIPOXINA A4 NAS ALTERAÇÕES INFLAMATÓRIAS E CARDIOVASCULARES NA SEPSE”

por

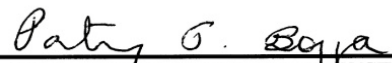
Regina De Sordi

Tese julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (Port. 11/PPGFMC/2013) do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia - UFSC, composta pelos Professores Doutores:

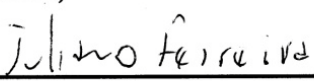
Banca Examinadora:



Prof(a). Dr(a). Jamil Assreuy
(Presidente/Orientador/FMC/CCB/UFSC)



Prof(a). Dr(a). Patricia Torres Bozza (INSTITUTO OSVALDO
CRUZ – FIOCRUZ)



Prof(a). Dr(a). Juliano Ferreira (BQC/UFMS)



Prof(a). Dr(a). Adair Roberto Soares Dos Santos (CFS/CCB/UFSC)



Prof(a). Dr(a). Giles A. Rae (FMC/CCB/UFSC)

Prof(a). Dr(a). Thereza Christina Monteiro De Lima
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia

Florianópolis, 22 de março de 2013.

*Aos meus pais, Aparecido e Teresa,
pelo amor incondicional.*

*Ao meu marido, Daniel Fernandes,
pela paciência e companheirismo.*

*A todos aqueles que, apesar dos
fracassos, nunca desistem.*

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Jamil Assreuy, pela ótima orientação, pela amizade, apoio e incentivo constantes, e principalmente pelos bons exemplos de caráter, competência e dedicação que são motivos de inspiração para minha vida profissional e pessoal. Foi um imenso prazer trabalhar todos esses anos ao seu lado!

Ao Dr. Octávio Menezes de Lima Jr, pela excelente co-orientação, pelas boas ideias, pelas valiosas discussões e pela participação indispensável nesse trabalho.

Ao meu marido e eterno amigo, Daniel Fernandes, pelo apoio incondicional, por me ajudar a ser uma pessoa melhor a cada dia, por tornar meus dias mais doces e serenos, e por sempre me mostrar o lado positivo de tudo. Agradeço também a compreensão e paciência por todos esses anos de distância para que eu pudesse realizar esse trabalho com tranquilidade. Você é e sempre será a melhor parte dos meus dias.

Aos meus pais, Aparecido Evaldo de Sordi e Teresa Kirie de Sordi pelo apoio, carinho e por me sempre me incentivarem a correr atrás dos meus sonhos, mesmo que isso significasse conviver com a minha ausência em muitos momentos. Amo muito vocês.

A toda minha família por sempre terem participado da minha vida de maneira muito especial.

Aos Professores Dr. João Batista Calixto, Dr. André Báfica, Dr. José Eduardo da Silva-Santos e Dra. Áurea E. Linder pelo empréstimo de equipamentos e reagentes utilizados em alguns experimentos.

Ao Prof. Dr. Fernando de Queiroz Cunha e a M.Sc. Paula Czaikoski pela doação da bactéria utilizada nos experimentos e pelo auxílio inicial na padronização do modelo experimental de pneumosepse.

Aos Professores Dra. Patrícia T. Bozza, Dr. Giles Alexander Rae, Dr. Juliano Ferreira e Dr. Adair R. Soares dos Santos por terem participado da minha banca de doutorado e pelos valiosos questionamentos.

Às minhas amigas Ângela Cristina Bet e Letícia Kramer Pacheco pela amizade sincera que nasceu dentro do laboratório e que se fortaleceu fora dele. Pela parceria, incentivo e principalmente pelas “terapias” quase semanais que me proporcionaram momentos de muita descontração e alegria durante todos esses anos.

À Adriane Madeira, pelo apoio técnico, pela amizade de tantos anos, pelo carinho, pelo exemplo de bom humor e pelos sorrisos diários.

À Karin Scheschowitsch pela amizade, parceria e pelo valioso e indispensável auxílio em várias etapas deste processo.

À Verônica Horewicz pelo auxílio nos experimentos de citometria de fluxo e pela leitura cuidadosa deste trabalho.

Ao Gustavo C. Ramos pelas valiosas dicas e auxílio nos experimentos iniciais de histologia.

À Ana Maria Favero pela amizade e pela leitura deste trabalho.

Às alunas de iniciação científica Ana Maria Della Justina, Laís Fernanda Santos e Kamila Voges pelo auxílio em muitas etapas deste processo e pelo enorme aprendizado que me proporcionaram, e ao Edir Rezende pelo auxílio nos experimentos de pressão arterial.

Aos demais colegas (atuais e antigos) do Laboratório do Óxido Nítrico pelo aprendizado constante.

Aos funcionários do Departamento de Farmacologia, especialmente ao Pedro Paulo de Souza e ao Rafael Marcos Fernandes.

A todos os funcionários do LAMEB, especialmente à Chirle Ferreira, Bibiana Sgorla de Almeida e Demétrio Gomes Alves.

A todos os professores e colegas do Departamento de Farmacologia.

Ao apoio financeiro da CAPES e do CNPq.

*“Se você quiser ser bem-sucedido,
duplique sua taxa de fracassos.”*

Thomas Watson

RESUMO

A pneumonia é uma das principais causas de sepse, que por sua vez é a maior causa de morte nas Unidades de Terapia Intensiva, mesmo com os recentes avanços da medicina. O estudo da sepse e de novas alternativas terapêuticas permanecem um desafio devido à complexidade desta síndrome, cujo principal componente é uma resposta inflamatória desordenada. A lipoxina A₄ (LXA₄) é um mediador lipídico endógeno com potentes ações anti-inflamatórias e pró-resolutivas, entretanto seu papel em processos infecciosos como a sepse ainda não é bem entendido. Portanto, o objetivo do presente trabalho foi avançar no entendimento do papel da LXA₄ e do seu receptor FPR2/ALX na resposta inflamatória desordenada que ocorre no modelo de sepse induzida por pneumonia. Para isso, a sepse foi induzida em camundongos *Swiss* machos pela inoculação intratraqueal de *Klebsiella pneumoniae*. Os parâmetros inflamatórios e cardiovasculares foram avaliados 6, 24 e 48 h após a infecção. Os resultados mostram que a severidade da infecção e a mortalidade dos animais se correlacionam com a quantidade de bactéria inoculada. Os animais sépticos apresentaram alterações histopatológicas nos pulmões, exibiram aumento do número de células no lavado bronco-alveolar e dos níveis das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-1 β local e sistemicamente, desenvolveram leucopenia, além de hipotensão e hiporreatividade a agentes vasoconstritores. Além do pulmão, foram encontradas bactérias no baço e coração dos animais, indicando disseminação da infecção. Interessantemente, houve aumento da expressão da NOS-2 em tempos mais tardios, enquanto que os níveis da NOS-1 e NOS-3 permaneceram inalterados. A maior expressão da NOS-2 coincidiu com uma grande produção de NO no foco infeccioso e no plasma, avaliado pela mensuração de nitrito + nitrato. A sepse também induziu aumento precoce da concentração de LXA₄ no foco infeccioso e da expressão do seu receptor FPR2/ALX nos pulmões. O tratamento com o antagonista do receptor FPR2/ALX, BOC-1, no início da sepse aumentou a migração de leucócitos para o foco, reduziu o processo infeccioso local

e a sua disseminação, e aumentou a sobrevida dos animais. Por outro lado, nos animais tratados com a LXA₄ ou com o seu análogo BML-111 no início da sepse, houve redução da migração de células para o foco e agravamento do processo infeccioso. Em momentos mais avançados da sepse, o tratamento dos camundongos com BOC-1 não teve efeito na sobrevida. Entretanto, o tratamento tardio com a LXA₄ e o BML-111 aumentou a sobrevida por reduzir a resposta inflamatória excessiva. Esse estudo mostra que a infecção pulmonar induzida pela *K. pneumoniae* é um modelo animal de sepse clinicamente relevante que induz uma resposta inflamatória sistêmica e provoca alterações cardiovasculares que persistem por pelo menos 48 h. Nossos achados mostram que os níveis de LXA₄ e do seu receptor FPR2/ALX estavam aumentados no início da sepse contribuindo para a resposta inflamatória desordenada que ocorre nessa patologia. Além disso, nossos dados mostram que a LXA₄ tem um papel duplo na sepse, e seu efeito benéfico ou maléfico é tempo-dependente. Portanto, uma interferência apropriada na via LXA₄-FPR2/ALX pode constituir uma nova estratégia terapêutica no auxílio do tratamento da sepse.

Palavras-chave: sepse; pneumonia; Lipoxina A₄; FPR2/ALX; *Klebsiella pneumoniae*.

ABSTRACT

Pneumonia is one of the major causes of sepsis, which, in turn, is the main cause of death in intensive care units, in spite of recent medical advances. The study of sepsis and new therapeutic alternatives remains challenging due to the complexity of this syndrome, whose main component is a dysregulated inflammatory response. Lipoxin A₄ (LXA₄) is an endogenous lipid mediator with potent anti-inflammatory and pro-resolution actions but its role in infectious processes like sepsis is not well understood. Thus, the aim of the present work was to provide a better comprehension of the role of LXA₄ and its receptor FPR2/ALX in the inflammatory dysregulation that occurs in pneumonia-induced sepsis model. Pneumosepsis was induced in Swiss male mice by *Klebsiella pneumoniae* intratracheal inoculation. Inflammatory and cardiovascular parameters were evaluated 6, 24 and 48 h after the insult. The results show that severity of infection and the mortality correlated with the amount of bacteria. Septic animals presented pathological changes in lungs, increase in cell number in the bronchoalveolar lavage, leukopenia, increase in TNF- α and IL-1 β levels, hypotension and hyporesponsiveness to vasoconstrictors, the two latter characteristics of severe sepsis and septic shock. Significant numbers of bacteria in spleen and heart homogenates indicated infection spreading. Interestingly, NOS-2 expression appeared late after bacteria inoculation, whereas levels of NOS-1 and NOS-3 were unchanged. The high NOS-2 expression coincided with an exacerbated NO production in the infection focus and in plasma, as judging by nitrate + nitrite levels. Sepsis also induced an early increase in LXA₄ levels and an augment in its receptor FPR2/ALX expression in lungs. Treatment in early sepsis with the antagonist of FPR2/ALX, BOC-1, increased leukocyte migration to the focus, reduced bacterial load and dissemination and improved survival. On the other hand, animals treated with LXA₄ itself or the analog BML-111 in early sepsis exhibited a decrease in cell migration to the focus and an infection worsening. In late sepsis, treatment of mice with BOC-1 had no effect, but LXA₄ and BML-111

improved the survival rate by reducing the excessive inflammatory response. This study shows that *K. pneumoniae*-induced lung infection is a clinically relevant animal model of sepsis inducing a systemic inflammatory response and cardiovascular alterations which endures at least until 48 h. Our findings demonstrate that LXA₄ and its receptor FPR2/ALX levels were increased in the early phase of sepsis, contributing to the characteristic inflammatory dysregulation that occurs in this pathology. In addition, our data show that LXA₄ has a dual role in sepsis and that its beneficial or harmful effects are critically dependent on the time. Therefore, a proper interference with LXA₄ system may open a new therapeutic avenue to treat sepsis.

Keywords: sepsis; pneumonia; Lipoxin A₄; FPR2/ALX; *Klebsiella pneumoniae*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Curva de sobrevida após a inoculação de <i>Klebsiella pneumoniae</i> em camundongos..	73
Figura 2: Avaliação do peso corporal após a inoculação de <i>Klebsiella pneumoniae</i> em camundongos..	74
Figura 3: Histologia e escore patológico dos pulmões de camundongos inoculados com <i>Klebsiella pneumoniae</i> .	76
Figura 4: Avaliação das células do lavado bronco-alveolar de camundongos inoculados com <i>K. pneumoniae</i> .	77
Figura 5: Leucócitos sanguíneos de camundongos inoculados com <i>K. pneumoniae</i> .	78
Figura 6: Atividade da enzima mieloperoxidase nos pulmões de camundongos inoculados com <i>K. pneumoniae</i> .	79
Figura 7: Quantificação de bactérias nos camundongos inoculados com <i>K. pneumoniae</i> .	81
Figura 8: Dosagem de citocinas pró e anti-inflamatórias no BAL e no plasma de camundongos inoculados com <i>K. pneumoniae</i> .	83
Figura 9: Avaliação da expressão das enzimas NOS-1, NOS-2 e NOS-3 em camundongos inoculados com <i>K. pneumoniae</i> .	85
Figura 10: Dosagem de nitrito + nitrato (NOx) no BAL e no plasma de camundongos inoculados com <i>K. pneumoniae</i> .	86
Figura 11: Avaliação de parâmetros cardiovasculares após a inoculação de <i>Klebsiella pneumoniae</i> em camundongos..	88
Figura 12: Dosagem de marcadores de danos de órgãos em camundongos inoculados com <i>K. pneumoniae</i> .	90
Figura 13: Quantificação da produção endógena de LXA ₄ em camundongos inoculados com <i>K. pneumoniae</i> .	92
Figura 14: Imunofluorescência para FPR2/ALX em tecido pulmonar de camundongos inoculados com <i>K. pneumoniae</i> .	93
Figura 15: Citometria de fluxo das células de BAL de camundongos inoculados com <i>K. pneumoniae</i> .	96
Figura 16: Expressão do receptor FPR2/ALX em macrófagos do BAL de camundongos inoculados com <i>K. pneumoniae</i> .	97

Figura 17: Expressão do receptor FPR2/ALX em células mieloides imaturas do BAL de camundongos inoculados com *K. pneumoniae*.... 98

Figura 18: Expressão do receptor FPR2/ALX em neutrófilos do BAL de camundongos inoculados com *K. pneumoniae*..... 99

Figura 19: Efeito da Lipoxina A₄, agonista do receptor FPR2/ALX, na migração de células para o foco infeccioso..... 101

Figura 20: Efeito do agonista do receptor FPR2/ALX (BML-111) na migração de células para o foco infeccioso..... 102

Figura 21: Efeito do antagonista do receptor FPR2/ALX (BOC-1) na migração de células para o foco infeccioso..... 103

Figura 22: Efeito dos inibidores da 15-Lipoxigenase (PD146176) e da 5-LOX (BWA4C) na migração de células para o foco infeccioso. 104

Figura 23: Efeito de agonistas e antagonista do receptor FPR2/ALX no processo infeccioso de camundongos inoculados com *K. pneumoniae*. 106

Figura 24: Efeito do antagonista do receptor FPR2/ALX (BOC-1) nas alterações cardiovasculares que ocorrem na sepse induzida por pneumonia..... 108

Figura 25: Efeito do tratamento precoce e tardio com agonista e antagonista do receptor FPR2/ALX na sobrevivência de camundongos após a inoculação de *Klebsiella pneumoniae*..... 110

Figura 26: Efeito do tratamento tardio com LXA₄ na produção de citocinas em camundongos inoculados com *K. pneumoniae*..... 112

Figura 27: Efeito do tratamento tardio com LXA₄ na disfunção orgânica de camundongos inoculados com *K. pneumoniae*..... 113

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Semelhanças entre as ações da LXA ₄ e alguns eventos da sepsis.....	51
Tabela 2: Escores utilizados para avaliação de dano microscópico.	58
Tabela 3: Imunomarcadores utilizados no ensaio de citometria de fluxo	65
Tabela 4: Classificação das células do BAL de acordo com seus marcadores	66

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1: Relação entre SIRS, sepse, sepse severa e choque séptico.	28
Esquema 2: Principais causas de sepse.	29
Esquema 3: Relação entre SIRS, CARS e MARS..	33
Esquema 4: Mediadores da resposta inflamatória e do processo de resolução.	38
Esquema 5: Biossíntese de lipoxinas nas mucosas e vasos sanguíneos.	41
Esquema 6: Principais vias de biossíntese de lipoxinas..	43
Esquema 7: Algumas ações das lipoxinas.	47
Esquema 8: Células “ <i>ring-like</i> ”.....	36
Esquema 9: Estratégia de “gate” utilizada nos ensaios de citometria de fluxo.	67
Esquema 10: Protocolo experimental 1.....	68
Esquema 11: Protocolo experimental 2.....	69
Esquema 12: Protocolo experimental 3.....	69
Esquema 13: Protocolo experimental 4.....	70
Esquema 14: Protocolo experimental 5.....	71
Esquema 15: Papel da LXA ₄ no início da sepse.....	128
Esquema 16: Duplo papel da LXA ₄ em diferentes tempos da sepse....	131

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	-	Ácido araquidônico
AhR	-	Receptor de aril-hidrocarboneto
AP-1	-	Proteína ativadora 1
ATCC	-	American Type Culture Collection
ATL	-	Lipoxina produzida pela aspirina
BAL	-	Lavado bronco-alveolar
BHI	-	Caldo de infusão de cérebro e coração
BOC	-	Peptídeos N-tert-butiloxi-carbonil
bpm	-	Batimentos por minuto
CARS	-	Resposta anti-inflamatória compensatória
CEUA	-	Comitê de ética para uso de animais
CLP	-	Ligadura e perfuração do ceco
CONCEA	-	Conselho nacional de controle de experimentação animal
COX	-	Ciclooxigenase
D.O.	-	Densidade óptica
EDHF	-	Fator hiperpolarizante derivado do endotélio
ELISA	-	Ensaio imunoenzimático
FPR	-	Receptor de peptídeos formilados
FPR2/ALX	-	Receptor da Lipoxina
HE	-	Hematoxilina e eosina
HETE	-	Ácido hidroxicicosatetraenoico
HO	-	Heme-oxigenase
HPETE	-	Ácido hidroperoxieicosatetraenoico
i.p.	-	Intraperitoneal
i.t.	-	Intratraqueal
i.v.	-	Intravenoso
IL	-	Interleucina
IRAK	-	Quinase associada ao receptor de IL-1
IκB	-	Proteína inibitória do NF-κB
K+	-	Íon Potássio
LBP	-	Proteína ligadora de LPS
Log	-	Logaritmo
LOX	-	Lipoxigenase
LPS	-	Lipopolissacarídeo bacteriano
LT	-	Leucotrieno
LXA₄	-	Lipoxina A ₄

MARS	- Síndrome da resposta antagônica mista
MDSC	- Células mieloides supressoras
MPO	- Mieloperoxidase
mRNA	- RNA mensageiro
MyD88	- Proteína de diferenciação mielóide 88
NF-κB	- Fator nuclear kappa B
NO	- Óxido nítrico
NOD	- Domínio de oligomerização ligado ao nucleotídeo
NOS	- Óxido nítrico sintase
NOx	- Nitrato + Nitrito
ONOO-	- Radical peroxinitrito
PAM	- Pressão arterial média
PAMP	- Padrões moleculares associados aos patógenos
PBS	- Salina tamponada com fosfato
PG	- Prostaglandina
PGI₂	- Prostaciclina
PLA2	- Fosfolipase A2
PMN	- Células polimorfonucleares
ROS	- Espécie reativa de oxigênio
s.c.	- Subcutâneo
SIRS	- Síndrome de resposta inflamatória sistêmica
SOCS	- Fator supressor da sinalização de citocinas
TGO	- Transaminase oxalacética
TGP	- Transaminase pirúvica
TLR	- Receptores de reconhecimento do tipo <i>toll</i>
TMB	- Tetrametilbenzidina
TNF-α	- Fator de necrose tumoral α
TRAF6	- Fator-6 ativado por receptor de TNF
UFC	- Unidades formadoras de colônia
UI	- Unidades Internacionais
UTI	- Unidades de terapia intensiva
UV	- Ultravioleta

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	27
1.1.	Sepse: conceito e epidemiologia.....	27
1.2.	Patogênese da sepsse.....	30
1.3.	Sepsse e células mieloides imaturas.....	34
1.4.	Resolução da inflamação.....	37
1.5.	Biossíntese de Lipoxinas.....	40
1.6.	Receptores das Lipoxinas.....	44
1.7.	Ações das lipoxinas.....	46
1.8.	Lipoxinas, infecção e sepsse.....	49
2.	HIPÓTESE DE TRABALHO	51
3.	OBJETIVOS	52
3.1.	Objetivos gerais.....	52
3.2.	Objetivos específicos.....	52
4.	MATERIAL E MÉTODOS	53
4.1.	Animais.....	53
4.2.	Procedimentos experimentais.....	53
4.2.1.	Modelo experimental de sepsse por pneumonia.....	53
4.2.1.1.	Aumento da patogenicidade e expansão da bactéria.....	53
4.2.1.2.	Quantificação das bactérias.....	54
4.2.1.3.	Inoculação das bactérias nos animais.....	55
4.2.2.	Medida da pressão arterial média (PAM).....	55
4.2.3.	Histologia e escore patológico.....	57
4.2.4.	Obtenção de sangue e de lavado bronco-alveolar.....	58
4.2.5.	Contagem total e diferencial de células.....	59

4.2.6. Medida da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) em pulmão	59
4.2.7. Quantificação de unidades formadoras de colônias (UFC) de bactérias nas amostras biológicas	60
4.2.8. Dosagem de LXA ₄ e de citocinas	60
4.2.9. Dosagens bioquímicas	60
4.2.9.1. Dosagem de nitrato e nitrito (NO _x)	60
4.2.9.2. Dosagem de marcadores de dano de órgãos	61
4.2.10. Imunoeletroforese – Western blotting	61
4.2.10.1. Preparação das amostras	61
4.2.10.2. Separação de proteínas e imunodeteção	62
4.2.11. Imunofluorescência	63
4.2.12. Citometria de fluxo	64
4.3. Protocolos experimentais	68
4.3.1. Padronização do modelo experimental de sepse induzida por pneumonia	68
4.3.2. Participação da LXA ₄ na fisiopatologia da sepse	69
4.3.3. Avaliação da modulação da via LXA ₄ – FPR2/ALX na sepse	70
4.4. Análise estatística	71
4.5. Reagentes	72
5. RESULTADOS	73
5.1. Sobrevida após a inoculação de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	73
5.2. Avaliação do peso corporal	74
5.3. Análise histopatológica dos pulmões e composição do lavado bronco-alveolar	75
5.4. Contagem total e diferencial de leucócitos sanguíneos	78
5.5. Atividade da enzima mieloperoxidase	79

5.6.	Mensuração do processo infeccioso	80
5.7.	Avaliação de citocinas pró e anti-inflamatórias.....	82
5.8.	Avaliação da expressão das enzimas óxido nítrico sintases (NOS) e da produção de óxido nítrico.....	84
5.9.	Avaliação de parâmetros cardiovasculares	87
5.10.	Marcadores de dano de órgãos.....	89
5.11.	Participação da Lipoxina A ₄ no modelo de choque séptico induzido por pneumonia.....	91
5.12.	Avaliação da expressão do receptor FPR2/ALX no tecido pulmonar por imunofluorescência.....	93
5.13.	Avaliação da expressão do FPR2/ALX nas células do BAL por citometria de fluxo	94
5.14.	Efeito do tratamento precoce com agonista e antagonista do receptor FPR2/ALX na migração de células.....	100
5.15.	Efeito do tratamento precoce com agonista e antagonista do receptor FPR2/ALX no processo infeccioso.....	105
5.16.	Efeito do tratamento precoce com o antagonista do FPR2/ALX, BOC-1, nas alterações cardiovasculares	107
5.17.	Efeito do tratamento precoce e tardio com agonista e antagonista do receptor FPR2/ALX na sobrevida dos animais sépticos	109
5.18.	Efeito do tratamento tardio com LXA ₄ na sepse induzida por pneumonia.....	111
6.	DISCUSSÃO	114
7.	CONCLUSÕES	133
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	134

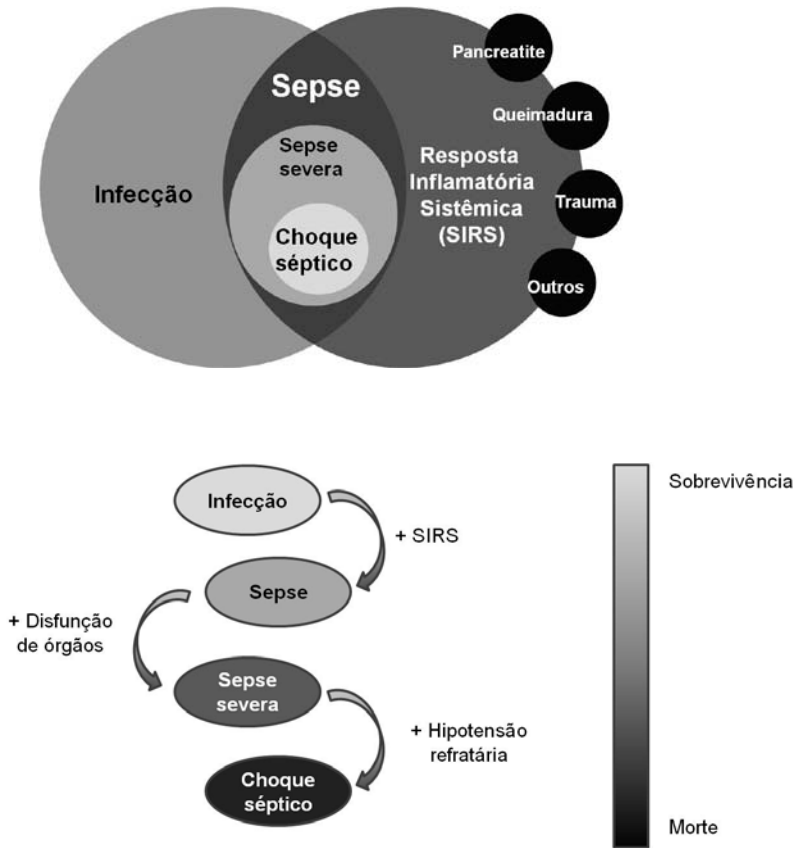
1. INTRODUÇÃO

1.1. Sepses: conceito e epidemiologia

A palavra sepsis deriva do grego e refere-se à “decomposição de matéria orgânica animal ou vegetal na presença de bactérias”. O significado dessa palavra persiste há mais de 2700 anos praticamente com o mesmo sentido (GEROULANOS; DOUKA, 2006). Mesmo com uma longa história, há ainda uma grande dificuldade em se diagnosticar rapidamente um paciente com sepsis, além da falta de tratamento adequado e um mau prognóstico.

A dificuldade do diagnóstico rápido é um grande desafio. A população de pacientes sépticos é bastante heterogênea, já que diferentes estímulos e agentes podem desencadear a sepsis. Por essa característica tão heterogênea, a sepsis não é definida como uma doença, e sim como uma síndrome, o que levou à necessidade de um consenso para melhor definição. Assim, a Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica (SIRS) em humanos é definida quando dois ou mais dos seguintes sintomas clínicos são diagnosticados: temperatura corporal $> 38\text{ }^{\circ}\text{C}$ ou $< 36\text{ }^{\circ}\text{C}$; frequência cardíaca $> 90\text{ bpm}$; frequência respiratória > 20 movimentos/minuto; leucocitose $> 12.000/\text{mm}^3$ ou $< 4.000/\text{mm}^3$ ou ainda, presença de mais de 10% de bastonetes. Quando a SIRS ocorre secundariamente a um processo infeccioso, é denominada *Sepsis*, que quando acompanhada por falência de um ou mais órgãos, é classificada como *Sepsis Severa*. Quando há o desenvolvimento de hipotensão severa refratária a agentes vasoconstritores ou à reposição volêmica, está caracterizado o *Choque Séptico* (Esquema 1; BONE et al., 2002; 2009).

Quanto maior a gravidade do quadro (choque séptico $>$ sepsis severa $>$ sepsis), maior é a taxa de mortalidade, e esta também aumenta de acordo com o número de órgãos afetados chegando a 100% quando 4 ou mais órgãos são acometidos (Esquema 1; BONE et al., 2002).



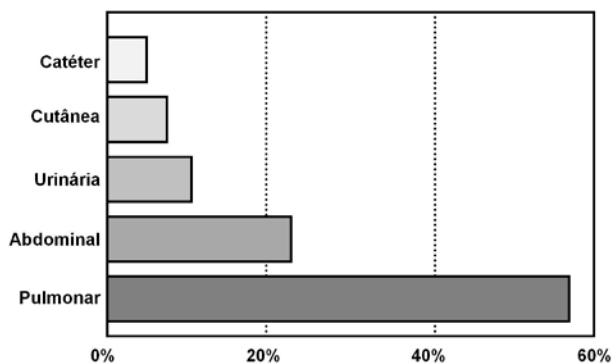
Esquema 1: Relação entre SIRS, sepse, sepse severa e choque séptico. A sepse é a presença de SIRS consequente a um processo infeccioso, podendo evoluir para sepse severa e choque séptico. Adaptado de *Chest* 101(6):1644-55, 1992 e *J Biomed Biotechnol.* 2011;2011:986491.

A infecção pode ter sua origem na comunidade ou ser de origem nosocomial (isto é, quando ocorre durante a hospitalização, não estando presente no momento da admissão hospitalar), sendo esta última relacionada com uma maior taxa de mortalidade (ALBERTI et al., 2002). A pneumonia é a principal infecção encontrada em ambos os casos (infecção nosocomial ou comunitária) tanto no Brasil (SILVA et

al., 2004) quanto no mundo (ALBERTI et al., 2002; ANGUS; WAX, 2001).

Os principais patógenos responsáveis pelas infecções são as bactérias (tanto as gram-positivas quanto as gram-negativas), seguidos pelos fungos. Nos casos das pneumonias nosocomiais, as bactérias gram-negativas predominam, enquanto que nos casos das pneumonias adquiridas na comunidade, as gram-positivas são as principais (ALBERTI et al., 2002). Os principais micro-organismos responsáveis pela sepse gram-negativa são as Enterobactérias (como *Escherichia coli* e espécies de *Klebsiella*), sendo que infecções por *K. pneumoniae* são as principais responsáveis pelas pneumonias nosocomiais (ALBERTI et al., 2002; TSIOTOU et al., 2005).

Além das pneumonias, outras causas frequentes de sepse são infecções abdominais, urinárias, cutâneas e sanguíneas. Juntas, contribuem com ~85% de todos os casos relatados, sendo que as pneumonias são responsáveis por mais de 50% (Esquema 2) (ALBERTI et al., 2002; ANGUS; WAX, 2001).



Esquema 2: Principais causas de sepse. A principal causa de sepse é a pneumonia, seguida por infecção abdominal, urinária, cutânea e pelo uso de cateteres. Adaptado de: *Sepsis Handbook*, 2001.

A sepse é uma das principais causas de admissão nas unidades de terapia intensiva (UTI) (ANGUS et al., 2001). Há aproximadamente 750.000 casos de sepse por ano só nos Estados Unidos. No Brasil, a sepse é a síndrome geradora de maiores custos aos setores de saúde públicos e privados do país, e a média da incidência de sepse nas UTIs brasileiras é de 57 por 1000 pacientes/dia. A taxa de mortalidade também é alarmante, sendo de 35% para os casos de sepse, 47% para os casos de sepse severa, chegando a mais de 50% nos casos de choque séptico (SILVA et al., 2004).

Esta alta incidência se deve em parte ao aumento da perspectiva de vida de idosos e pacientes com enfermidades graves, associado ao emprego descontrolado de antibióticos (responsável pelo aumento do número de bactérias resistentes), ao aumento no número de procedimentos invasivos e ao crescente número de pacientes imunocomprometidos (ANGUS et al., 2001; RANGEL-FRAUSTO, 2005).

Dentre os fatores de risco associados com a sepse e sepse severa estão idade (principalmente adultos acima de 65 anos e recém-nascidos), sexo (masculino é o mais acometido), presença de comorbidades (infecção por HIV, câncer, cirrose e dependência de álcool), uso de cateteres venosos e realização de transfusões sanguíneas (O'BRIEN et al., 2007).

1.2. Patogênese da sepse

Na presença de uma infecção, ocorrem diversos processos imunológicos bastante complexos na tentativa de proteger o hospedeiro da presença do patógeno. Muitos mecanismos estão envolvidos na fisiopatologia da sepse e do choque séptico, incluindo liberação de citocinas, ativação de neutrófilos, monócitos e células endoteliais, bem como ativação de reflexos neuroendócrinos e sistemas de cascatas de proteínas plasmáticas, como os sistemas complemento, de coagulação e fibrinolítico (COHEN, 2002; RANGEL-FRAUSTO, 2005).

Os principais componentes bacterianos responsáveis por desencadear o processo inflamatório na sepse são o lipopolissacarídeo (LPS), peptidoglicanos, ácido lipoteicoico e flagelina, os quais são coletivamente chamados de PAMPs (do inglês, *Pathogen-Associated Molecular Patterns*). O LPS é o PAMP mais estudado das bactérias gram-negativas. O principal mecanismo pelo qual o LPS é reconhecido pelas células do hospedeiro, é através da ligação com a proteína ligante de LPS (LBP, do inglês, *LPS-Binding Protein*) e do co-receptor CD14, sinalizando através do complexo formado com o receptor *Toll-like 4* (TLR-4) e a proteína de membrana MD-2 (COHEN, 2002). Além disso, outras moléculas de superfície reconhecem o LPS, como o MSR (do inglês, *Macrophage Scavenger Receptor*), CD11b/CD18 e canais iônicos, além dos receptores intracelulares NOD1 e NOD2 (do inglês, *Nucleotide-binding Oligomerization Domain*) (COHEN, 2002).

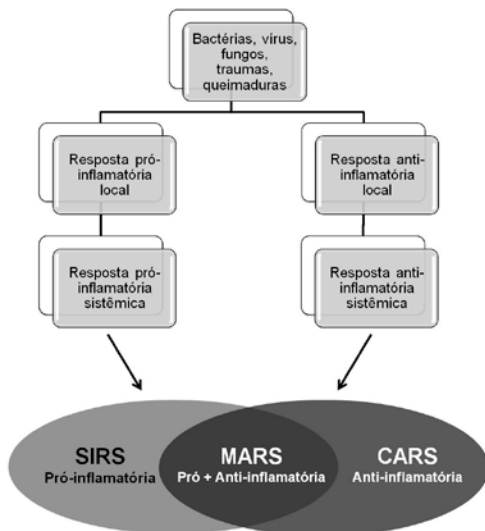
A sinalização intracelular via TLR-4 ocorre através da ligação do domínio TIR (do inglês, *Toll/IL-1 Receptor homology domain*) ao IRAK (do inglês, *IL-1 Receptor-Associated Kinase*), um processo facilitado por proteínas adaptadoras, como a MyD88 (do inglês, *Myeloid Differentiation Protein 88*) e TIRAP (do inglês, *TIR domain-containing Adapter Protein*). Posteriormente, ocorre ativação do TRAF6 (do inglês, *TNF-receptor activated factor-6*), que ativa o complexo IKK (I κ B quinase), o qual fosforila o inibidor do fator nuclear kappa B (NF- κ B), o I κ B. A fosforilação do I κ B pelo IKK leva à sua degradação por proteossomas, liberando o dímero NF- κ B citosólico, que então transloca para o núcleo da célula e inicia a transcrição de diversos genes, cujos produtos são imunomediadores reguladores da resposta inflamatória (COHEN, 2002; SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004).

Como consequência do reconhecimento de PAMPs, há a ativação e recrutamento de leucócitos aos tecidos afetados diretamente pela infecção, e também para outros tecidos. São expressas moléculas de adesão pelas células endoteliais que participam do recrutamento de células do sistema imune. Ocorre aumento da expressão da enzima óxido nítrico sintase (NOS, do inglês *Nitric Oxide Synthase*), levando à

liberação de óxido nítrico (NO), relaxamento do músculo liso vascular, vasodilatação local e sistêmica (O'BRIEN et al., 2007).

Além do NO, os principais mediadores envolvidos na fisiopatologia da sepse são as citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-1 β , e os metabólitos do ácido araquidônico, como as prostaglandinas e os leucotrienos (COHEN, 2002; O'BRIEN et al., 2007). Todos esses mediadores pró-inflamatórios participam ativamente da SIRS.

Além de uma resposta pró-inflamatória sistêmica, a sepse também é caracterizada por uma resposta anti-inflamatória compensatória (CARS, do inglês, *Compensatory Anti-inflammatory Response Syndrome*). Dentre os mediadores anti-inflamatórios liberados na sepse destacam-se: IL-10, o antagonista do receptor de IL-1 (IL-1Ra), TGF- β e o receptor solúvel do fator de necrose tumoral (sTNFR). Alguns autores defendem que, dependendo do paciente, pode haver o predomínio de SIRS ou de CARS (BONE; GRODZIN; BALK, 1997; WARD; CASSERLY; AYALA, 2008). Outros acreditam que primeiramente ocorre a SIRS e posteriormente ocorre a CARS (MUNFORD; PUGIN, 2001), e ainda, há os que defendem que ambos os eventos são concomitantes (ADIB-CONQUY; CAVAILLON, 2008), podendo ocorrer um terceiro estado chamado MARS (do inglês, *Mixed Antagonist Response Syndrome*; Esquema 3) (BONE, 1996).



Esquema 3: Relação entre SIRS, CARS e MARS. Em resposta a invasões bacterianas, virais, fúngicas, traumas ou queimaduras, ocorrem respostas pró- e/ou anti-inflamatórias locais que podem tornar-se sistêmicas. Ambas podem ocorrer ao mesmo tempo. SIRS, síndrome da resposta inflamatória sistêmica; CARS, síndrome da resposta anti-inflamatória compensatória; MARS, síndrome da resposta antagônica mista.

A sobrevivência do paciente séptico é influenciada pela intensidade dessas fases, bem como pelo correto balanço entre elas. Embora a ativação do sistema imune durante uma invasão microbiana seja geralmente protetora, a sepse se desenvolve em um grande número de pacientes como consequência de uma resposta imune excessiva ou mal regulada. Uma defesa deficiente pode permitir o estabelecimento e a disseminação do processo infeccioso. Por outro lado, uma resposta inflamatória excessiva também pode ocasionar prejuízos graves ao hospedeiro através da geração descontrolada de mediadores, levando o indivíduo à morte (COHEN, 2002; TSIOTOU et al., 2005).

Dessa maneira, o processo inflamatório deve ser cuidadosamente regulado para combater o patógeno, sem prejudicar o hospedeiro. Entretanto, na sepse, a resposta inflamatória excessiva é a principal

característica dessa síndrome, bem como em outras doenças prevalentes da civilização moderna, como doenças cardiovasculares, câncer, doença de Alzheimer e obesidade. Além disso, a exacerbação da inflamação que ocorre nesses processos pode ser entendida também como um processo de resolução inadequado ou ineficiente (HELGADOTTIR et al., 2004; KARP et al., 2004).

1.3. Seps e células mieloides imaturas

De maneira muito curiosa, em quase todos os processos inflamatórios e infecciosos, e também na seps, há a expansão de uma população de células bastante heterogênea e um tanto quanto desconhecida. Essa população foi primeiramente descrita no câncer, mas há evidências que a expansão dessas células é uma resposta comum para todas as formas de inflamação. Inicialmente, tanto em modelos animais quanto em humanos com câncer, foi demonstrada atividade imunossupressora em células T por esta população. Pela atividade imunossupressora e devido à sua origem, elas foram referidas conjuntamente como MDSCs (do inglês, *Myeloid-Derived Suppressor Cells*). Essa população heterogênea consiste de células progenitoras mielóides e também de outras células mieloides imaturas, sendo parte do processo normal de mielopoiese que acontece na medula óssea. Em indivíduos saudáveis essas células diferenciam-se rapidamente em granulócitos, macrófagos ou células dendríticas. Entretanto, em condições patológicas como seps, câncer, infecções agudas e crônicas, e processos inflamatórios pode ocorrer a expansão e a ativação dessas células, bem como o bloqueio na sua diferenciação, fazendo com que elas permaneçam imaturas. Assim, elas também são comumente referidas como células mieloides imaturas (revisado em GABRILOVICH; NAGARAJ, 2009).

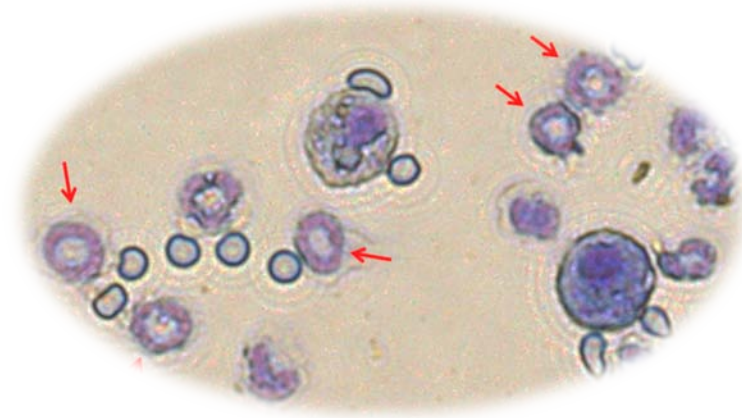
Em camundongos, as células mieloides imaturas são caracterizadas pela co-expressão das moléculas Gr-1 e CD11b na membrana, mas diferentes subpopulações dessas linhagens tem sido descritas, bem como

outras moléculas expressas na superfície dessas células. Essas células consistem de dois subtipos principais: o monocítico e o granulocítico, com pequenas diferenças no nível de expressão dos marcadores (GABRILOVICH; NAGARAJ, 2009; MOVAHEDI et al., 2008).

Essas células foram previamente descritas como supressoras de células T. Dentre os mecanismos descritos na supressão de células T estão: i) aumento da expressão da arginase-1, que levaria a um maior consumo do substrato L-arginina e sua consequente depleção, inibindo a proliferação de células T através de variados mecanismos (RODRIGUEZ; QUICENO; OCHOA, 2007); ii) aumento da expressão da NOS-2 e consequente produção de NO, o qual induz a apoptose de células T e inibe a expressão de MHC de classe II (RIVOLTINI et al., 2002); iii) formação de peroxinitrito pela reação do NO com superóxido – essas células também produzem grandes quantidades de espécies reativas de oxigênio (ROS) – que por sua vez é capaz de nitrar diferentes aminoácidos dos receptores das células T, tornando-os não-responsivos a alguns antígenos (NAGARAJ et al., 2009).

Um dos subtipos dessas células imaturas lembram os neutrófilos, mas seus núcleos tem a aparência de anel e essas células são referidas como “*ring-like cells*” (Esquema 4).

Entretanto, embora essas células tenham sido primeiramente descritas e envolvidas com imunossupressão de células T, elas possuem uma maquinaria poderosa que aumenta sua função imune, já que NO e ROS são importantes componentes do sistema imune inato. Como há uma expansão expressiva dessas células durante processos infecciosos, inclusive na sepse, começou-se a pensar que essas células poderiam ser excelentes ferramentas contra infecções (CUENCA et al., 2011).



Esquema 4: Células “ring-like”. As células foram obtidas pela citocentrifugação do lavado bronco-alveolar de animais com pneumosepse e coradas com o Panótico Rápido. As células estão indicadas pelas setas vermelhas.

Recentemente um interessante trabalho correlacionou essas células mielóides imaturas de acordo com a progressão da sepse. Foi observado que essas células exibem diferentes fenótipos de acordo com o desenrolar do processo, confirmando ainda mais a heterogeneidade dessa população celular, bem como as alterações temporais que ocorrem nessa síndrome. Os autores mostraram que nas horas iniciais após a infecção, essas células exibem um fenótipo pró-inflamatório – com aumento da expressão de $\text{TNF-}\alpha$, IL-6 e NOS – e mais tardiamente exibem um fenótipo anti-inflamatório e imunossupressor, com o aumento da atividade da arginase-1 e da expressão das citocinas IL-10 e $\text{TGF-}\beta$ (BRUDECKI et al., 2012). Os autores afirmam que graças às alterações fenotípicas dessas células durante a sepse, elas participam tanto da resposta inflamatória sistêmica, quanto da resposta anti-inflamatória compensatória (CARS).

1.4. Resolução da inflamação

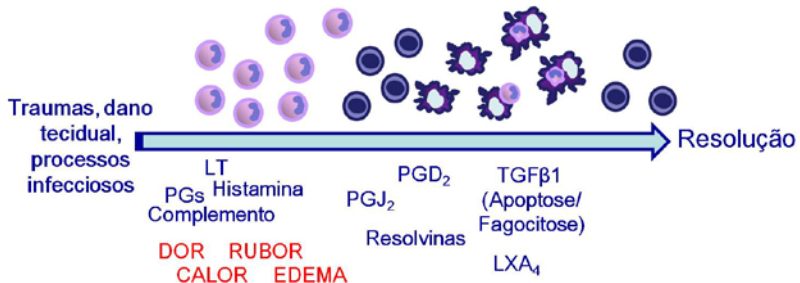
Há relatos sobre resolução da inflamação desde a década de 60, quando até então a resolução era considerada um evento meramente passivo (SPECTOR; WILLOUGHBY, 1963). Hoje é muito bem definido que a resolução da inflamação é um processo endógeno ativo, multimediado, e que protege o hospedeiro de uma resposta inflamatória exacerbada (BANNENBERG et al., 2005; SERHAN et al., 2007).

A resolução da resposta inflamatória é necessária para reestabelecer a homeostasia, limitando o dano tecidual excessivo e reduzindo o desenvolvimento da inflamação crônica. Alguns autores defendem que a inflamação crônica pode ser entendida, pelo menos em parte, como decorrente de um processo de resolução inadequado (HELGADOTTIR et al., 2004; KARP et al., 2004), e a redução da formação de agentes pró-resolução também está envolvida com o aumento da incidência de doenças inflamatórias na senescência como aterosclerose, doenças reumáticas, diabetes e neurodegeneração (GANGEMI et al., 2005).

A resolução é acompanhada por uma troca ativa de mediadores predominantes em exsudatos inflamatórios. Além da ação de diversos mediadores pró-resolução, a apoptose e a remoção de células inflamatórias são importantes para esse processo (SERHAN; SAVILL, 2005).

Em um processo inflamatório, inicialmente são gerados mediadores clássicos como as prostaglandinas e leucotrienos, que ativam e amplificam os sinais cardinais da inflamação (dor, calor, rubor, edema). As prostaglandinas E_2 (PGE_2) e D_2 (PGD_2) são geradas nessa fase inicial da inflamação, e podem ser produzidas tanto pela atividade das enzimas ciclo-oxigenase (COX)-1 e COX-2. As PGE_2 e PGD_2 desempenham um papel duplo na inflamação, sendo importantes tanto para o início da resposta inflamatória aguda, quanto para o início do processo de resolução, pois induzem a produção de enzimas (como por exemplo, da 15-lipoxigenase) que promovem gradualmente a síntese de mediadores

que possuem atividade tanto anti-inflamatória quanto pró-resolutivas, como as lipoxinas (Esquema 5) (SERHAN et al., 2007).



Esquema 5: Mediadores da resposta inflamatória e do processo de resolução. LT, leucotrieno; LXA₄, lipoxina A₄; PGD₂, prostaglandina D₂; PGJ₂, prostaglandina J₂; TGF-β₁, fator de transformação do crescimento -β₁ (*transforming growth factor-β₁*). Adaptado de FASEB J. 21, 325–332 (2007).

Dessa maneira, o efeito anti-inflamatório obtido através da inibição da COX-2, além de impedir a formação de prostaglandinas protetoras como a prostaciclina, atrasa o início do processo de resolução (GILROY et al., 2004). Drogas anti-inflamatórias que impedem essa troca de mediadores podem ter efeitos indesejáveis nesse processo (GILROY et al., 1999). Dentre as exceções estão a aspirina e os glicocorticoides. A acetilação da COX-2 pela aspirina leva à produção de epímeros de lipoxinas, sendo este mais um dentre os inúmeros mecanismos de ação desse fármaco (SERHAN, 2005).

Já os glicocorticoides, além de suas propriedades anti-inflamatórias, também promovem resolução por estimular a retirada de neutrófilos apoptóticos por macrófagos (LIU et al., 1999), possivelmente por atuar através do fator anti-inflamatório endógeno anexina-1 (MADERNA et al., 2005) bem como por alterar o fenótipo de macrófagos durante a diferenciação por um mecanismo que envolve a reorganização de elementos do citoesqueleto (GILES et al., 2001). A anexina-1

(conhecida antigamente como lipocortina-1) e as lipoxinas compartilham o mesmo receptor FPR2/ALX (PERRETTI et al., 2002).

A anexina-1 é uma proteína abundante no citoplasma de polimorfonucleares, monócitos e macrófagos. A administração de baixas doses de glicocorticoides em humanos (GOULDING et al., 1990) e roedores (PERRETTI; FLOWER, 1996) leva ao aumento do conteúdo proteico de anexina-1 nos leucócitos circulantes. Quando há ativação celular, por exemplo, pela adesão de neutrófilos às células endoteliais, a anexina-1 é prontamente mobilizada na superfície da célula e secretada. Tanto a anexina-1 quanto seus peptídeos gerados enzimaticamente (por exemplo Ac2-26) são potentes inibidores da adesão e da migração de células polimorfonucleares (PERRETTI; D'ACQUISTO, 2009). Portanto, esses dois sistemas endógenos distintos, sendo um derivado lipídico (LXA₄) e outro peptídico (anexina-1), convergem para o mesmo receptor anti-inflamatório, limitando a migração de PMN e promovendo resolução. Esses sistemas, portanto, representam um exemplo de redundância funcional dos circuitos anti-inflamatórios endógenos (CHIANG et al., 2006).

A resolução da inflamação é considerada um processo distinto do processo anti-inflamatório. Além de reduzir a infiltração de neutrófilos para os tecidos inflamados, as moléculas pró-resolução estimulam macrófagos dos locais inflamados a fazerem a retirada e o “*clearance*” de células apoptóticas e de micro-organismos, além de estimularem a atividade antimicrobiana de células da mucosa epitelial, tendo, portanto, um papel ativo e não apenas regulador (SCHWAB et al., 2007).

Dentre os mediadores pró-resolução, podemos citar as lipoxinas, resolvinas, protectinas e maresinas. Essas famílias de moléculas endógenas pró-resolução não são imunossupressoras, mas atuam na resolução por ativar mecanismos específicos para promover a homeostasia (SERHAN; CHIANG; VAN DYKE, 2008; SERHAN et al., 2007). A seguir será dado enfoque apenas às lipoxinas, que são os mediadores de interesse desse trabalho.

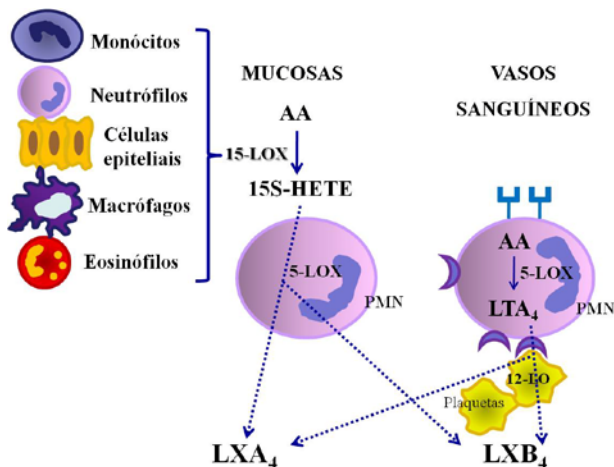
1.5. Biossíntese de Lipoxinas

As lipoxinas foram os primeiros mediadores endógenos reconhecidos como tendo atividades tanto anti-inflamatória quanto pró-resolução. São pequenas moléculas derivadas do ácido araquidônico (AA) e são biossintetizadas pela ação sequencial das lipoxigenases (LOX) e de outras enzimas (GODSON et al., 2000).

Os lipídeos de membrana funcionam como substrato para a síntese de lipoxinas, assim como para a síntese de outros eicosanóides. Assim, a biossíntese de lipoxinas é limitada pela disponibilidade de substrato e depende primariamente da liberação de AA. Estímulos químicos e físicos ativam a translocação, dependente de cálcio, da fosfolipase A2 citosólica (cPLA2) para a membrana do retículo endoplasmático e da membrana nuclear, onde esta enzima hidrolisa os fosfolipídeos, principalmente fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina, liberando o AA (EVANS et al., 2001). A cPLA2 do tipo IV é a principal isoforma que contribui para a produção de AA frente a condições de estimulação intensa ou sustentada, como em processos inflamatórios. Uma vez liberado, o AA é metabolizado por diferentes sistemas enzimáticos, incluindo o sistema das COXs e das LOXs (FUNK, 2001). Em condições fisiológicas, o AA liberado pela cPLA2 é reincorporado pela membrana das células. (MORROW; ROBERTS, 2005).

As LOXs são uma família de enzimas que catalizam a oxigenação de ácidos graxos em hidroperóxidos lipídicos (BRASH, 1999). O AA é metabolizado pelas LOXs em intermediários instáveis (ácidos hidroperoxi-eicosatetraenóicos – HPETEs), que também são metabolizados em seus ácidos-hidroxi-eicosatetraenóicos (HETEs) correspondentes. As principais LOXs descritas em humanos são: 5-LOX, 12-LOX (S ou R) e 15-LOX (1 e 2), cuja expressão é frequentemente célula-específica. Por exemplo, plaquetas possuem apenas a 12(S)-LOX e leucócitos possuem tanto a 5- quanto a 15-LOX (BRASH, 1999).

Os locais mais importantes de produção de lipoxinas são as mucosas e os vasos sanguíneos (Esquema 6). Nas mucosas, as lipoxinas são geradas principalmente pelos neutrófilos a partir do 15-ácido-hidroieicosatetraenóico (15-HETE), fornecido pelas células do epitélio (GRONERT et al., 1998; SCANNELL; MADERNA, 2006). Já nos vasos sanguíneos, a biossíntese envolve a oxigenação do ácido araquidônico pela 5-LOX em leucócitos e a liberação do intermediário leucotrieno A₄, o qual é convertido em lipoxina pelas plaquetas através da atividade da 12-LOX (biossíntese transcelular) (ROMANO; SERHAN, 1992; SCANNELL; MADERNA, 2006). Os neutrófilos também podem interagir com outras células nos locais inflamados e adquirir a habilidade de produzir lipoxinas, com outros leucócitos, células endoteliais, células epiteliais da mucosa e fibroblastos (WALLACE; FIORUCCI, 2003).



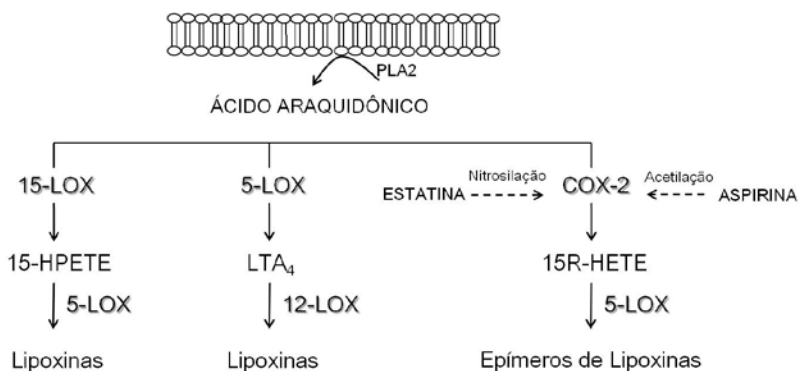
Esquema 6: Biossíntese de lipoxinas nas mucosas e vasos sanguíneos. AA: ácido araquidônico; PMN: células polimorfonucleares; 15-HETE: ácido hidroieicosapentanóico; LOX: lipoxigenase; LX: lipoxina. Adaptado de *The Scientific World JOURNAL* 2006; 6: 1555–1573.

Além das LOX, as COX, quando acetiladas ou nitrosiladas, também podem levar à formação endógena de epímeros de lipoxinas (Esquema 7). A acetilação pela aspirina da serina que fica próxima ao sítio ativo da COX-2 bloqueia sua habilidade de biossíntese de prostaglandinas, já que restringe o acesso do ácido araquidônico ao sítio catalítico da enzima. Entretanto, a COX-2 permanece enzimaticamente ativa e faz uma reação incompleta, ou seja, ao invés de formar prostaglandina H₂ que é a precursora de todas as prostaglandinas, ela passa a produzir a partir do ácido araquidônico, o intermediário 15R-HETE, o qual é convertido pela 5-LOX de leucócitos em epímeros de lipoxina (SERHAN, 2005).

Esses epímeros possuem as mesmas ações que as lipoxinas, entretanto são mais estáveis e assim possuem ação mais prolongada (SERHAN; YACOUBIAN; YANG, 2008). As lipoxinas sofrem uma inativação metabólica mais rápida, sendo que a principal via é por desidrogenação do C-15 e possivelmente oxidação do C-20 (MADERNA; GODSON, 2009). Assim, além da inibição da biossíntese de prostaglandinas pela aspirina ser um mecanismo importante para o efeito anti-trombótico e anti-inflamatório do fármaco, a aspirina leva à formação endógena desses epímeros de lipoxinas (15-epi-lipoxina) denominados ATLS (do inglês, *Aspirin-Triggered Lipoxins*) (CLÀRIA; SERHAN, 1995).

Dessa maneira, conforme já comentado, a aspirina, além de possuir ação anti-inflamatória, é um fármaco pró-resolução. Células que expressam COX-2, incluindo células do endotélio vascular, células epiteliais, macrófagos e neutrófilos, estão envolvidas na produção de ATLS. A produção de ATLS é aumentada em animais tratados com aspirina quando comparados a animais controle, e também em humanos que ingerem baixas doses de aspirina (CHIANG et al., 2004). Quando desencadeado pela aspirina, lipoxinas e 15-epi-lipoxinas estimulam a produção de óxido nítrico pelas células endoteliais, o qual impede a adesão de leucócitos nas células do endotélio (PAUL-CLARK et al., 2004). Esse mecanismo pode ser particularmente relevante na resolução da inflamação local.

Além da aspirina, as estatinas também podem formar epímeros de lipoxina (Esquema 7) (SPITE; SERHAN, 2010). Essa classe de fármacos, conhecidos principalmente pela habilidade de reduzir os níveis de LDL em pacientes hipercolesterolêmicos, também exibem propriedades anti-inflamatórias que parecem mediar suas ações protetoras no sistema cardiovascular (DINARELLO, 2010). Estudos mostraram que, assim como a aspirina, as estatinas são capazes de formar o intermediário 15R-HETE que é convertido pela 5-LOX em epímeros de lipoxinas, os quais seriam responsáveis por algumas das ações benéficas desses fármacos. Não é claro como as estatinas alteram a atividade da COX-2 para produzir o 15R-HETE, e nem se esse evento ocorre com todas as estatinas, entretanto, há trabalhos que sugerem que a atorvastatina ativa a COX-2 por S-nitrosilação decorrente do aumento da expressão da NOS-2 (ATAR et al., 2006; KIM; HURI; SNYDER, 2005). Além disso, outro trabalho do mesmo grupo mostrou que o aumento da expressão da COX-2 e da 5-LOX induzido pelo tratamento com estatinas pode contribuir para o aumento da síntese desses epímeros (BIRNBAUM et al., 2006).



Esquema 7: Principais vias de biossíntese de lipoxinas. O ácido araquidônico é liberado da membrana pela ação da fosfolipase A2 (PLA2) e pode ser metabolizado por lipoxigenases (LOX) e pela ciclooxigenase (COX) para formar lipoxinas. LTA₄, leucotrieno A4; HPETE, ácido hidroperoxi-eicosatetraenóico; HETE, ácido-hidroxi-eicosatetraenóico.

1.6. Receptores das Lipoxinas

A LXA₄ e seus epímeros atuam principalmente em um receptor acoplado à proteína G (GPCR) pertencente à família dos receptores FPR (do inglês, *formyl peptide receptor*), conhecidos pela importância na defesa do hospedeiro e na inflamação. Em humanos, há três receptores codificados por genes distintos: FPR1, FPR2/ALX e FPR3 (DUFTON; PERRETTI, 2010; YE et al., 2009).

Contrastando com as 3 famílias de genes que codificam os receptores FPR em humanos, em camundongos há pelo menos 8 membros descritos. A relação precisa entre os vários receptores murinos e humanos ainda precisa de uma melhor definição (HE et al., 2013), mas baseado em evidências e na homologia entre as sequências, o receptor FPR1 (humano) equivale ao *Fpr1* (murino), enquanto que ambos os murinos *Fpr-rs1* e *Fpr-rs2* (também chamados conjuntamente de *mFpr2*) são estruturalmente e funcionalmente relacionados ao FPR2/ALX (JOHN et al., 2007; LE; MURPHY; WANG, 2002; YE et al., 2009), o receptor da LXA₄. Embora diferentes, utilizamos nesse trabalho a nomenclatura dos receptores humanos preconizada pela IUPHAR, já que é a mais conhecida e bem descrita (YE et al., 2009).

O FPR2/ALX é um receptor acoplado à proteína Gi, com 351 aminoácidos, e que possui 69% de homologia com o FPR1 o qual foi o primeiro a ser descrito. Apesar da grande homologia, o FPR2/ALX tem pouca afinidade pelo peptídeo N-formil-metionil-leucil-fenilalanina (fMet-Leu-Phe ou fMLP), o ligante clássico do FPR1. Entretanto, ele é o principal receptor que medeia os efeitos da LXA₄ *in vivo*. Essa família de receptores é um tanto quanto promíscua, e já foram descritos aproximadamente 30 agonistas, tanto peptídicos quanto lipídicos (DUFTON; PERRETTI, 2010). Dentre os ligantes do FPR2/ALX, além da LXA₄ e seus análogos, estão resolvina D1, anexina-1, peptídeo Ac2-26, proteína beta-amilóide, proteína amilóide sérica A, peptídeos do envelope do HIV, peptídeos antimicrobianos como LL37, entre outros (SCANNELL; MADERNA, 2006).

A ligação de diferentes moléculas ao receptor ocorre com distinta afinidade e em diferentes locais de interação, facilitando a ativação de vias de sinalização distintas dependendo do tipo celular (BAE et al., 2003). Assim, os efetores intracelulares após a ativação desses receptores dependem do tipo e da concentração de ligante, do tipo de ligação, e dependendo das circunstâncias, podem resultar em efeitos inibitórios ou estimulatórios (MIGEOTTE; COMMUNI; PARMENTIER, 2006).

Desse modo, a sinalização intracelular do FPR2/ALX após a ligação da LXA₄ ainda é um campo com muitas lacunas, tendo vias específicas para cada tipo celular (CHIANG et al., 2006; FIORE; SERHAN, 1995). Por exemplo, a interação LXA₄-FPR2/ALX em neutrófilos impede a migração dessas células sem envolver sinalização de cálcio, enquanto que em monócitos, a interação da LXA₄ ao receptor estimula a quimiotaxia por aumento de cálcio intracelular. Além disso, a LXA₄ promove outras respostas não flogísticas como a fagocitose de células apoptóticas por macrófagos, sendo um mecanismo mediado pela proteína quinase C e PI-3-quinase (MADDOX et al., 1997).

Para complicar um pouco mais, não é muito claro se a ação anti-inflamatória da LXA₄ observada em neutrófilos e em outras células é mediada de fato através de uma sinalização negativa dependente de FPR2/ALX, ou se a LXA₄ bloqueia a ligação impedindo a ativação desses receptores por agonistas pró-inflamatórios endógenos (YE et al., 2009). Esse ponto foi levantado por alguns autores porque a maioria dos agonistas dos FPR2/ALX exibe efeitos opostos aos da LXA₄ em neutrófilos (sendo degranulação e geração de superóxido dois exemplos disso) e também porque estimulam vias de sinalização que levam à mobilização de cálcio (entretanto, como já citado, a ligação LXA₄-FPR2/ALX em neutrófilos não mobiliza cálcio). Assim, devido à diversidade de efeitos, e ainda muitas vezes opostos, e também à falta de informação aprofundada, a sinalização da LXA₄ através desses receptores é muito obscura, fazendo com que esses receptores sejam considerados GPCRs um tanto quanto atípicos (DUFTON; PERRETTI, 2010; YE et al., 2009).

Além de serem expressos em células do sistema imune como macrófagos e neutrófilos, os receptores FPR2/ALX já foram descritos em tecidos como baço e pulmão (CHIANG et al., 2006). A expressão desses receptores no epitélio pulmonar está relacionada com a função anti-inflamatória que as lipoxinas exercem nessas células, como a redução da liberação de citocinas (BONNANS et al., 2007).

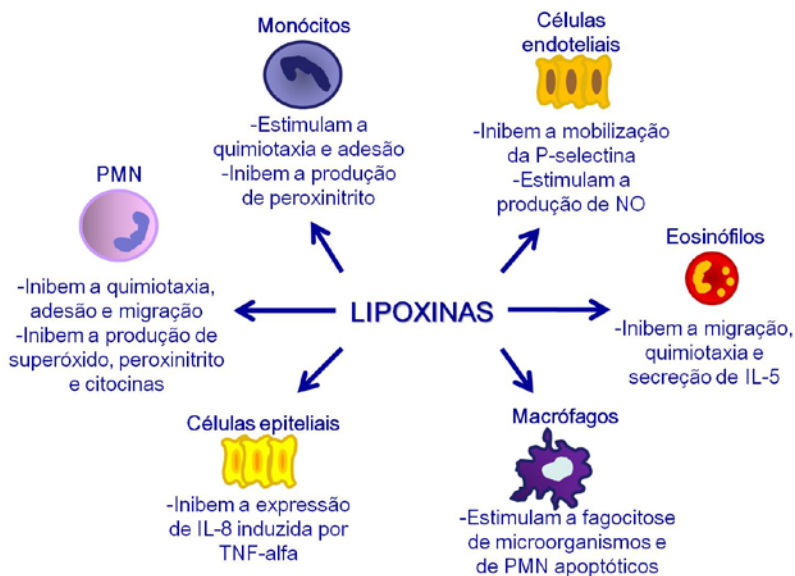
Além de atuarem em receptores FPR2/ALX, as lipoxinas também podem atuar como antagonistas dos receptores cisteinil-leucotrienos (CysLT), sendo esse um potencial mecanismo através do qual as lipoxinas exercem seus efeitos anti-inflamatórios em algumas células e tecidos (GRONERT et al., 2001; MADERNA; GODSON, 2009). Outro receptor da LXA₄ é o receptor nuclear aril hidrocarboneto (AhR, do inglês, *aryl hydrocarbon receptor*), um fator de transcrição ativado por ligante (SCHALDACH; RIBY; BJELDANES, 1999). Foi demonstrado que a ativação do AhR pela LXA₄ inibe a resposta imune inata de células dendríticas por aumentar a expressão do fator supressor da sinalização de citocinas-2 (SOCS-2, do inglês, *suppressor of cytokine signalling 2*), pertencente a uma família de proteínas que alteram e inibem respostas de citocinas (MACHADO et al., 2006). Pamplona e colaboradores (2012) mostraram que a LXA₄ também pode atuar como um modulador alostérico dos receptores canabinoides CB1 (PAMPLONA et al., 2012).

1.7. Ações das lipoxinas

Mediadores que possuem ações duplas por atuarem como anti-inflamatórios e pró-resolução como as lipoxinas, exibem mecanismos de ação variados em modelos animais de doenças inflamatórias e promovem a resolução de inflamações orais, pulmonares, oculares, renais, dérmicas e gastrintestinais (SERHAN; YACOUBIAN; YANG, 2008).

As lipoxinas possuem ações anti-inflamatórias e também estimulam e aceleram a resolução da inflamação por diversos mecanismos, sendo

estes efeitos mediados principalmente pela ativação dos receptores FPR2/ALX. As lipoxinas reduzem a expressão de moléculas de adesão em leucócitos e células endoteliais, impedem a infiltração de neutrófilos e eosinófilos para o local inflamatório, reduzem a produção de superóxido e citocinas como IL-1 β e IL-6 pelos neutrófilos, estimulam o recrutamento não flogístico de monócitos, aumentam a saída de fagócitos do local inflamado através do sistema linfático e estimulam a expressão de moléculas envolvidas na defesa antimicrobiana (Esquema 8) (CAMPBELL et al., 2007; FILEP; KHREISS; JÓZSEF, 2005; SERHAN; CHIANG; VAN DYKE, 2008; SERHAN; YACOUBIAN; YANG, 2008).



Esquema 8: Algumas ações das lipoxinas. Adaptado de: *Br J Pharmacol.* 2009;158(4):947-959.

As lipoxinas também são capazes estimular a fagocitose de células apoptóticas por macrófagos pelo rearranjo de proteínas do citoesqueleto e consequente polarização da célula (REVILLE et al., 2006). A LXB₄

exerce as mesmas ações que a LXA₄, entretanto atua em um receptor distinto que permanece desconhecido (ARIEL et al., 2003; PARKINSON, 2006).

Um dos mecanismos pelos quais a LXA₄ e seus epímeros inibem a infiltração de neutrófilos é através da indução da produção de NO, o qual impede a interação entre leucócitos e células endoteliais (PAUL-CLARK et al., 2004). Parte do efeito anti-inflamatório da LXA₄ parece envolver a inibição de fatores de transcrição incluindo o NF-κB e a proteína ativadora 1 (AP-1), responsáveis pela expressão de muitas citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas (JÓZSEF et al., 2002). Além disso, a LXA₄ estimula a expressão da citocina anti-inflamatória IL-10 (SOUZA et al., 2007) e também da heme oxigenase-1 (NASCIMENTO-SILVA et al., 2005).

A Heme Oxigenase-1 (HO-1) é a primeira enzima envolvida no catabolismo do heme, e cliva o heme para formar biliverdina e monóxido de carbono. Dentre outros, a HO-1 exibe efeitos anti-inflamatórios, anti-apoptóticos e antiproliferativos, e em cultura de células endoteliais a HO-1 inibe a expressão de moléculas de adesão induzidas por citocinas pró-inflamatórias (NASCIMENTO-SILVA et al., 2005; SOARES et al., 2004). A aspirina induz a expressão da HO-1 de maneira independente de COX (GROSSER et al., 2003), oferecendo proteção contra agressões pró-oxidantes. Alguns trabalhos sugerem que é via produção de ATLS, já que as ATLS também são capazes de induzir a expressão dessa enzima pelas células endoteliais (NASCIMENTO-SILVA et al., 2005), e foi demonstrado que a HO-1 tem um papel essencial nos efeitos anti-inflamatórios e pró-resolução das ATLS (JIN et al., 2007).

Além disso, a LXA₄ tem efeito direto na regulação do tônus vascular e é capaz de promover redução da pressão sanguínea de maneira dependente de endotélio, pela liberação de NO (VON DER WEID et al., 2004) e também de prostaciclina (BREZINSKI et al., 1989). Ainda, alguns trabalhos mostraram que a LXA₄ tem efeitos antifibróticos em células renais mesangiais (RODGERS et al., 2005) e

também tem papel na regulação da dor inflamatória (SVENSSON; ZATTONI; SERHAN, 2007).

1.8. Lipoxinas, infecção e sepse

O papel da LXA₄ em processos infecciosos não é bem compreendido, já que os benefícios de um processo anti-inflamatório ou pró-resolutivos são difíceis de avaliar durante uma infecção ativa. Se por um lado o aumento do processo inflamatório é importante para o controle da infecção, por outro, uma inflamação exacerbada pode prejudicar o hospedeiro.

Patógenos também podem contribuir com a provisão de componentes necessários à biossíntese de lipoxinas. Por exemplo, a bactéria *Pseudomonas aeruginosa* possui 15-LOX que converte o ácido araquidônico do hospedeiro em 15-HETE para a produção local de lipoxina (VANCE et al., 2004). Entretanto, a 15-LOX expressa por patógenos pode interagir com circuitos biossintéticos endógenos e gerar sinais que podem prejudicar a defesa imune do hospedeiro. Por exemplo, na infecção por *Mycobacterium tuberculosis* o aumento da LXA₄ endógena pelo hospedeiro foi associado com o aumento da replicação do patógeno. Nesse estudo foi mostrado que a LXA₄ regula negativamente a resposta protetora de células Th1 contra a infecção por micobactérias (BAFICA et al., 2005), sugerindo que o patógeno parece se beneficiar do ambiente anti-inflamatório proporcionado pela lipoxina (ALIBERTI; BAFICA, 2005). O estudo de Bafica e colaboradores demonstrou que na ausência da geração de LXA₄ endógena, os camundongos tornaram-se mais resistentes à infecção, com redução do número de bactérias e aumento da sobrevivência (BAFICA et al., 2005).

Por outro lado, células do hospedeiro infectadas por *Toxoplasma gondii*, o qual também possui sua própria 15-LOX, produzem grandes quantidades de lipoxinas (ALIBERTI; SERHAN; SHER, 2002; BANNENBERG et al., 2004). Em animais knockout para 5-LOX, a ausência de lipoxinas endógenas fez com que os camundongos

sucumbissem por conta de uma resposta pró-inflamatória exacerbada, mesmo com a redução do número de parasitas (ALIBERTI; SERHAN; SHER, 2002).

No contexto da sepse, que é uma resposta inflamatória sistêmica desencadeada por um processo infeccioso, não há muitos dados na literatura sobre o papel da LXA₄. Um trabalho recente utilizando o modelo de sepse polimicrobiana, CLP (ligação e perfuração do ceco), demonstrou que o tratamento dos ratos com um análogo da LXA₄ foi benéfico ao hospedeiro por reduzir a inflamação (WALKER et al., 2011). Além disso, um trabalho também utilizando o modelo de CLP mostrou que o mediador pró-resolução, resolvina D₂, confere proteção na sepse, mesmo com a redução da migração de leucócitos para o foco infeccioso (SPITE et al., 2009).

2. HIPÓTESE DE TRABALHO

No geral, as moléculas pró-resolução estimulam e aceleram a resolução da inflamação por diversos mecanismos. Curiosamente, existem algumas semelhanças entre as ações das lipoxinas e alguns eventos que ocorrem na sepse, o que sugere que pode haver o aumento de lipoxinas nessas condições, e que estas podem ser a causa e/ou podem levar ao agravamento destes eventos (Tabela 1).

Tabela 1: Semelhanças entre as ações da LXA₄ e alguns eventos da sepse.

AÇÕES DA LXA ₄	EVENTOS DA SEPSE
- Impede a infiltração de neutrófilos para o foco infeccioso	- Falência de migração de neutrófilos para o foco infeccioso
- Inibe a expressão de moléculas de adesão de neutrófilos e células endoteliais	- A falência de migração que ocorre na sepse deve-se, em parte, à redução da expressão de moléculas de adesão
- Aumenta a produção de NO	- Aumento da produção de NO
- Reduz a pressão arterial por mecanismo dependente de endotélio	- Desenvolvimento de hipotensão
- Excesso de lipoxina desencadeado por agentes infecciosos pode prejudicar a resposta imune do hospedeiro	- Resposta inflamatória exacerbada e descontrolada desencadeada por agentes infecciosos

Em processos inflamatórios desencadeados por uma infecção, onde o patógeno ainda é viável, reduzir a expressão celular de moléculas de adesão e impedir a infiltração de neutrófilos para o local, bem como a produção de superóxido e de algumas citocinas, pode não ser uma alternativa interessante. Assim, analisando essa tabela é que surgiu nossa hipótese de trabalho: será que pode haver aumento da liberação de LXA₄ pelos patógenos ou pelo próprio hospedeiro, de modo a acarretar efeitos prejudiciais ao hospedeiro, a exemplo do excesso de citocinas e outros mediadores inflamatórios liberados que ocorre na sepse? Caso contrário, com suas características anti-inflamatórias e pró-resolução, a LXA₄ poderia exercer efeitos benéficos ao hospedeiro por controlar o processo inflamatório exacerbado que ocorre na sepse?

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivos gerais

Este trabalho teve dois objetivos principais:

- Padronizar o modelo de sepse induzida por pneumonia em camundongos;
- Avaliar o envolvimento da LXA₄ na resposta inflamatória sistêmica que ocorre durante a sepse.

3.2. Objetivos específicos

- a) Avaliação temporal de parâmetros inflamatórios no modelo de sepse induzida por pneumonia;
- b) Avaliação temporal de parâmetros cardiovasculares no modelo de sepse induzida por pneumonia;
- c) Avaliação temporal da disfunção orgânica induzida pelo modelo de pneumosepse;
- d) Avaliação da participação da LXA₄ no modelo de pneumosepse através da quantificação dos seus níveis locais e sistêmicos;
- e) Avaliação da expressão do receptor FPR2/ALX no modelo de pneumosepse;
- f) Avaliação da participação do receptor FPR2/ALX nos efeitos da LXA₄ no modelo de pneumosepse através do emprego de ferramentas farmacológicas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Animais

Foram utilizados camundongos *Swiss* machos de 3 meses de idade, pesando entre 40-45 g, fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Os animais foram mantidos em ambiente com temperatura ($22 \pm 2^\circ \text{C}$) e ciclo claro / escuro (12 / 12 h) controlados automaticamente. Os animais tiveram livre acesso à alimentação e água até o momento do experimento. Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética para Uso de Animais (CEUA/UFSC) sob o número PP00492 e estão de acordo com as Diretrizes do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

4.2. Procedimentos experimentais

4.2.1. Modelo experimental de sepse por pneumonia

4.2.1.1. Aumento da patogenicidade e expansão da bactéria

A bactéria utilizada nos experimentos foi a *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 700603 – American Type Culture Collection, Rockville, MD). Foi realizado um procedimento na Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, para aumentar a patogenicidade da bactéria através de passagens por camundongos C57BL/6. Para isso, as bactérias foram resuspensas em 45 mL de caldo BHI em um tubo de polipropileno e incubadas a 37°C por 18 h. O tubo foi centrifugado (3500 rpm, 10 min, temperatura ambiente), o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi homogeneizado em 45 mL de PBS estéril (Dulbecco's phosphate-buffered saline; em mM 137 NaCl, 2,7 KCl, 1,5 KH_2PO_4 and 8,1 NaHPO_4 ; pH 7,4) para lavar as bactérias. Esse procedimento foi realizado duas vezes e finalmente foram adicionados 500 μL de PBS estéril no *pellet* resultante. Três animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal (i.p.) de cetamina e xilazina (100 e 15 mg/kg, respectivamente). Foi então

realizada uma incisão de ~ 5 mm na região ventral do pescoço, a musculatura foi afastada com o auxílio de uma pinça curva para exposição da traqueia e 50 µL da suspensão de bactérias foram injetados pela via intratraqueal (i.t.). Após 24 h os animais foram sacrificados para a retirada do baço. Os baços dos animais foram macerados com 500 µL de PBS estéril e 10 µL dessa suspensão foram semeados em triplicata em placas de Petri contendo ágar Mueller Hinton. Após a semeadura, as placas foram incubadas a 37 °C por 24 h. As UFCs presentes foram resuspensas em 45 mL de caldo BHI e incubadas a 37 °C por 18 h, repetindo-se assim o ciclo por 10 vezes.

Após este processo, que visou à aquisição de bactérias mais patogênicas aos camundongos, o qual foi confirmado pela mortalidade dos animais, foi realizada a expansão das colônias de bactéria. As UFCs provenientes do 10^o baço foram coletadas e suspensas em 45 mL de caldo BHI em um tubo de polipropileno e incubadas a 37 °C por 18 h. Foi feita a centrifugação do tubo (3500 rpm; 10 min; temperatura ambiente), descartado o sobrenadante e o material foi novamente suspenso em 45 mL de BHI. Esse procedimento foi repetido por 5 dias. No quinto dia, o tubo foi centrifugado, descartado o sobrenadante e o pellet foi lavado duas vezes em 45 mL de PBS estéril. O sedimento final foi suspenso em 45 mL de PBS estéril e alíquotas de 500 µL foram feitas em microtubos do tipo *ependorf* que foram a seguir liofilizadas (Heto-Vac CT110, Heto Lab Equipment, Berkerod, Dinamarca). As bactérias foram congeladas na fase log de crescimento.

4.2.1.2. Quantificação das bactérias

O conteúdo de um microtubo de bactérias liofilizadas foi suspenso em 45 mL de caldo BHI em tubo falcon e incubado por 18 h a 37 °C. As bactérias foram lavadas como descrito previamente e ao final, o sedimento resultante foi suspenso em 0,5 mL de PBS estéril e colocado em microtubos. Foram realizadas diluições seriadas e determinadas as densidades ópticas a 600 nm. Paralelamente, 10 µL das diluições foram plaqueadas em duplicata e de maneira estéril, em ágar Mueller-Hinton e incubados a 37 °C por 24 h. Após as 24 h, foram determinadas as UFC e

calculado a quantidade por mL de cada diluição. Foi feita uma regressão linear relacionando D.O. e UFC/mL a qual foi utilizada para estimar o número de UFC de todas as alíquotas feitas nesse lote. Ao todo para este estudo foram realizados dois lotes distintos de bactérias.

4.2.1.3. Inoculação das bactérias nos animais

Antes de cada experimento, alíquotas individuais foram descongeladas e lavadas duas vezes em PBS estéril. Foram então colocadas em caldo BHI e incubadas por 18 h a 37 °C. O caldo foi então centrifugado e o pellet resultante foi lavado duas vezes e suspenso em 0,5 mL de PBS estéril. A concentração de bactérias foi determinada através da interpolação da medida da absorbância em 600 nm na regressão obtida no item 3.2.1.2. A suspensão de bactérias foi diluída em PBS estéril na concentração desejada para inoculação.

Os animais foram anestesiados com uma mistura de tribromoetanol e cetamina (375 / 25 mg/kg; i.p.) e colocados em posição supina. Assepticamente foi realizada uma incisão de 5 mm na pele da região ventral do pescoço. A musculatura foi levemente afastada e a traqueia identificada para injeção intratraqueal de 0,05 mL da suspensão de bactérias, feita com o auxílio de uma seringa (30 G). Inicialmente foram inoculados de 1×10^8 a 1×10^9 UFC de *Klebsiella pneumoniae* por animal, e com base no resultado da Figura 1, nos demais experimentos foram inoculados 4×10^8 UFC por animal. A pele foi suturada e os animais receberam PBS (30 mL/kg; s.c.) para reposição fluídica e foram mantidos em ambiente aquecido até a recuperação da anestesia (~30 a 45 min). Os animais controles foram submetidos aos mesmos procedimentos cirúrgicos, mas ao invés da suspensão de bactérias, receberam a injeção i.t. de 0,05 mL de PBS estéril.

4.2.2. Medida da pressão arterial média (PAM)

Foi utilizado como anestésico uma mistura de cetamina e xilazina (100 e 15 mg/kg, respectivamente) pela via intramuscular (i.m.). Quando necessário, doses de reforço de anestésico (30 e 7 mg/kg; i.m.) foram administradas a cada 35-40 minutos, também pela via i.m.

O plano anestésico foi avaliado por pinçamento interdigital e de cauda. Após a constatação do plano anestésico cirúrgico (ausência de reflexos), os animais foram posicionados em decúbito dorsal sobre uma mesa cirúrgica aquecida (37 °C). A veia femoral esquerda foi dissecada para a inserção de uma agulha acoplada a uma cânula de polietileno e seringa, sendo esse acesso venoso utilizado para a administração de agentes vasoativos. Após a canulação da veia femoral, foram administradas 3 UI de heparina sódica diluída em 0,02 mL de PBS para prevenir a formação de coágulos e a obstrução das cânulas. Na sequência, a artéria carótida esquerda foi localizada e separada do nervo vago e tecidos adjacentes. O fluxo sanguíneo da artéria carótida foi interrompido na extremidade distal ao coração através da ligadura com fio de sutura, enquanto o fluxo da extremidade proximal foi temporariamente suprimido por compressão com uma pinça curva. Um pequeno corte foi realizado na região medial da porção da artéria carótida clampeada, servindo como via de inserção de um catéter de polietileno (Angiocath®, 19G), devidamente heparinizado, em direção ao coração. Este cateter foi firmemente amarrado na artéria e conectado ao transdutor de pressão (Mikro-Tip®, Millar Instruments, Inc., Huston, Texas, USA) conectado a um equipamento de análise de pressão arterial Powerlab 8/30 (AD Instruments Pty Ltd., Castle Hill, Australia). Os valores de pressão arterial média (PAM; em mmHg) e da frequência cardíaca (em batimentos por minuto, bpm) foram registrados em um computador (sistema operacional Windows Vista®, Microsoft Corporation, EUA) por um software de integração (Chart 5®) do fabricante.

A administração intravenosa dos compostos de interesse, bem como a avaliação das respostas cardiovasculares em nossos experimentos *in vivo*, foi iniciada entre 20 a 30 minutos após o término da manipulação cirúrgica. Esse período mostrou-se suficiente para a estabilização da PAM, geralmente elevada pelo estresse cirúrgico.

O agente vasoativo estudado foi o agonista seletivo α_1 -adrenérgico, fenilefrina, a qual foi dissolvida em PBS e administrada lentamente (volume final de 10 μ L). Imediatamente após, mais 20 μ L de PBS foram

injetados para garantir que nenhum resíduo da droga em uso permanecesse na cânula de polietileno. A injeção lenta de 20 µl de PBS, por si só, não foi capaz de alterar a PAM, o que nos garantiu que os efeitos observados foram resultantes das ações das drogas administradas. A reatividade vascular foi avaliada através da injeção de três doses crescentes. A elevação da PAM iniciava-se imediatamente após a administração do composto vasoativo, perdurando por períodos entre 10 segundos a 4 minutos, sendo o pico do efeito observado sempre ao longo do primeiro minuto. Ao término dos experimentos, todos os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, ainda sob efeito da anestesia geral.

4.2.3. Histologia e escore patológico

Os animais foram anestesiados com tribromoetanol e cetamina (375 e 25 mg/kg; i.p.; respectivamente). Os animais foram perfundidos com solução salina (NaCl 0,9%; 4°C) por 3 minutos. A traqueia foi localizada e os pulmões foram preenchidos com 1 mL de solução de formalina 4%, retirados e deixados nessa solução por 24 h para fixação, quando então a solução foi substituída por etanol 70%. O lóbulo direito do pulmão foi então desidratado e incluído na parafina e foram realizados cortes transversais de 5 µm com o auxílio de um micrótomo. Os cortes foram corados com hematoxilina-eosina (HE) e analisados em microscópio de luz (Leica Microsystems DMI 3000B, Alemanha). Três investigadores independentes e sem conhecimento dos grupos experimentais avaliaram os cortes de maneira semi-quantitativa com base no grau e extensão da inflamação como descrito previamente (BECK et al., 2001). Foram analisados 3 cortes histológicos de cada animal, sendo que havia 3 animais para cada grupo experimental. A escala utilizada está representada na Tabela 2.

Tabela 2: Escores utilizados para avaliação de dano microscópico.

Escores	Descrição
0	Ausência de inflamação
1	Pouca / moderada infiltração de células
2	Infiltrado inflamatório envolvendo aproximadamente 25-50% do pulmão
3	Infiltrado inflamatório severo envolvendo 50-75% do pulmão
4	Infiltrado inflamatório em praticamente todo o tecido pulmonar

4.2.4. Obtenção de sangue e de lavado bronco-alveolar

Os animais foram anestesiados com uma mistura de tribromoetanol e cetamina (375 e 25 mg/kg; i.p.; respectivamente). Para a coleta de sangue, foi realizada uma pequena abertura da cavidade torácica e aproximadamente 2 mL de sangue foram coletados por punção cardíaca em tubo contendo heparina (5 UI/ml de sangue).

Após a coleta do sangue foram obtidas as amostras de lavado bronco-alveolar (BAL). Um cateter (21 G) acoplado a uma seringa foi introduzido na traqueia para que se pudesse injetar vagarosamente 1 mL de PBS estéril nos pulmões dos animais, sendo em seguida o BAL aspirado de volta à seringa. Esse procedimento foi repetido 3 vezes. Apenas as amostras nas quais o volume recuperado foi de pelo menos 80% do volume injetado foram analisadas.

As amostras de sangue e de BAL foram centrifugadas por 10 minutos a 3.000 g, onde foi obtido o plasma e o sobrenadante do BAL, que foram imediatamente congelados e armazenados em freezer -80° C por um período nunca superior a duas semanas. As amostras foram utilizadas para dosagens bioquímicas, conforme descrito no item 3.2.9. Para a dosagem de citocinas e de LXA₄, as amostras foram coletadas, imediatamente colocadas em gelo, e centrifugadas de maneira refrigerada (item 4.2.8).

4.2.5. Contagem total e diferencial de células

O sangue e o BAL foram diluídos em líquido de Türk e em seguida a contagem total de células foi feita em câmara de Neubauer. Para contagem diferencial de leucócitos, foram feitas lâminas de esfregaços sanguíneos e lâminas por citocentrifugação (BAL) que foram coradas utilizando o conjunto de reagentes Panótico rápido (Laborclin, Pinhais, PR, Brasil). O número de leucócitos nas amostras foi expresso como células $\times 10^3/\text{mm}^3$ de sangue e células $\times 10^6/\text{mL}$ de BAL.

4.2.6. Medida da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) em pulmão

Os pulmões dos animais foram homogeneizados em tampão EDTA / NaCl (pH 4,7) e centrifugados (10.000 g, 15 min, 4 °C). O precipitado foi suspenso em tampão 1 (NaCl 0,1 M, NaPO₄ 0,02 M, Na/EDTA 0,015 M; pH 7,4; 4 °C) e em seguida foram adicionadas as soluções de NaCl 0,2% e NaCl 1,6% + glicose 5% (todas as soluções a 4 °C). As amostras foram centrifugadas (10.000 g, 15 min, 4 °C) e o precipitado foi suspenso em tampão 2 (NaPO₄ 0,5 M e brometo de hexadeciltrimetilamônio - HTAB; 5%, p/v, pH 5,4). As amostras foram então congeladas em N₂ líquido e descongeladas 3 vezes. Após o último descongelamento, as amostras foram centrifugadas novamente (10.000 g, 15 min, 4°C) e o sobrenadante foi utilizado para o ensaio de determinação da atividade da enzima MPO como indicador da presença de neutrófilos ativados. Para o ensaio enzimático foi utilizada uma alíquota de 25 µL do sobrenadante. A reação enzimática foi desenvolvida na presença de tetrametilbenzidina (TMB) 1,6 mM, NaPO₄ 80 mM e H₂O₂ 0,3 mM. A absorbância foi medida em um leitor de placas a 690 nm (Infinite M200, Tecan Group Ltd, Suíça). A quantidade de proteína total foi estimada pelo método de Bradford (Bradford, 1976) e os valores foram apresentados na forma de unidades de densidade óptica (D.O.) / mg de proteína.

4.2.7. Quantificação de unidades formadoras de colônias (UFC) de bactérias nas amostras biológicas

A obtenção das amostras de sangue e de BAL foi idêntica à descrita no item 4.2.4, mas todo o procedimento foi feito em condição estéril. Foram semeados 10 μ L de sangue ou de BAL em placas de Petri contendo meio ágar Mueller-Hinton. As amostras foram semeadas puras ou em várias diluições seriadas distintas, todas realizadas em PBS estéril. Após a semeadura, as placas foram incubadas a 37°C por 24 h e foi contado o número de colônias, que foi expresso como logaritmo das unidades formadoras de colônias por mL (log de UFC/mL).

4.2.8. Dosagem de LXA₄ e de citocinas

Foram realizadas, de acordo com as recomendações do fabricante, as dosagens das citocinas pró- (TNF- α e IL-1 β) e anti-inflamatórias (IL-10) das amostras de plasma e de sobrenadante do BAL através de kits de ELISA (do inglês, *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*; PeproTech Inc, New Jersey, USA).

Para a dosagem de LXA₄ foi realizada a extração das amostras de BAL e de plasma com metanol e aplicadas em colunas de separação C₁₈ Sep-Pak (Waters® Corporation). A LXA₄ foi então eluída com formiato de etila, o qual foi evaporado por fluxo de N₂. Finalmente, o resíduo foi diluído em tampão apropriado e a quantificação de LXA₄ foi realizada por EIA (do inglês, *Enzyme Immunoassay*; Oxford Biomedical Research, Oxford, MI, USA).

4.2.9. Dosagens bioquímicas

4.2.9.1. Dosagem de nitrato e nitrito (NOx)

Os níveis de NO foram quantificados mensurando-se a soma das concentrações de nitrato + nitrito (NOx), utilizando o reagente de Griess (1% de sulfanilamida em 10% de ácido fosfórico/0,1% de alfa-naftil-etilenodiamina em água de Milli-Q) como previamente descrito (GRANGER *et al.*, 1990). O plasma e o BAL foram desproteinizados pela adição de sulfato de zinco (2%). Para a conversão do nitrato para

nitrito, as amostras foram incubadas a 37°C, durante 2 h, em presença de nitrato redutase expressa em *Escherichia coli* cultivada em anaerobiose. Após a conversão enzimática do nitrato a nitrito, as amostras foram centrifugadas para a remoção das bactérias, e 100 µL do sobrenadante misturados com o mesmo volume de reagente de Griess, produzindo cor lilás. O ensaio foi realizado em placas de 96 poços, sendo a leitura realizada em 540 nm em um leitor de microplacas (Infinite M200, Tecan Group Ltd, Suíça). Curvas-padrão de nitrito e nitrato (0 a 150 µM) foram realizadas simultaneamente. Como nestas condições a conversão de nitrato para nitrito foi sempre maior que 90%, não foram realizadas correções dos resultados, os quais foram expressos como µM de NOx.

4.2.9.2. Dosagem de marcadores de dano de órgãos

Foram realizadas as dosagens plasmáticas de lactato e creatinina, e avaliadas as atividades das enzimas aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT). Todas as dosagens foram realizadas de acordo com as instruções do fabricante, através de kits comercialmente disponíveis (Biolin, Belo Horizonte, MG). Com exceção do lactato que foi dosado pelo método UV enzimático, as demais dosagens foram colorimétricas. As leituras foram feitas em placas de 96 poços e registradas por absorbância em um leitor de microplacas (Infinite M200, Tecan Group Ltd, Suíça), sendo que as leituras foram feitas em 490 nm para creatinina, 550 nm para AST e ALT, e 340 nm para o lactato. Os valores foram calculados com base em um fator de calibração e expressos em mg/dL.

4.2.10. Imunoeletroforese – Western blotting

4.2.10.1. Preparação das amostras

Para obtenção dos tecidos, os animais foram anestesiados com uma mistura de tribromoetanol e cetamina (375 e 25 mg/kg; i.p.; respectivamente) e então foram perfundidos por via intracárdica com solução salina 0,9% a 4°C. Amostras de tecido pulmonar e de músculo cardíaco foram obtidas, imediatamente colocadas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer - 80 °C. Após a pulverização de ~ 200 mg de

cada tecido, foi adicionado tampão de lise [(Na₂VO₄ 100 mM, fluoreto de fenil-metano-sulfonil (PMSF) 100 mM, coquetel de inibidores de proteases 1% (P8340)] (Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, MO, EUA) em T-Per (Tissue Protein Extraction Reagent; Thermo Scientific, Rockford, IL, EUA), e as amostras foram homogeneizadas por sonicação (60 Watts, 5 segundos). Os homogenatos foram centrifugados a 14.000 g por 30 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi obtido, sendo uma alíquota separada para a dosagem de proteína em cada amostra, a qual foi determinada através do método de Bradford (Bradford, 1976). Ao restante do sobrenadante, foi adicionado o mesmo volume de tampão de amostra (glicerol 20%, mercaptoetanol 14,4 mM, azul de bromofenol 0,1%, Tris/HCl 0,2 M e SDS 10%). As amostras foram fervidas (95 °C; 10 min) e permaneceram armazenadas a -80 °C até o momento da eletroforese.

4.2.10.2. Separação de proteínas e imunodeteção

As proteínas foram separadas por eletroforese, sendo que foi utilizado um gel de separação (acrilamida 8%, bis-acrilamida 0,2%, Tris 375 mM, SDS 0,1%, TEMED 0,06% e persulfato de amônia 0,04%) e um gel de entrada (acrilamida 4%, bis-acrilamida 0,09%, Tris 125 mM, SDS 0,1%, TEMED 0,08% e persulfato de amônia 0,03%). As amostras (50 µg/poço) e o padrão (Precision Plus Protein™ Standards, Kaleidoscope™, BioRad, CA, EUA) foram aplicados nos géis e a eletroforese foi realizada a 90 V, por aproximadamente 3 h, utilizando-se tampão de corrida. Após a eletroforese, foi realizada a transferência das proteínas para uma membrana de nitrocelulose (100 V, 1 h, 4 °C).

Em seguida as membranas foram coradas (vermelho de Ponceau 0,2%, ácido tricloroacético 3%) para visualização das proteínas. Após lavagens em TBS-T (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, KH₂PO₄ 1,5 mM, Na₂HPO₄ 20 mM, Tween-20 0,05%), para a retirada do excesso do corante, iniciou-se o bloqueio da membrana com TBS-T contendo leite desnatado 5% por 1 hora a temperatura ambiente. Em seguida as membranas foram incubadas durante a noite a 4 °C com anticorpos específicos anti-NOS-1, NOS-2, NOS-3 (1:500; Santa Cruz

Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA) ou actina (1:1000; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA). Ao término do período de incubação, as membranas foram lavadas durante 30 minutos com TBS-T, e em seguida, incubadas com o anticorpo secundário anti-IgG conjugado com peroxidase (1:5000, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, EUA) por 1 h em temperatura ambiente. O excesso de anticorpo foi retirado através de lavagens em TBS-T e o processo de revelação se iniciou com a incubação da membrana na solução do kit de quimiluminescência (ECL; Thermo Scientific, Rockford, IL, EUA) e posterior acondicionamento em cassette de exposição com filme radiográfico. O tempo de exposição variou de 1 a 15 minutos, dependendo da proteína, e a revelação dos filmes foi realizada em máquina reveladora (SRX-101A; Konica Minolta, Japão). As análises quantitativas foram determinadas por densitometria das bandas, através do programa ImageJ® (versão 1.36b; NIH, Bethesda, MD, EUA).

4.2.11. Imunofluorescência

Os animais foram anestesiados com tribromoetanol e cetamina (375 e 25 mg/kg; i.p.; respectivamente) e perfundidos com solução salina (NaCl 0,9%; 4 °C; por 3 min), seguido de solução de paraformaldeído (PFA 4%). A traqueia foi localizada e os pulmões foram preenchidos com 1 mL de solução de PFA 4%, retirados e deixados nessa solução por 24 h para fixação. Então o tecido ficou armazenado em sacarose 20% por 24 h, quando então foi injetado novamente pela traqueia, 1 mL de solução de Tissue-Tek 25% em sacarose 4% nos pulmões. O lóbulo direito do pulmão foi congelado em Tissue-Tek, e com o auxílio de um criostato (Leica CM 1850 UV, Leica Biosystems, Wetzlar, Alemanha) foram obtidos cortes de 5 µm em lâminas gelatinizadas previamente. Os cortes foram contornados com caneta hidrofóbica, e foram bloqueados por 1 h com soro bovino fetal 5%. Após o bloqueio, os cortes foram incubados durante a noite, a 4 °C, com o anticorpo primário anti-FPR2 (1:100; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA). Um corte foi utilizado como controle negativo, isto é, não recebeu o anticorpo primário. No dia seguinte, os cortes foram lavados e incubados por 1 h com anticorpo secundário anti-IgG conjugado com Alexa Fluor 488

(1:1000). Após o período de incubação, os cortes foram novamente lavados e lâminulas foram colocadas sobre as lâminas utilizando meio de montagem aquoso Gel Mount™ (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA). As lâminas foram acondicionadas em ambiente escuro e úmido e mantidas a 4 °C até o momento da leitura.

A microscopia de fluorescência foi realizada (Olympus BX41, Olympus, Japão) e as imagens foram capturadas através do software QCapture Pro 5.1 (QImaging, Surrey, BC, Canada). Foram feitos pelo menos 3 cortes de pulmões (distanciados aproximadamente de 100 µm) de cada animal de cada grupo experimental (n = 3 por grupo). A imunomarcagem foi avaliada em 3 locais diferentes de cada corte (3 imagens por seção). Todas as imagens foram obtidas pelo mesmo microscópio e com as mesmas configurações. A quantificação relativa da intensidade de fluorescência foi realizada através da análise de densitometria óptica com o auxílio do programa ImageJ® (versão 1.36b; NIH, Bethesda, MD, EUA) e os valores foram expressos como unidades arbitrárias.

4.2.12. Citometria de fluxo

Amostras de BAL foram obtidas e incubadas por 5 minutos com solução de lise (Gibco® ACK *lysing buffer*, Invitrogen, UK). Em seguida, as células foram lavadas e centrifugadas (1200 g, 5 min, 4 °C). Alíquotas de $2-5 \times 10^5$ células foram suspensas em tampão de citometria (soro bovino fetal 1% em PBS) contendo 0,5 mg/mL de anti-FcγRIII/II (clone 2.4G2; BD Pharmingen, CA, EUA) e incubadas (1 h, 4 °C, escuro) com anticorpo anti-FPR2 (clone M-73; Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) e várias combinações de anticorpos específicos para as moléculas de superfície de interesse: CD11b-APC (cadeia αM de integrina, cadeia Mac-1α; clone M1/70), CD11c-PE-Cy7 (integrina αX; clone HL3), Gr-1-PE (Ly-6G e Ly-6C; clone RB6-8C5) (todos da BD Pharmingen, NJ, EUA) e F4/80 eFluor® 450 (marcador pan de macrófagos; clone BM8, eBioscience, CA, EUA) (Tabela 3).

Após este período, as amostras foram novamente lavadas e incubadas (0,5 h, 4°C, escuro) com anticorpo secundário anti-IgG conjugado com Alexa Fluor 488 (Invitrogen, UK). Após o tempo de incubação, as amostras foram centrifugadas (1200 g, 5 min, 4°C), o sobrenadante foi descartado, as células foram suspensas em tampão de citometria e adquiridas pelo citômetro de fluxo (FACSCanto II, BD Biosciences, CA, EUA). Dependendo do número de células disponíveis, foram analisados 30.000 ou 50.000 eventos por amostra. Os dados foram coletados com o programa FACSDiva (BD Biosciences, CA, EUA) e analisados usando-se o *software* Flowjo (Tree Star, Ashland, OR, EUA).

Tabela 3: Imunomarcadores utilizados no ensaio de citometria de fluxo

Marcadores	Descrição	Marcação positiva
CD11c	Integrina importante para a adesão e quimiotaxia de monócitos	DCs, Monócitos, MØ, NK
CD11b	Componente alfa de uma integrina importante para adesão	Monócitos, NK, Granulócitos, MØ
Gr-1	Antígeno de diferenciação de granulócitos-1	Granulócitos
F4/80	Antígeno expresso por macrófagos murinos	MØ

DCs: células dendríticas; MØ: macrófagos, NK: células “*natural killer*”

4.2.12.1. Estratégia de “gate” utilizada para determinação das populações estudadas

Primeiramente uma região, ou gate, foi escolhida ao redor da população de células de interesse, excluindo *debris* celulares ou grandes agregados da análise (G1). Em seguida, as células em G1 foram analisadas quanto à expressão de CD11c e subdivididas em CD11c- (G2) e CD11c+ (G3) (Esquema 9).

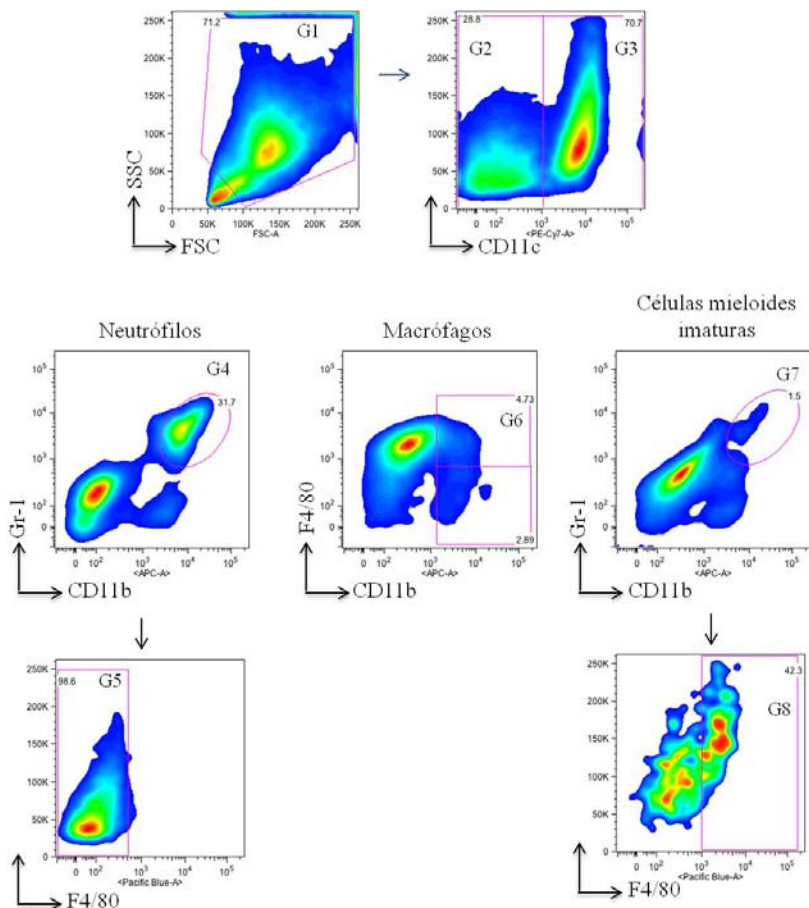
Para a caracterização fenotípica dos neutrófilos, as células em G2 foram analisadas quanto à expressão de CD11b e Gr-1, e as células duplo-positivas foram incluídas no G4. Considerando que neutrófilos são F4/80-, a região G5 foi delimitada para a análise da expressão do FPR2/ALX (Tabela 4 e Esquema 9).

Para a caracterização da população de macrófagos (Tabela 4 e Esquema 9), as células em G3 foram analisadas quanto à expressão de CD11b e F4/80, e as células duplo-positivas foram incluídas no G6 para a análise da expressão do FPR2/ALX.

Considerando que as células mieloides imaturas são CD11c+ CD11b+ Gr-1+ F4/80+ (Tabela 4 e Esquema 9), a expressão do FPR2/ALX foi analisada na população de células em G8.

Tabela 4: Classificação das células do BAL de acordo com seus marcadores

Células	Marcação
Macrófagos	CD11c+ CD11b+ F4/80+
Neutrófilos	CD11c- CD11b+ Gr-1+ F4/80-
Células mieloides imaturas	CD11c+ CD11b+ Gr-1+ F4/80+



Esquema 9: Estratégia de “gate” utilizada nos ensaios de citometria de fluxo.

As células contadas em G1 representam a população total de células avaliadas. Em G2 está a representação das células CD11c- e em G3 as células CD11c+. Os neutrófilos foram definidos como CD11c- CD11b+ Gr-1+ (G4) e F4/80- (G5). Os macrófagos estão representados em G6 (CD11c+ CD11b+ F4/80+). As células mieloides imaturas foram definidas como CD11c+ CD11b+ Gr-1+ (G7) e F4/80+ (G8).

4.3. Protocolos experimentais

4.3.1. Padronização do modelo experimental de sepse induzida por pneumonia

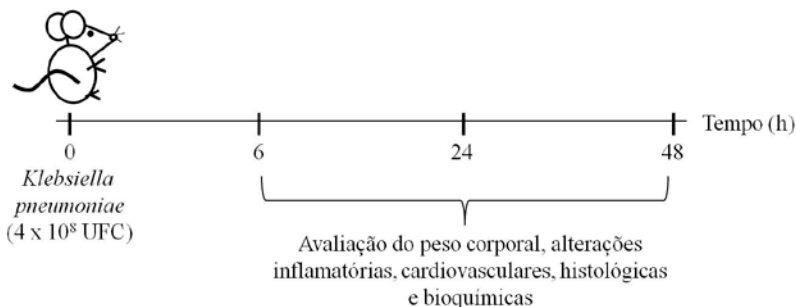
Com a finalidade de se determinar a quantidade de UFC de *Klebsiella pneumoniae* suficientes para ocasionar uma sepse severa nos animais, foram realizados experimentos onde foram inoculadas quantidades crescentes de bactéria e a sobrevivência destes animais foi acompanhada a cada 12 h ao longo de 72 h.

O número de bactérias viáveis inoculadas por via i.t. por animal foi de 1, 2, 3, 4, 5 e 10×10^8 UFC. Neste período, os animais foram mantidos em local com temperatura e ciclo de luz claro/escuro (12/12 h) controlado automaticamente, com livre acesso à ração e água.



Esquema 10: Protocolo experimental 1. Avaliação da sobrevivência de animais submetidos à sepse induzida por pneumonia.

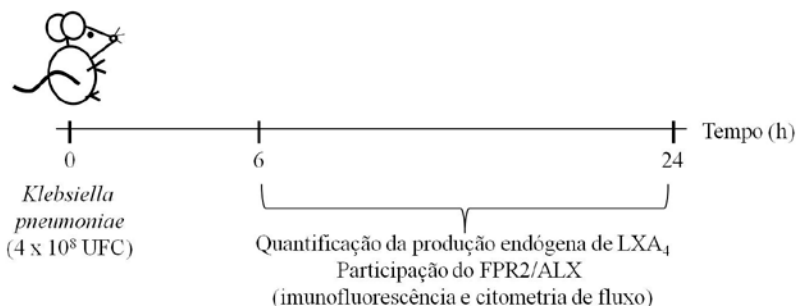
Com base no experimento de sobrevivência, foi escolhido o número de 4×10^8 UFC/animal para a realização dos demais experimentos, os quais foram realizados em sua maioria, em 6, 24 e 48 h após a infecção.



Esquema 11: Protocolo experimental 2. Avaliação das alterações inflamatórias, cardiovasculares, histológicas e bioquímicas de animais submetidos à sepse induzida por pneumonia.

4.3.2. Participação da LXA₄ na fisiopatologia da sepse

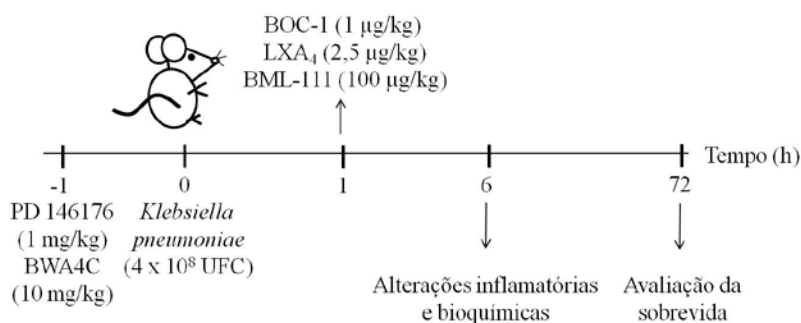
Baseado nos experimentos de padronização do modelo, estudamos a participação da LXA₄ na fisiopatologia da sepse nos tempos de 6 h e 24 h após a inoculação da bactéria. Avaliamos tanto a produção endógena de LXA₄ quanto a participação do seu principal receptor (FPR2/ALX).



Esquema 12: Protocolo experimental 3. Avaliação da participação da LXA₄ na sepse.

4.3.3. Avaliação da modulação da via LXA₄ – FPR2/ALX na sepse

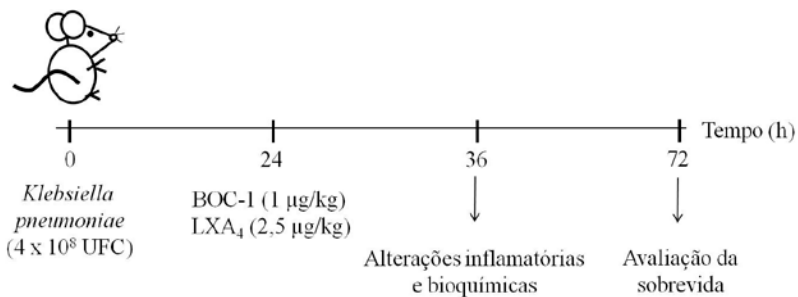
Foram realizadas duas abordagens distintas de modulação do sistema LXA₄-FPR2/ALX na sepse induzida por pneumonia. A primeira envolveu a modulação precoce do sistema através da administração de agonistas (LXA₄ e BML-111) e do antagonista (BOC-1) do receptor FPR2/ALX 1 h após a indução da sepse. E então, 5 h após o tratamento, ou seja, 6 h após a inoculação da bactéria, foram realizados estudos de parâmetros inflamatórios e bioquímicos, bem como o acompanhamento da sobrevivência dos animais ao longo de 72 h. Adicionalmente um grupo de animais recebeu o inibidor da 15-LOX, PD 146176 (ToCRIS Bioscience, Bristol, UK), e outro grupo recebeu o inibidor da 5-LOX (BWA4C; Wellcome Research Laboratories, Londres, UK) 1 h antes da inoculação da bactéria. Seis horas após, foram avaliados parâmetros inflamatórios dos animais.



Esquema 13: Protocolo experimental 4. Modulação inicial da via FPR2-LXA₄ na sepse.

A modulação tardia do sistema se deu com a administração do agonista (LXA₄) e do antagonista (BOC-1) do receptor FPR2/ALX 24 h após a indução da sepse, e avaliações foram realizadas 12 h após o tratamento, ou seja, 36 horas após a inoculação da bactéria. Da mesma

maneira que a abordagem descrita anteriormente, foi realizado o acompanhamento da sobrevivência dos animais por até 72 h.



Esquema 14: Protocolo experimental 5. Modulação tardia da via FPR2-LXA₄ na sepse.

4.4. Análise estatística

As análises estatísticas das curvas de sobrevivência foram realizadas pelo teste de log-rank. As diferenças entre as curvas representativas de cada grupo experimental foram consideradas significativamente diferentes quando $p < 0,05$. As demais análises estatísticas não paramétricas foram realizadas através dos testes de Kruskal-Wallis seguido pelo *post hoc* de Dunn ou pelo teste de Mann-Whitney, conforme indicado na legenda das figuras.

Os demais resultados foram expressos como a média \pm erro padrão da média e a estatística foi realizada pela análise de variância (ANOVA) de uma ou duas vias seguida pelo *post hoc* de Dunnett ou Bonferroni, respectivamente, conforme a necessidade e pertinência. Quando necessário, os valores foram transformados em logaritmos para alcançarem normalidade e homogeneidade de variância, os quais foram comprovados através dos testes de Kolmogorov-Smirnov e de Bartlett, respectivamente. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos. Todos os testes estatísticos foram realizados com o programa GraphPad Prism® (San Diego, CA, USA).

4.5. Reagentes

As seguintes substâncias foram utilizadas neste estudo: N-t-Boc-Met-Leu-Phe (BOC-1; MP Biomedicals, Solon, OH, USA), 5(S),6(R)-Lipoxina A₄ e 5(S),6(R),7- metil-éster-ácido-triidroxiheptaenóico (BML-111) foram adquiridos da Cayman Chemical Company (Ann Harbor, MI, USA), 6,11-diidro-1-benzotiopirano-4,3-indol (PD 146176; Tocris Bioscience, Bristol, UK), N-hidroxi-N-[(E)-3-[3-(fenoxi)-fenil]-2-propenil]-acetamida (BWA4C; Wellcome Research Laboratories, Londres, UK), coquetel de inibidores (P8340), cloridrato de fenilefrina, tribromoetanol e meio de montagem aquoso Gel Mount™ foram adquiridos da Sigma-Aldrich Co. LLC (St Louis, MO, EUA), cetamina (Parke-Davis, São Paulo, SP, Brasil), kit de quimioluminescência ECL e T-Per foram adquiridos da Thermo Scientific (Rockford, IL, EUA), padrão de peso molecular (Precision Plus Protein™ Standards, Kaleidoscope™, BioRad, CA, EUA), heparina (Cristália, São Paulo, SP, Brazil), anticorpos anti-NOS-1, NOS-2, NOS-3, actina e FPR2/ALX (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), anticorpos conjugados com fluorocromos CD11b-APC (cadeia α M de integrina, cadeia Mac-1 α ; clone M1/70), CD11c-PE-Cy7 (integrin α X; clone HL3), Gr-1-PE (Ly-6G e Ly-6C; clone RB6-8C5) e anti-Fc γ III/II (clone 2.4G2) foram adquiridos da BD Pharmingen (Franklin Lakes, NJ, USA), F4/80 eFluor® 450 (marcador pan de macrófagos; clone BM8) da eBioscience (San Diego, CA, USA), anti-IgG conjugado com Alexa Fluor 488 foi adquirido da Invitrogen (Paisley, UK), kits bioquímicos de ureia, creatinina, lactato, TGO e TGP foram adquiridos da Bioclin (Belo Horizonte, MG). O restante dos sais e compostos foi adquirido de companhias com comprovada certificação de qualidade.

5. RESULTADOS

5.1. Sobrevida após a inoculação de *Klebsiella pneumoniae*

Primeiramente foi investigada a possível relação entre o número de UFC de *K. pneumoniae* inoculadas nos animais e a sobrevida destes por até 72 h após a inoculação. Como podemos observar na Figura 1, há uma relação dose-dependente entre o número de UFC de bactérias inoculadas e a taxa de mortalidade dos animais. A taxa de sobrevida em 72 h foi de 100%, 85%, 57%, 42%, 28% e 0% nos grupos inoculados com 1, 2, 3, 4, 5 e 10 x 10⁸ UFC por animal, respectivamente. Assim como os animais que receberam 1 x 10⁸ UFC, todos os animais controle (os quais receberam a inoculação de PBS i.t.) sobreviveram. Com base no resultado dessa curva, para os demais experimentos o número de 4 x 10⁸ UFC por animal foi escolhido por apresentar uma taxa de mortalidade em torno de 60%, e os demais parâmetros foram avaliados em sua maioria, em 6 h, 24 h e 48 h após a inoculação da bactéria.

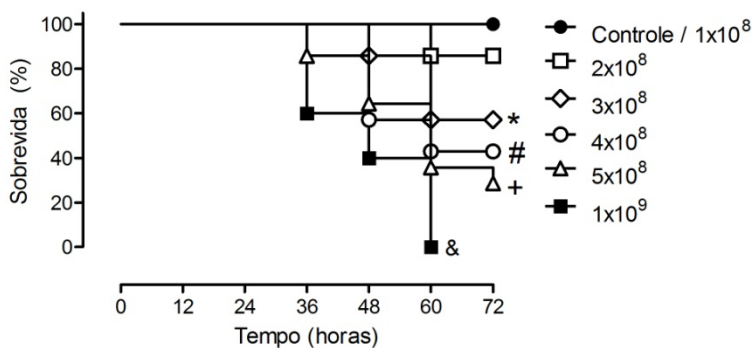


Figura 1: Curva de sobrevida após a inoculação de *Klebsiella pneumoniae* em camundongos. Os animais foram inoculados (i.t.) com *K. pneumoniae* (1, 2, 3, 4, 5 e 10 x 10⁸ UFC) e a sobrevida foi avaliada por até 72 h. Os animais controle receberam a inoculação do mesmo volume de PBS e assim como o grupo que recebeu 1 x 10⁸ UFC, todos sobreviveram. Os resultados foram expressos como porcentagem de sobrevivência e são representativos de dois experimentos diferentes. A análise estatística utilizada foi o teste de log rank *p = 0.046; #p = 0.0159; +p = 0.0034 e &p = 0.0004 quando comparado ao grupo controle. n = 10 por grupo.

5.2. Avaliação do peso corporal

Foi realizada a avaliação do peso corporal dos animais inoculados com *K. pneumoniae* ao longo de 72 h. A Figura 2 ilustra que nas primeiras 24 h após a cirurgia, os animais sépticos perderam ~ 8% de peso, sendo que os animais controle perderam ~ 5%. A perda de peso dos animais sépticos persistiu até o último momento de análise, sendo que os animais controle começaram a recuperar o peso a partir de 60 h.

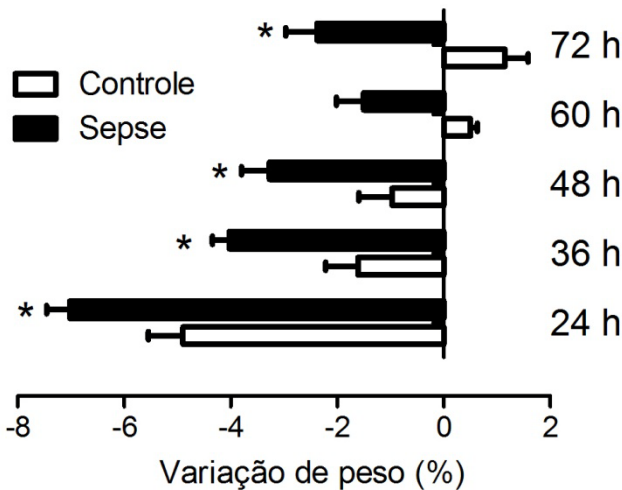


Figura 2: Avaliação do peso corporal após a inoculação de *Klebsiella pneumoniae* em camundongos. Os animais foram inoculados (i.t.) com 4×10^8 UFC de *K. pneumoniae* e o peso corporal foi avaliado por até 72 h. Os animais controle receberam a inoculação do mesmo volume de PBS. Os resultados foram expressos como porcentagem de perda de peso em relação ao peso inicial dos animais no momento da inoculação de bactérias. Os valores representam a média \pm erro padrão da média de 5 animais. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle (ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguido pelo *post hoc* de Bonferroni).

5.3. Análise histopatológica dos pulmões e composição do lavado bronco-alveolar

Para avaliar o impacto da infecção no local, foi realizada a análise histológica do tecido pulmonar e a composição do lavado bronco-alveolar dos animais. Podemos observar, na Figura 3, as imagens representativas de secções de tecido pulmonar de camundongos inoculados com *K. pneumoniae* nos tempos de 6 h (Figura 3B), 24 h (Figura 3C) e 48 h (Figura 3D) após o procedimento. A histologia pulmonar representativa do animal controle é mostrada na Figura 3A. Seis horas após a infecção, os pulmões dos animais já apresentaram um importante infiltrado inflamatório, o qual é maior nos tempos de 24 h e 48 h após a inoculação. Foi realizada a quantificação do dano microscópico pulmonar através da atribuição de escores (Seção 4.2.3, Tabela 2), a qual está ilustrada Figura 3D.

Para avaliar quais foram as principais células inflamatórias que migraram para o foco infeccioso, foram realizadas as contagens totais e diferenciais das amostras de lavado bronco-alveolar dos animais sépticos. O conteúdo inflamatório já foi significativamente elevado 6 h após a inoculação da bactéria, sendo ainda maior no tempo de 24 h, onde foi observado o aumento máximo (Figura 4A). A maior parte do infiltrado foi de leucócitos polimorfonucleares (Figura 4B). Embora em menor magnitude, também houve o aumento de células mononucleares (Figura 4C).

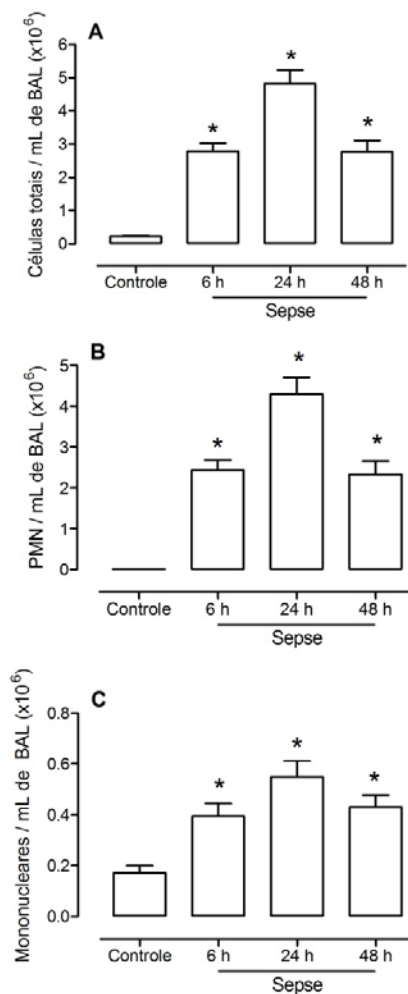


Figura 4: Avaliação das células do lavado bronco-alveolar de camundongos inoculados com *K. pneumoniae*. Seis, 24 h e 48 h após a inoculação (i.t.) de 4×10^8 UFC de *K. pneumoniae*, os camundongos foram sacrificados e o BAL foi obtido. O número total de células (A), polimorfonucleares (B) e mononucleares (C) é mostrado na figura. Os valores representam a média \pm erro padrão da média de 7 animais. Para a análise estatística, os valores foram transformados como descrito na seção 4.4 para alcançarem normalidade e homogeneidade de variância. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle (ANOVA de uma via seguida pelo *post hoc* de Dunnnett).

5.4. Contagem total e diferencial de leucócitos sanguíneos

Como observamos na Figura 5A, os animais sépticos desenvolveram uma leucopenia grave 6 h após a infecção, a qual persistiu até as 24 h. No tempo de 48 h, os valores foram similares aos dos animais controle. A leucopenia foi causada principalmente pela redução do número de células polimorfonucleares (Figura 5B) e de monócitos (Figura 5D), enquanto que o número de linfócitos apenas reduziu no tempo de 24 h (Figura 5C).

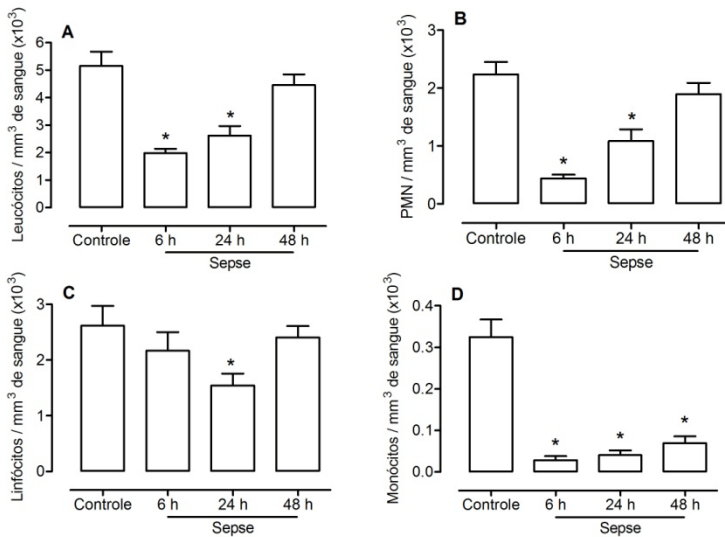


Figura 5: Leucócitos sanguíneos de camundongos inoculados com *K. pneumoniae*. Seis, 24 h e 48 h após a inoculação (i.t.) de 4×10^8 UFC de *K. pneumoniae*, os camundongos foram sacrificados e o sangue foi obtido por punção cardíaca. O número total de leucócitos (A), de polimorfonucleares (B), de linfócitos (C) e de monócitos (D) é mostrado na figura. Os valores representam a média \pm erro padrão da média de 7 animais. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle (ANOVA de uma via seguida pelo *post hoc* de Dunnett).

5.5. Atividade da enzima mieloperoxidase

O recrutamento de neutrófilos para os pulmões dos animais também foi quantificado indiretamente através da medida da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO). Podemos observar na Figura 6 que há o aumento da atividade da MPO nos pulmões dos animais 6 h após a infecção, e este aumento persiste por até 48 h.

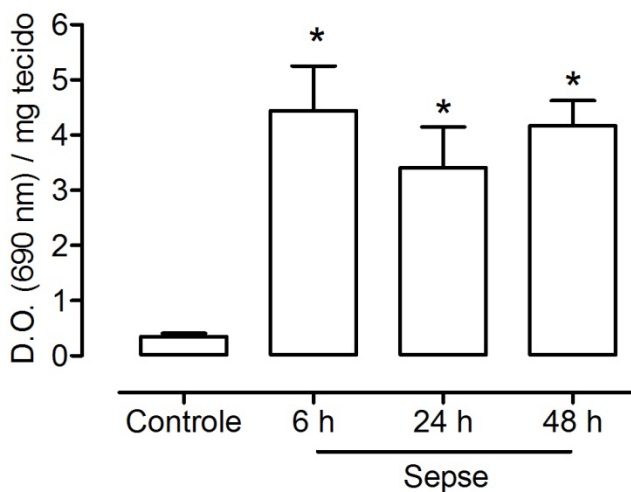


Figura 6: Atividade da enzima mieloperoxidase nos pulmões de camundongos inoculados com *K. pneumoniae*. Seis, 24 h e 48 h após a inoculação (i.t.) de 4×10^8 UFC de *K. pneumoniae*, os camundongos foram sacrificados e amostras de tecido pulmonar foram obtidas e processadas para avaliação da atividade da mieloperoxidase (MPO). Os resultados representam a média \pm erro padrão da média de 8 animais por grupo. * $p < 0,05$, em relação ao grupo controle (ANOVA de uma via seguida pelo *post hoc* de Dunnett).

5.6. Mensuração do processo infeccioso

Foi avaliada a magnitude do processo infeccioso através da disseminação de bactérias nos animais sépticos. A Figura 7 ilustra a carga bacteriana (UFC) das amostras de BAL (A), sangue (B), e em homogenatos de tecido esplênico (C) e cardíaco (D). Como pode ser observado, há um grande número de UFC de *K. pneumoniae* nas amostras de BAL, e a infecção foi rapidamente abolida no sangue dos animais. Nos órgãos avaliados observamos algumas UFC por pelo menos até 48 h. Dessa maneira, esses resultados ilustram que há primeiramente uma infecção local (foco), e que esse processo infeccioso foi capaz de se disseminar em todo o animal.

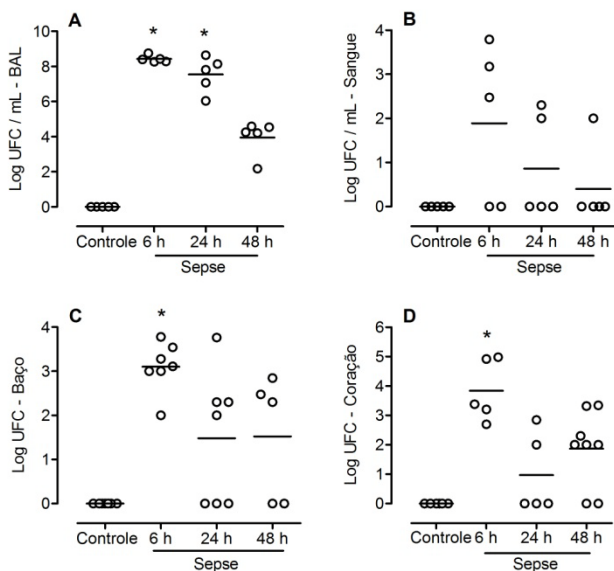


Figura 7: Quantificação de bactérias nos camundongos inoculados com *K. pneumoniae*. Seis, 24 h e 48 h após a inoculação (i.t.) de 4×10^8 UFC de *K. pneumoniae*, os camundongos foram sacrificados e as amostras de lavado broncoalveolar (A), sangue (B), baço (C) e coração (D) foram obtidas, diluídas e semeadas em ágar Mueller-Hinton e incubadas por 24 h. Os animais controle receberam PBS, e como não houve diferença, foram agrupados. Os resultados foram expressos como log de unidades formadoras de colônias (UFC) por mL (sangue e BAL) ou UFC por órgão (baço e coração), $n = 5$ a 7 animais por grupo experimental. * $p < 0,05$, em relação ao grupo controle (Kruskal-Wallis seguido pelo *post hoc* de Dunn).

5.7. Avaliação de citocinas pró e anti-inflamatórias

A presença de citocinas na circulação é um importante marcador da inflamação sistêmica que ocorre na sepse, sendo as principais citocinas pró-inflamatórias a IL-1 β e o TNF- α . Sendo assim, avaliamos a presença destas citocinas pró-inflamatórias nas amostras de BAL e de plasma dos animais. O pico de aumento de TNF- α no BAL dos animais sépticos foi observado em 6 h (Figura 8A), enquanto que no plasma, o seu pico foi em 24 h após a inoculação (Figura 8B). A IL-1 β também aumentou no BAL (Figura 8C) e no plasma (Figura 8D) nos momentos iniciais após a infecção, permanecendo aumentada em todos os períodos avaliados.

Também avaliamos o perfil da citocina anti-inflamatória IL-10. Diferente das citocinas anteriores, a IL-10 aumentou no BAL dos animais sépticos apenas 24 h após a infecção (Figura 8E) e no plasma não apresentou diferença significativa entre os grupos (Figura 8F).

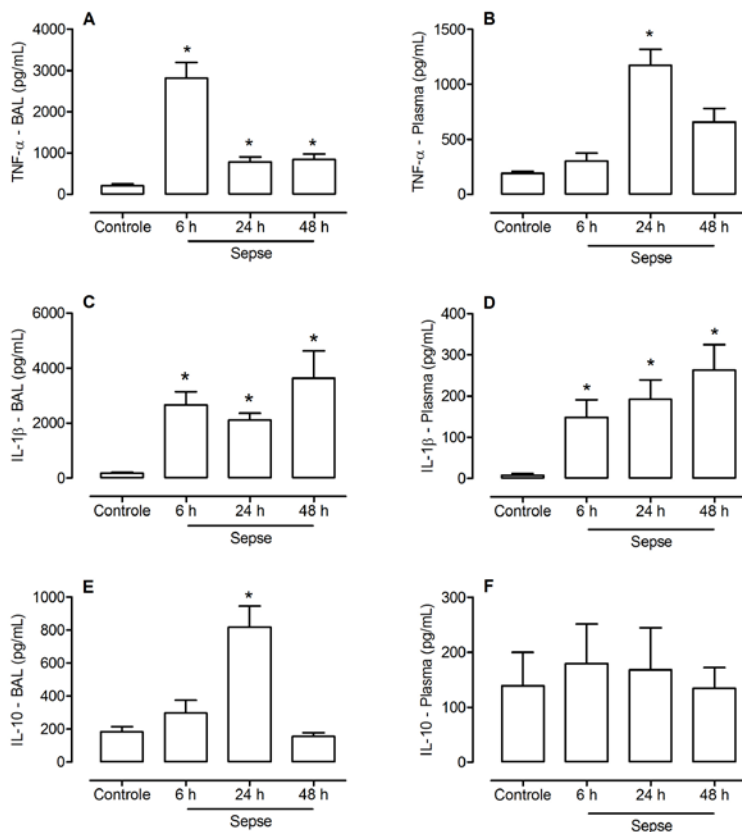


Figura 8: Dosagem de citocinas pró e anti-inflamatórias no BAL e no plasma de camundongos inoculados com *K. pneumoniae*. Seis, 24 h e 48 h após a inoculação (i.t.) de 4×10^8 UFC de *K. pneumoniae*, os camundongos foram sacrificados e as amostras de lavado bronco-alveolar (A, C e E) e plasma (B, D e F) foram obtidas e ensaiadas para dosagem de TNF- α (A e B), IL-1 β (C e D) e IL-10 (E e F) por ELISA. Os resultados representam a média \pm erro padrão da média de 8 animais por grupo. Para a análise estatística, os valores foram transformados como descrito na seção 4.4 para alcançarem normalidade e homogeneidade de variância. * $p < 0,05$, em relação ao grupo controle (ANOVA de uma via seguido pelo *post hoc* de Dunnett).

5.8. Avaliação da expressão das enzimas óxido nítrico sintases (NOS) e da produção de óxido nítrico

Outro importante marcador da sepse é a produção de óxido nítrico (NO) pelas enzimas NOS, principalmente, pela isoforma induzida (NOS-2). Assim, avaliamos o perfil de expressão das três isoformas das NOS (NOS-1, neuronal; NOS-2, induzida; NOS-3, endotelial) nas amostras de pulmão e coração, bem como quantificamos o NO (nitrito+nitrato) no BAL e no plasma dos animais.

Como podemos observar, houve o aumento da expressão da isoforma NOS-2 nas amostras de pulmão e de coração dos animais sépticos 24 h após a infecção, que foi ainda maior em 48 h (Figuras 9A, 9B, 9E e 9F). Em relação à expressão das enzimas NOS-1 (Figuras 9A a 9D) e NOS-3 (Figuras 9A, 9B, 9G e 9H) nos pulmões e corações dos animais, também não houve diferença estatística entre os grupos nos tempos avaliados.

Coincidindo com o pico de expressão da NOS-2 nas amostras de pulmão dos animais sépticos, observamos o aumento da quantidade de NO tanto no BAL (Figura 10A) quanto no plasma dos animais (Figura 10B) 24 h após a infecção, sendo o pico de produção de NO em 48 h.

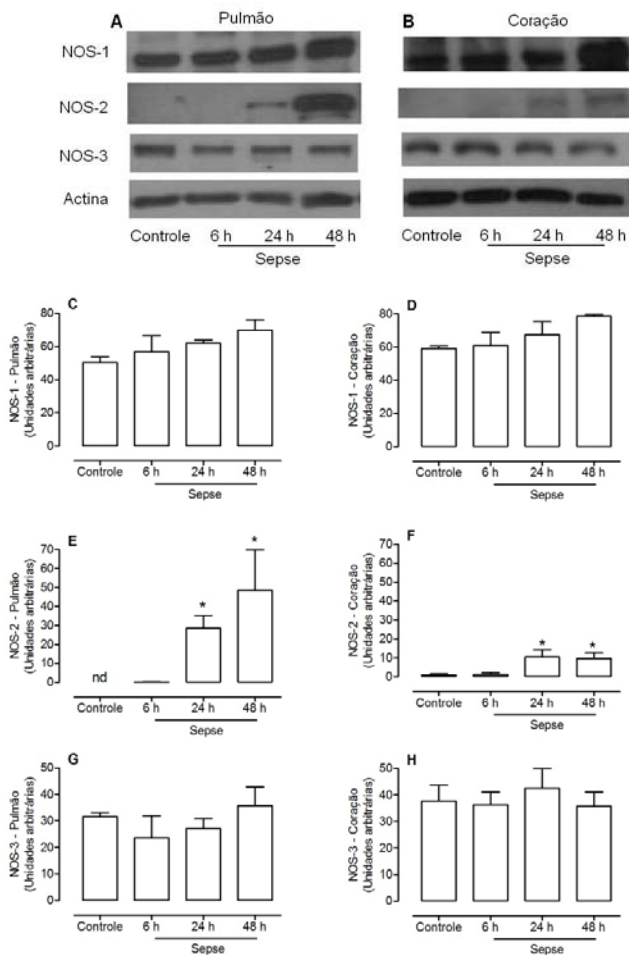


Figura 9: Avaliação da expressão das enzimas NOS-1, NOS-2 e NOS-3 em camundongos inoculados com *K. pneumoniae*. Seis, 24 h e 48 h após a inoculação (i.t.) de 4×10^8 UFC de *K. pneumoniae*, os camundongos foram sacrificados e amostras de tecido pulmonar (A, C, E e G) e cardíaco (B, D, F e H) foram obtidas e processadas para avaliação da expressão da NOS-1 (C e D), NOS-2 (E e F) e NOS-3 (G e H). A densidade das bandas foi medida através do programa ImageJ® e expressa como unidades arbitrárias. Os resultados representam a média \pm erro padrão da média de 8 animais por grupo. Para a análise estatística, os valores foram transformados como descrito na seção 4.4 para alcançarem normalidade e homogeneidade de variância. * $p < 0,05$, em relação ao grupo controle (ANOVA de uma via seguida pelo *post hoc* de Dunnett). nd = não detectado.

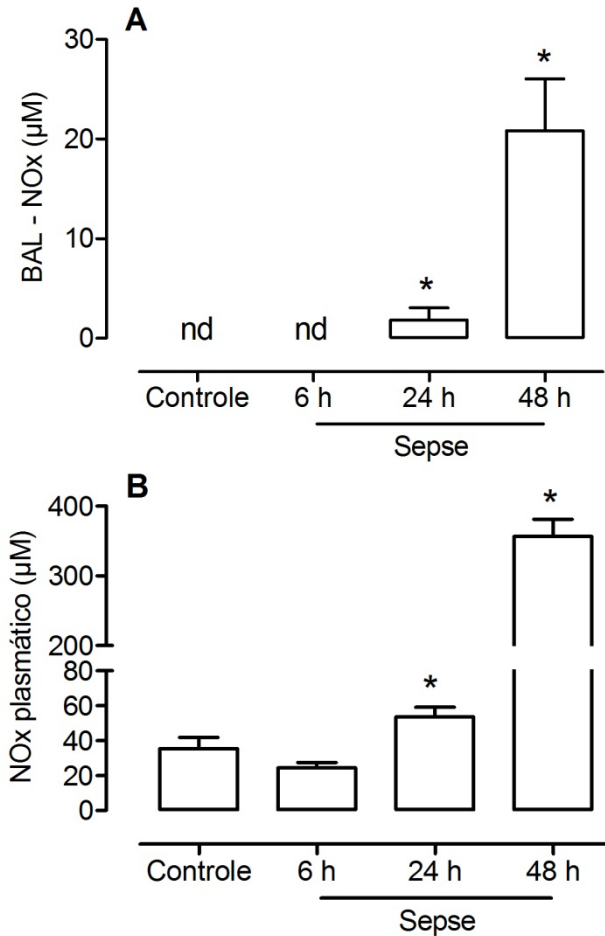


Figura 10: Dosagem de nitrito + nitrato (NOx) no BAL e no plasma de camundongos inoculados com *K. pneumoniae*. Seis, 24 h e 48 h após a inoculação (i.t.) dos animais com 4×10^8 UFC de *K. pneumoniae*, os camundongos foram sacrificados e as amostras de plasma e BAL foram obtidas e processadas para a quantificação de NOx pelo método de Griess. Os resultados representam a média \pm erro padrão da média de 8 animais por grupo. Para a análise estatística, os valores foram transformados como descrito na seção 4.4 para alcançarem normalidade e homogeneidade de variância. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle (ANOVA de uma via seguida pelo *post hoc* de Dunnett). nd = não detectado.

5.9. Avaliação de parâmetros cardiovasculares

Dentre as principais características do choque séptico estão hipotensão e hiporreatividade a agentes vasoconstritores. Podemos observar na Figura 11, que em 6 h, 24 h e 48 h após a inoculação da *K. pneumoniae*, os animais desenvolveram uma hipotensão sustentada (A), aumento de frequência cardíaca (B) e uma resposta reduzida ao agente vasoconstritor fenilefrina (C), caracterizando assim, a instalação de um quadro de choque séptico.

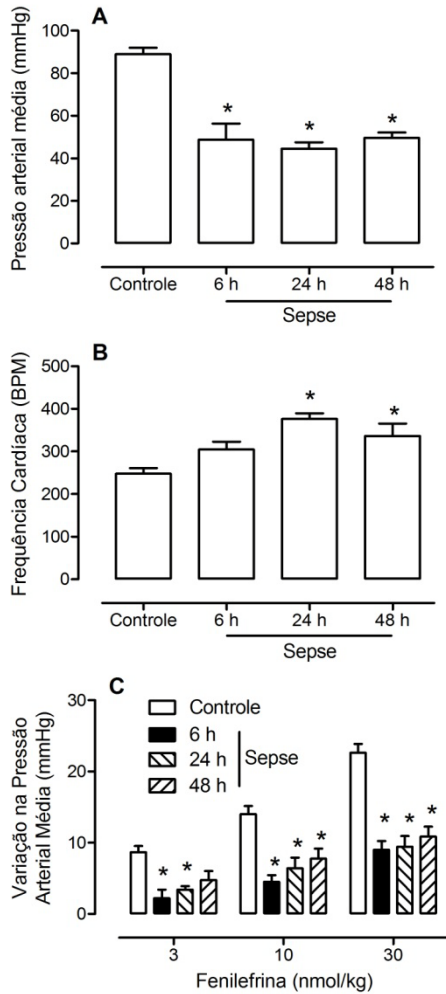


Figura 11: Avaliação de parâmetros cardiovasculares após a inoculação de *Klebsiella pneumoniae* em camundongos. Os animais foram inoculados (i.t.) com 4×10^8 UFC de *K. pneumoniae* e 6 h, 24 h e 48 h após, os animais foram anestesiados e preparados para o registro da pressão arterial média (Painel A), frequência cardíaca (Painel B) e tiveram uma curva de fenilefrina registrada (Painel C). Como não houve diferença entre os horários dos animais controle, eles foram agrupados. Os valores representam a média \pm erro padrão da média de 4 a 6 animais. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle (ANOVA de uma via seguida pelo *post hoc* de Dunnett).

5.10. Marcadores de dano de órgãos

Para uma melhor compreensão do modelo experimental, também foi realizada a avaliação de alguns marcadores plasmáticos de disfunção de órgãos: lactato (marcador de hipoperfusão tecidual), creatinina (marcador de dano renal), aspartato aminotransferase (AST; marcador de dano hepático e renal), e alanina aminotransferase (ALT; marcador de dano hepático e muscular). Podemos observar na Figura 12 a presença de hipoperfusão tecidual pelo aumento do lactato plasmático em 24 h, sendo que este permaneceu elevado pelo menos até as 48 h (A). Foi também observado dano renal agudo pelo aumento dos níveis de creatinina 24 h após a infecção (B) e também de AST em 6 h e 24 h (C), os quais retornaram aos níveis basais em 48 h. A infecção por *K. pneumoniae* também levou a uma possível disfunção hepática evidenciada pelo aumento dos níveis plasmáticos de AST (C) e ALT (D) em 6 h e 24 h, os quais também encontravam-se normais 48 h após a infecção.

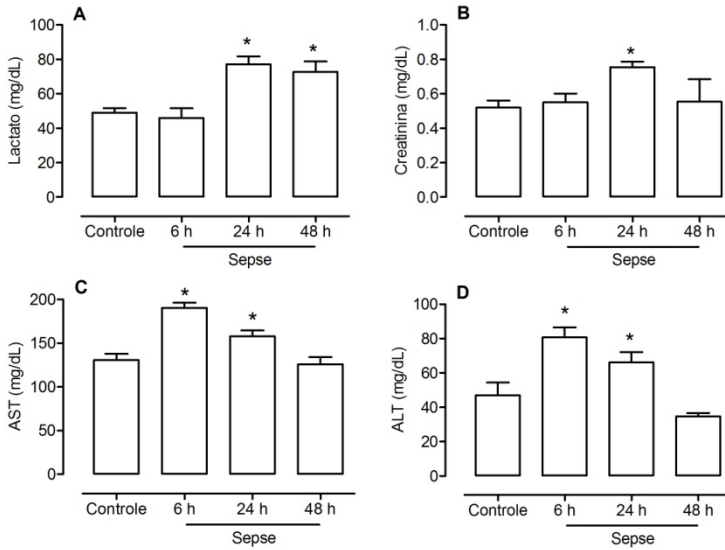


Figura 12: Dosagem de marcadores de danos de órgãos em camundongos inoculados com *K. pneumoniae*. Seis, 24 h e 48 h após a inoculação (i.t.) dos animais com 4×10^8 UFC de *K. pneumoniae*, os camundongos foram sacrificados e as amostras de plasma foram obtidas e ensaiadas para dosagem de lactato (A), creatinina (B), aspartato aminotransferase (AST; C) e alanina aminotransferase (ALT; D). Os resultados representam a média \pm erro padrão da média de 8 animais por grupo. * $p < 0,05$, em relação ao grupo controle (ANOVA de uma via seguida pelo *post hoc* de Dunnett).

5.11. Participação da Lipoxina A₄ no modelo de choque séptico induzido por pneumonia

Considerando todos os parâmetros avaliados anteriormente, as principais alterações no modelo foram observadas nos tempos de 6 h e 24 h após a infecção. Sendo assim, os estudos para avaliar a participação da LXA₄ neste modelo foram realizados nestes tempos.

Como observado na Figura 13, seis horas após a infecção houve um aumento de 25% na concentração de LXA₄ no BAL dos animais sépticos quando comparado aos animais controle (A). Vinte e quatro horas após, a concentração de LXA₄ no BAL dos animais sépticos era similar à dos animais controle. Já as concentrações plasmáticas de LXA₄ não diferiram entre os grupos experimentais em nenhum dos tempos avaliados (B).

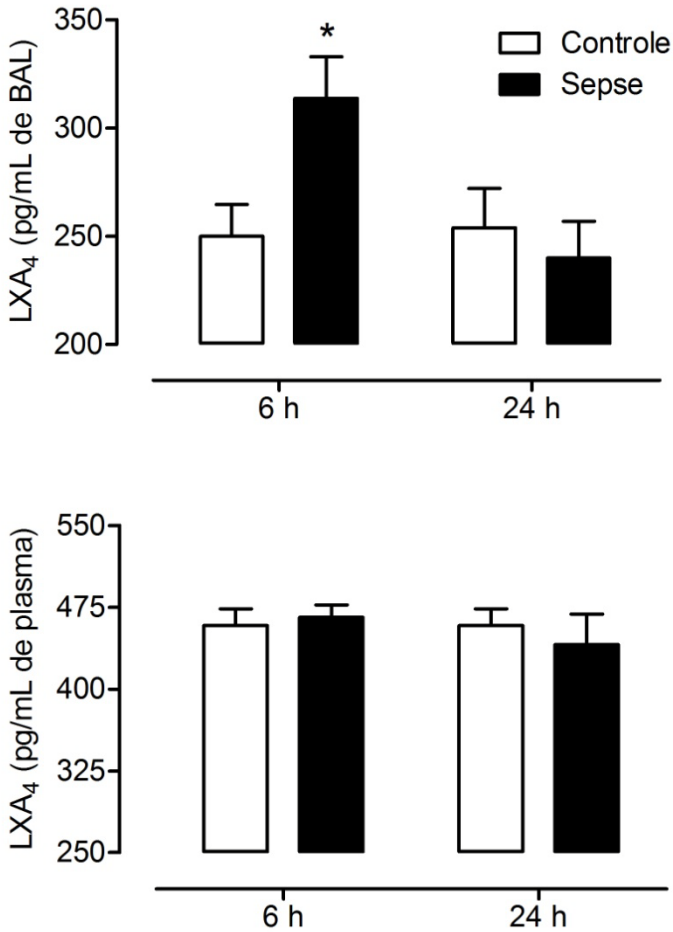


Figura 13: Quantificação da produção endógena de LXA₄ em camundongos inoculados com *K. pneumoniae*. Seis e 24 h após a inoculação (i.t.) dos animais com 4×10^8 UFC de *K. pneumoniae*, os camundongos foram sacrificados e as amostras de plasma e BAL foram obtidas, extraídas e processadas para a quantificação da produção endógena de LXA₄ pelo método de EIA. As barras representam a média \pm erro padrão da média de 6 a 8 animais por grupo. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle (ANOVA de duas via seguida pelo *post hoc* de Bonferroni).

5.12. Avaliação da expressão do receptor FPR2/ALX no tecido pulmonar por imunofluorescência

A LXA₄ atua principalmente no receptor acoplado à proteína G, o FPR2/ALX. Podemos observar na Figura 14 que a indução de sepse levou ao aumento da expressão do receptor FPR2/ALX no tecido pulmonar. A expressão do FPR2/ALX no epitélio pulmonar dos animais sépticos aumentou no tempo de 6 h após a infecção (B), sendo este aumento ainda maior 24 h após (C), quando comparado aos animais controle (A).

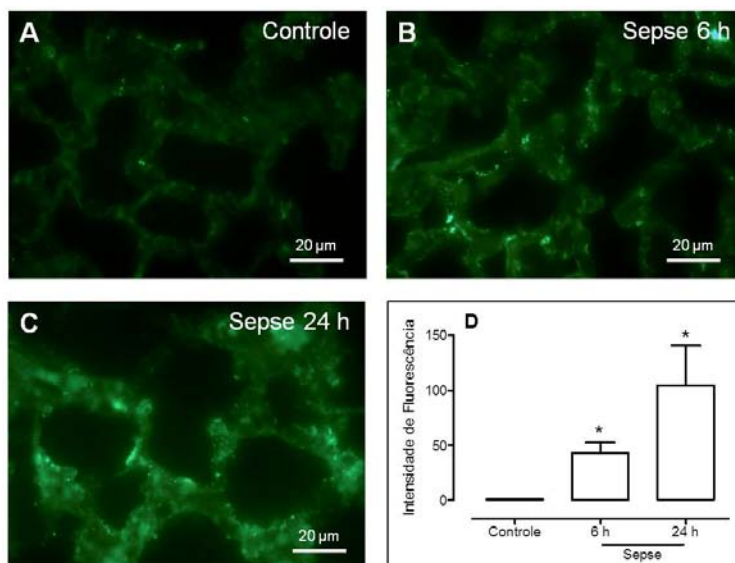


Figura 14: Imunofluorescência para FPR2/ALX em tecido pulmonar de camundongos inoculados com *K. pneumoniae*. Seis e 24 h após a inoculação (i.t.) dos animais com 4×10^8 UFC de *K. pneumoniae*, os camundongos foram sacrificados e amostras de pulmão foram obtidas e processadas para a realização da imunofluorescência para o receptor FPR2/ALX. As imagens são de cortes representativos de pulmão de animais controle (A), sepse 6 h (B) e sepse 24 h (C). A quantificação foi realizada através do programa ImageJ® e expressa como unidades arbitrárias (D), onde os resultados representam a média \pm erro padrão da média de 4 animais por grupo. Para a análise estatística, os valores foram transformados como descrito na seção 4.4 para alcançarem normalidade e homogeneidade de variância. * $p < 0,05$, em relação ao grupo controle (ANOVA de uma via seguida pelo *post hoc* de Dunnett).

5.13. Avaliação da expressão do FPR2/ALX nas células do BAL por citometria de fluxo

Foi realizado o ensaio de citometria de fluxo nas células do BAL dos animais para o estudo da expressão do receptor FPR2/ALX. Primeiramente, as populações celulares foram avaliadas quanto ao tamanho e granulosidade e, em seguida, foi analisada a expressão de determinadas moléculas na superfície da membrana celular, conforme descrito na seção 4.2.12.1. A representação das populações de células dos animais controle e sépticos está na Figura 15.

Fazendo a análise das populações individualmente, observamos o aumento do número de macrófagos (células CD11c+ CD11b+ F4/80+) dos animais sépticos em relação aos animais controle (Figura 15). Também podemos observar o aumento relativo (Figura 16A) e absoluto (Figura 16B) da expressão do receptor FPR2/ALX nessas células. O aumento da expressão do receptor também pode ser observado pelos histogramas representativos dos tempos de 6 h (Figura 16C) e 24 h (Figura 16D), onde o histograma branco representa as células dos animais controle, e o histograma cinza, dos animais sépticos, sendo que estes últimos apresentam um deslocamento para a direita nos dois tempos estudados, indicando aumento da intensidade de fluorescência.

Da mesma maneira que ocorreu com os macrófagos, observamos o aumento da população de células mieloides imaturas (células CD11c+ CD11b+ Gr-1+ F4/80+) nos animais sépticos comparados aos animais controle (Figura 15), bem como uma maior expressão do receptor FPR2/ALX nessas células (Figura 17A e 17B, aumento relativo e absoluto, respectivamente). Os histogramas branco (controle) e cinza (sepsis) são representativos do tempo de 6 h (Figura 17C) e 24 h (Figura 17D), e o deslocamento do histograma cinza para a direita indica uma maior expressão do receptor FPR2/ALX nas células dos animais sépticos.

Embora alguns trabalhos mostrem alguma positividade para CD11c em neutrófilos, a expressão dessa molécula é muito baixa nessa

população. Assim, de acordo com trabalhos da literatura (BLOMGRAN; ERNST, 2011), consideramos os neutrófilos como células CD11c-. Embora o número de neutrófilos (CD11c- CD11b+ Gr-1+ F4/80-) do BAL dos animais sépticos tenha aumentado substancialmente comparado aos animais controle (Figura 15 e 18B), a expressão relativa do receptor FPR2/ALX nessas células não se mostrou muito importante (Figuras 18A, 18C e 18D).

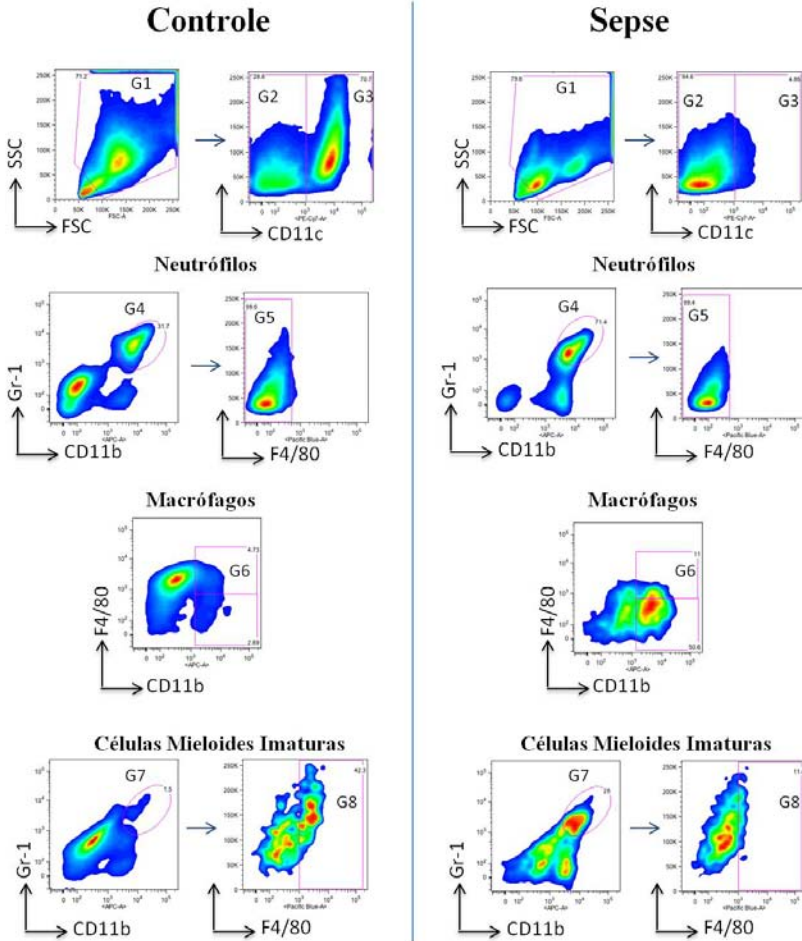


Figura 15: Citometria de fluxo das células de BAL de camundongos inoculados com *K. pneumoniae*. Seis e 24 horas após a inoculação (i.t.) dos animais com 4×10^8 UFC de *K. pneumoniae*, os camundongos foram sacrificados e amostras de BAL foram obtidas e processadas para a realização da citometria de fluxo. Os dot-plots dos animais controle e sepsis 24 h estão representados acima e indicam macrófagos (CD11c+ CD11b+ F4/80+), células mieloides imaturas (CD11c+ CD11b+ Gr-1+ F4/80+) e neutrófilos (CD11c- CD11b+ Gr-1+ F4/80-).

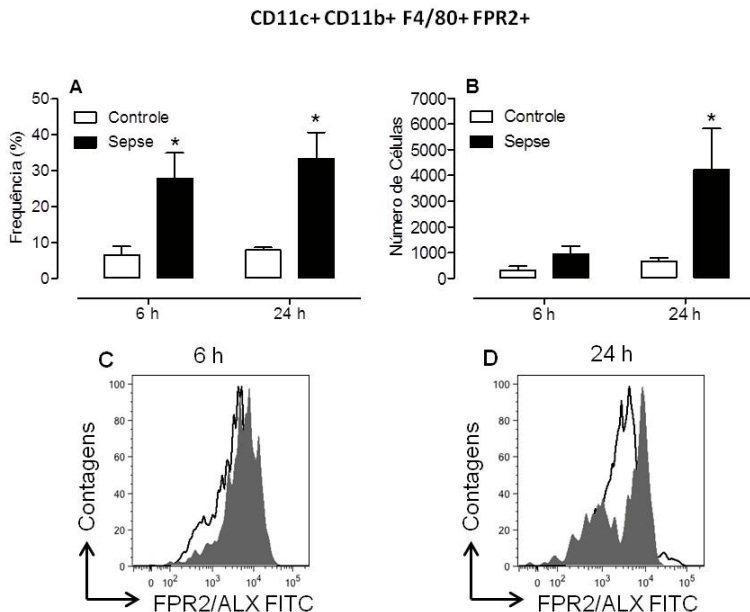


Figura 16: Expressão do receptor FPR2/ALX em macrófagos do BAL de camundongos inoculados com *K. pneumoniae*. Seis e 24 horas após a inoculação (i.t.) dos animais com 4×10^8 UFC de *K. pneumoniae*, os camundongos foram sacrificados e amostras de BAL foram obtidas e processadas para a realização da citometria de fluxo. A população de células mieloides CD11c+ foi delimitada, e as células com marcação positiva para CD11b e F4/80 (macrófagos) foram analisadas. O número relativo (A) e absoluto (B) de células que expressam FPR2/ALX, e os histogramas representativos de 6 h (C) e 24 h (D) são mostrados. As barras representam a média \pm erro padrão da média de 6 a 8 animais por grupo. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle (ANOVA de duas via seguida pelo *post hoc* de Bonferroni).

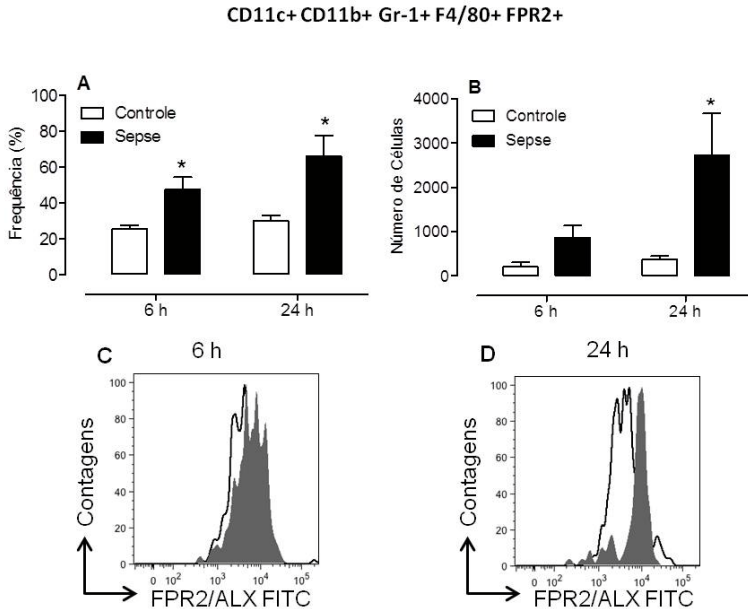


Figura 17: Expressão do receptor FPR2/ALX em células mieloides imaturas do BAL de camundongos inoculados com *K. pneumoniae*. Seis e 24 horas após a inoculação (i.t.) dos animais com 4×10^8 UFC de *K. pneumoniae*, os camundongos foram sacrificados e amostras de BAL foram obtidas e processadas para a citometria de fluxo. A população de células CD11c+ foi delimitada, e as células positivas para CD11b, Gr-1 e F4/80 (células mieloides imaturas) foram analisadas. O número relativo (A) e absoluto (B) de células que expressam FPR2/ALX, e os histogramas representativos de 6 h (C) e 24 h (D) são mostrados. As barras representam a média \pm erro padrão da média de 6 a 8 animais por grupo. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle (ANOVA de duas via seguida pelo *post hoc* de Bonferroni).

CD11c- CD11b+ Gr-1+ F4/80- FPR2+

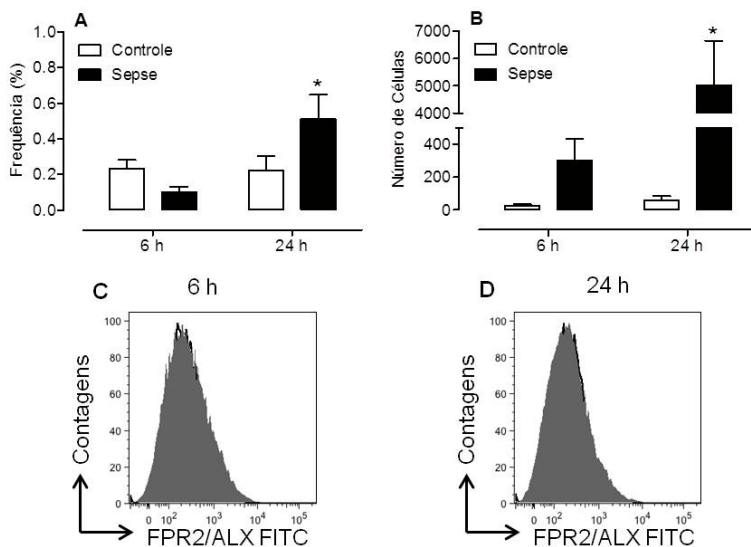


Figura 18: Expressão do receptor FPR2/ALX em neutrófilos do BAL de camundongos inoculados com *K. pneumoniae*. Seis e 24 horas após a inoculação (i.t.) dos animais com 4×10^8 UFC de *K. pneumoniae*, os camundongos foram sacrificados e amostras de BAL foram obtidas e processadas para a citometria de fluxo. A população de células CD11c- CD11b+ Gr-1+ F4/80- (neutrófilos) foi analisada. O número relativo (A) e absoluto (B) de células que expressam FPR2/ALX, e os histogramas representativos de 6 h (C) e 24 h (D) são mostrados. As barras representam a média \pm erro padrão da média de 6 a 8 animais por grupo. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle (ANOVA de duas via seguida pelo *post hoc* de Bonferroni).

5.14. Efeito do tratamento precoce com agonista e antagonista do receptor FPR2/ALX na migração de células

É muito bem descrito que a LXA_4 ao atuar no receptor FPR2/ALX inibe a migração de leucócitos em diversos modelos experimentais. Para avaliar esse efeito no nosso modelo, administramos a LXA_4 ou o seu análogo BML-111 no início do processo da sepse e avaliamos a migração de células para o foco infeccioso. Podemos observar que houve o aumento da migração de células inflamatórias para o foco infeccioso nos animais sépticos quando comparado aos animais controle, e que tanto a LXA_4 (Figura 19) quanto o seu análogo BML-111 (Figura 20) reduziram a migração de células para o local. A redução foi principalmente de neutrófilos (Figuras 19B e 20B) e de células mieloides imaturas (células *ring-like*; Figuras 19C e 20C).

Além disso, como observamos o aumento de LXA_4 endógena no foco infeccioso no início da sepse, e possivelmente essa LXA_4 endógena também teria efeitos na migração de células para o local, tratamos os animais com o antagonista do receptor FPR2/ALX, BOC-1, no início do processo e avaliamos o seu efeito. O tratamento com o BOC-1 foi realizado algumas horas antes do aumento observado nos níveis de LXA_4 . Houve aumento da migração de células para o foco infeccioso dos animais sépticos, sendo que este foi ainda maior nos animais que receberam o antagonista BOC-1 (Figura 21A). Esse aumento de células foi principalmente de neutrófilos (Figura 21B) e de células mieloides imaturas (células *ring-like*; Figura 21C), sendo que o BOC-1 não teve efeito na migração de macrófagos para o local (Figura 21D).

Para confirmar que o efeito do BOC-1 foi pelo antagonismo da ação da LXA_4 , e não de outro possível mediador endógeno, pré-tratamos os animais com o inibidor da 15-LOX (PD146176) ou com o inibidor da 5-LOX (BWA4C) e avaliamos o seu efeito na migração de células para o foco infeccioso. Corroborando o resultado do BOC-1, a administração dos inibidores da 15-LOX e da 5-LOX nos animais também aumentou a migração de células para o foco infeccioso (Figura 22A), principalmente de neutrófilos (Figura 22B) e de células *ring-like* (Figura 22C). Da

mesma maneira que o BOC-1, a administração do PD146176 e do BWA4C não alterou o perfil de migração de células mononucleares (Figura 22D).

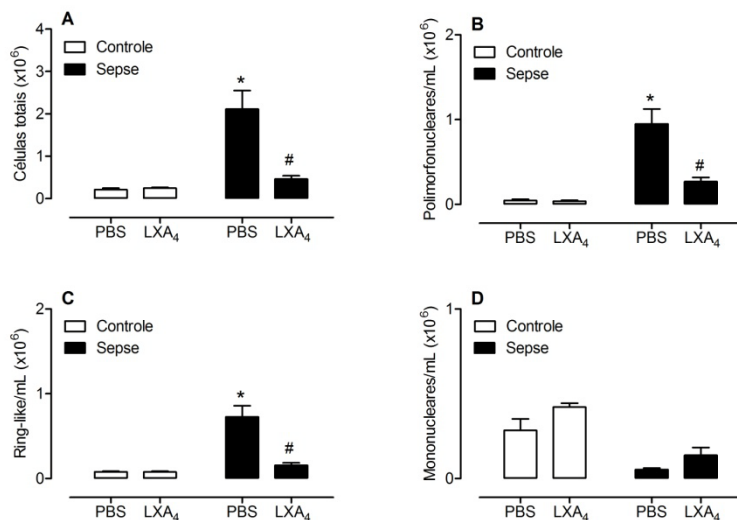


Figura 19: Efeito da Lipoxina A₄, agonista do receptor FPR2/ALX, na migração de células para o foco infeccioso. Uma hora após a indução da sepse, os camundongos receberam LXA₄ (2,5 μ g/kg, i.p.) ou veículo, e 6 h após a inoculação da *K. pneumoniae*, as amostras de BAL foram obtidas. A contagem de células totais (A), polimorfonucleares (B), células *ring-like* (C) e mononucleares (D) estão ilustradas na figura. As barras representam a média \pm erro padrão da média de 6 a 8 animais por grupo. Para a análise estatística, os valores foram transformados como descrito na seção 4.4 para alcançarem normalidade e homogeneidade de variância. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle, # $p < 0,05$ em relação ao grupo sepse (ANOVA de duas via seguida pelo *post hoc* de Bonferroni).

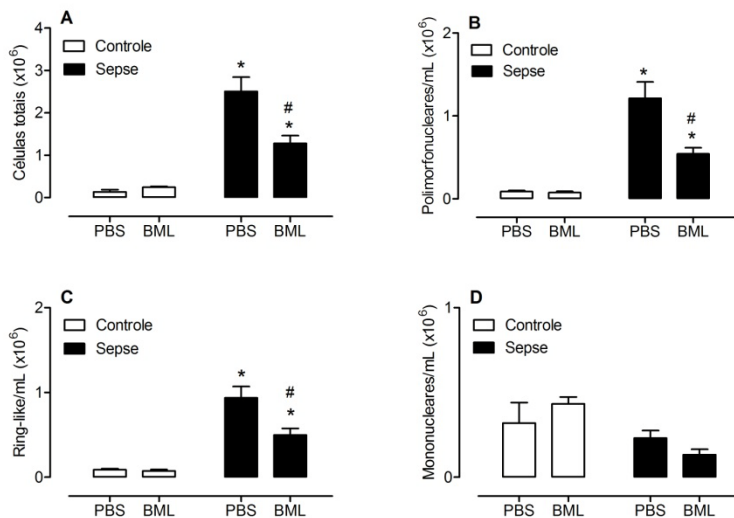


Figura 20: Efeito do agonista do receptor FPR2/ALX (BML-111) na migração de células para o foco infeccioso. Uma hora após a indução da sepse, os camundongos receberam BML-111 (100 $\mu\text{g}/\text{kg}$, i.p.) ou veículo, e 6 h após a inoculação da *K. pneumoniae*, as amostras de BAL foram obtidas. A contagem de células totais (A), polimorfonucleares (B), células *ring-like* (C) e monucleares (D) estão ilustradas na figura. As barras representam a média \pm erro padrão da média de 6 a 8 animais por grupo. Para a análise estatística, os valores foram transformados como descrito na seção 4.4 para alcançarem normalidade e homogeneidade de variância. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle, # $p < 0,05$ em relação ao grupo sepse (ANOVA de duas via seguida pelo *post hoc* de Bonferroni).

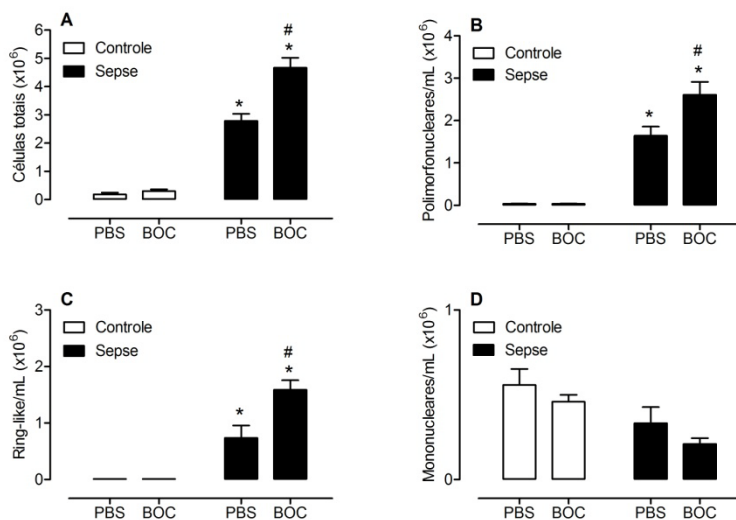


Figura 21: Efeito do antagonista do receptor FPR2/ALX (BOC-1) na migração de células para o foco infeccioso. Uma hora após a indução da sepse, os camundongos receberam BOC-1 (1 $\mu\text{g}/\text{kg}$, i.p.) ou veículo, e 6 h após a inoculação da *K. pneumoniae*, as amostras de BAL foram obtidas. A contagem de células totais (A), polimorfonucleares (B), células *ring-like* (C) e monucleares (D) estão ilustradas na figura. As barras representam a média \pm erro padrão da média de 6 a 8 animais por grupo. Para a análise estatística, os valores foram transformados como descrito na seção 4.4 para alcançarem normalidade e homogeneidade de variância. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle, # $p < 0,05$ em relação ao grupo sepse (ANOVA de duas via seguida pelo *post hoc* de Bonferroni).

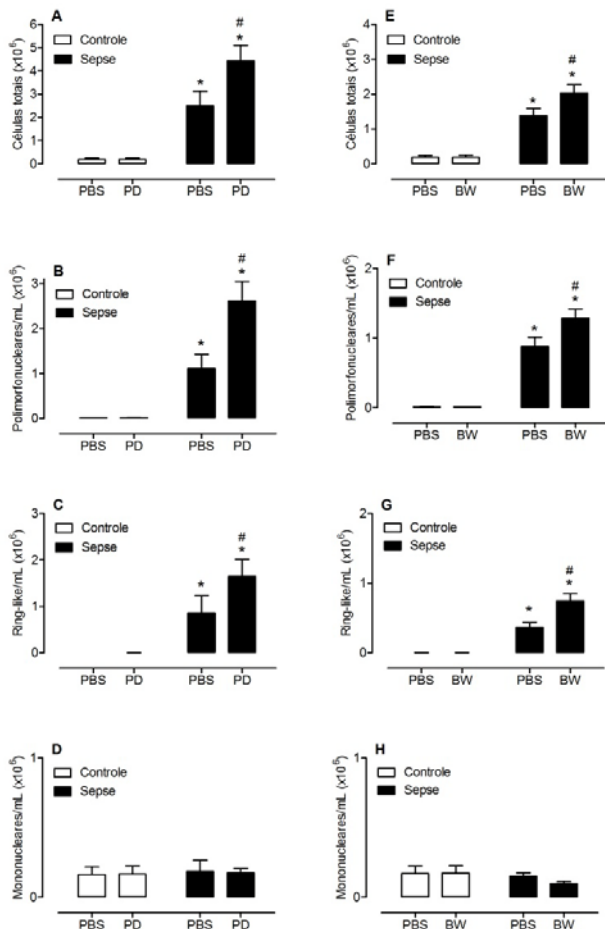


Figura 22: Efeito dos inibidores da 15-Lipoxigenase (PD146176) e da 5-LOX (BWA4C) na migração de células para o foco infeccioso. Uma hora antes da indução da sepsis, os camundongos receberam os inibidores da 15-LOX (PD 146176; 1 mg/kg, i.p.), da 5-LOX (BWA4C; 10 mg/kg; i.p.) ou veículo, e 6 h após a inoculação da *K. pneumoniae*, as amostras de BAL foram obtidas. A contagem de células totais (A), polimorfonucleares (B), células ring-like (C) e mononucleares (D) estão ilustradas na figura. As barras representam a média \pm erro padrão da média de 6 a 8 animais por grupo. Para a análise estatística, os valores foram transformados como descrito na seção 4.4 para alcançarem normalidade e homogeneidade de variância. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle, # $p < 0,05$ em relação ao grupo sepsis (ANOVA de duas via seguida pelo *post hoc* de Bonferroni).

5.15. Efeito do tratamento precoce com agonista e antagonista do receptor FPR2/ALX no processo infeccioso

Nestes experimentos foi confirmada a presença de infecção no BAL, baço e coração dos animais sépticos. O tratamento dos animais com o antagonista BOC-1 foi capaz de reduzir o processo infeccioso, como podemos observar pela redução do número das UFC nas amostras de BAL e coração (Figura 23A). Contrariamente, o tratamento dos animais com a LXA_4 ou seu análogo BML-111 no início da sepse, levou ao agravamento do processo infeccioso, como observado pelo maior número de UFC no coração dos animais (Figura 23B e 23C, respectivamente).

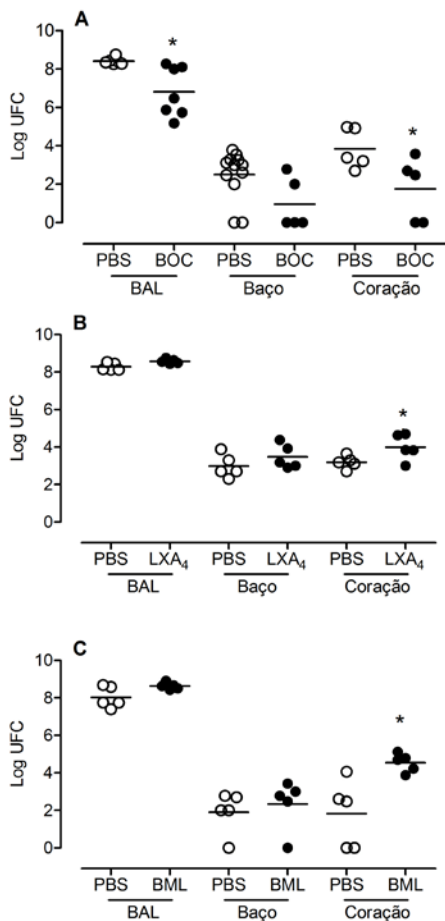


Figura 23: Efeito de agonistas e antagonista do receptor FPR2/ALX no processo infeccioso de camundongos inoculados com *K. pneumoniae*. Uma hora após a indução da sepse os camundongos receberam BOC-1 (1 µg/kg, i.p.; A), LXA₄ (2,5 µg/kg, i.p.; B), BML-111 (100 µg/kg, i.p.; C) ou veículo, e 6 h após a inoculação os camundongos foram sacrificados e as amostras foram semeadas em ágar Mueller-Hinton. Os resultados foram expressos como log de unidades formadoras de colônias (UFC) por mL (BAL) ou UFC por órgão (baço e coração), n = 5 a 7 animais por grupo experimental. *p < 0,05, em relação ao grupo veículo (Teste de Mann-Whitney).

5.16. Efeito do tratamento precoce com o antagonista do FPR2/ALX, BOC-1, nas alterações cardiovasculares

Investigamos se o controle inicial do processo infeccioso obtido pelo antagonismo da LXA_4 através da administração do BOC-1 teria alguma consequência positiva adicional para os animais sépticos. É descrito que a LXA_4 é capaz de modular o tônus vascular, assim, avaliamos os efeitos do tratamento com o BOC-1 também nas alterações cardiovasculares que ocorrem no choque séptico.

Como observamos na Figura 24, os animais sépticos encontravam-se hipotensos (A) e hiporreativos ao agente vasoconstritor fenilefrina (B). Já os animais que foram tratados com o antagonista BOC-1 não desenvolveram hipotensão tão acentuada e responderam melhor, ainda que parcialmente, à fenilefrina, em comparação aos animais sépticos tratados com veículo.

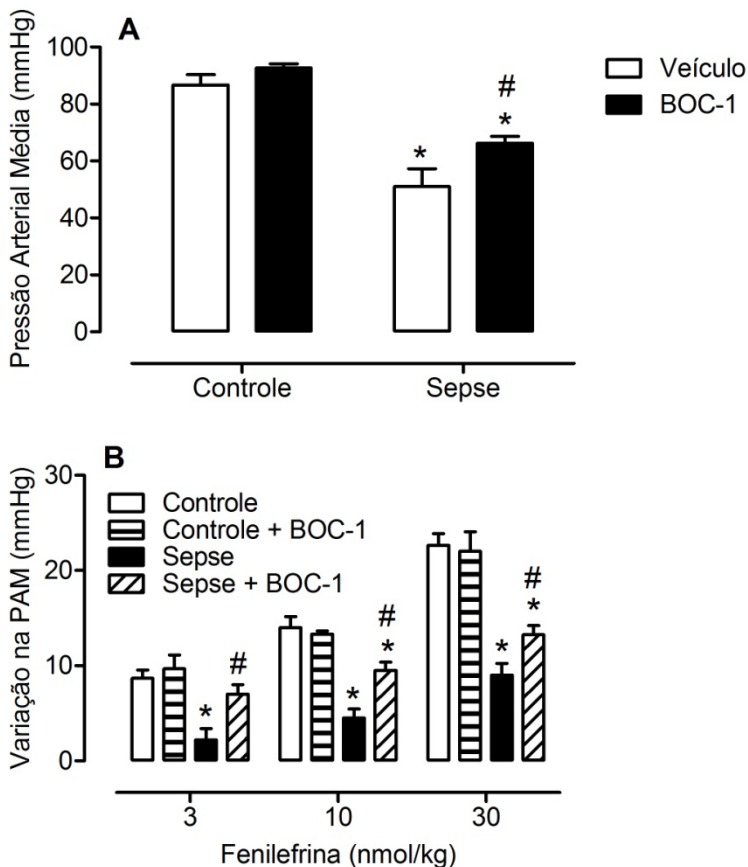


Figura 24: Efeito do antagonista do receptor FPR2/ALX (BOC-1) nas alterações cardiovasculares que ocorrem na sepse induzida por pneumonia. Os animais foram inoculados (i.t.) com 4×10^8 UFC de *K. pneumoniae* e uma hora após a indução da sepse os camundongos receberam BOC-1 (1 μ g/kg, i.p.). Seis horas após, os animais foram anestesiados e preparados para o registro da pressão arterial média (A) e tiveram uma curva de fenilefrina registrada (B). As barras representam a média \pm erro padrão da média de 4 a 6 animais. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle; # $p < 0,05$ em relação ao grupo sepse veículo (ANOVA de duas vias seguida pelo *post hoc* de Bonferroni).

5.17. Efeito do tratamento precoce e tardio com agonista e antagonista do receptor FPR2/ALX na sobrevida dos animais sépticos

Como os animais tratados com o antagonista BOC-1 exibiram aumento do número de células inflamatórias para o foco, com consequente redução do processo infeccioso e melhora dos aspectos cardiovasculares, fomos investigar o efeito deste tratamento na sobrevida dos animais. Como observamos na Figura 25A, a taxa de sobrevida dos animais que receberam a administração precoce do BOC-1 foi de 75%, enquanto que apenas ~40% do grupo sepse veículo sobreviveram, representando assim um aumento de ~78% na sobrevida ao longo das 72 h analisadas. Já o tratamento precoce com a LXA₄ e seu análogo, não alterou de maneira importante a mortalidade.

Por outro lado, quando a LXA₄ ou seu análogo BML-111 foi administrado mais tardiamente no processo, a taxa de sobrevida dos animais foi de 57% e 62%, respectivamente. Já o tratamento tardio com o BOC-1 não alterou a sobrevida dos animais (Figura 25B).

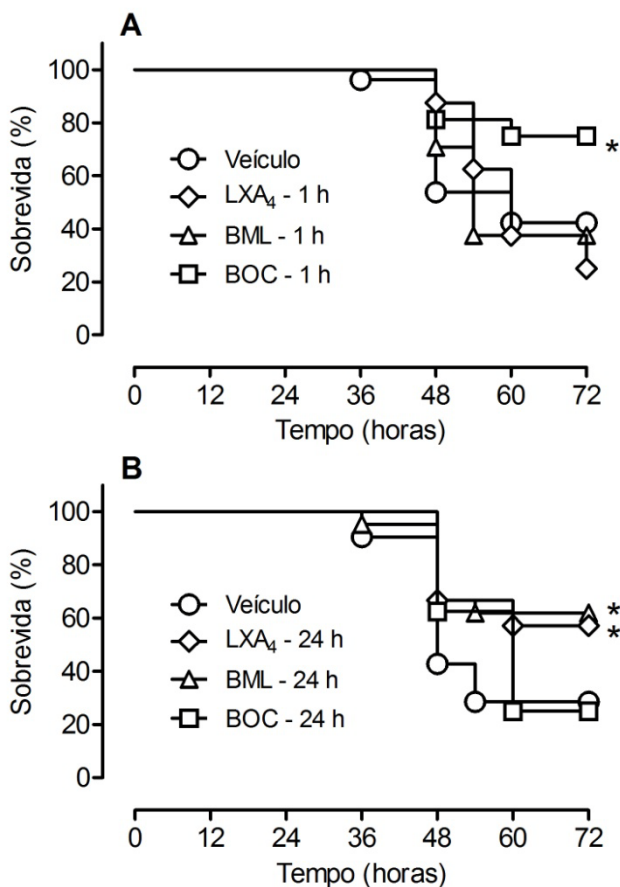


Figura 25: Efeito do tratamento precoce e tardio com agonista e antagonista do receptor FPR2/ALX na sobrevivência de camundongos após a inoculação de *Klebsiella pneumoniae*. Os animais foram inoculados (i.t.) com 4×10^8 UFC de *K. pneumoniae* e 1 h (A) ou 24 h (B) após a indução da sepse os camundongos receberam BOC-1 (1 $\mu\text{g}/\text{kg}$, i.p.; quadrados), LXA₄ (2,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$, i.p.; losangos), BML-111 (100 $\mu\text{g}/\text{kg}$, i.p.; triângulos) ou veículo (círculos) e a sobrevivência foi avaliada por até 72 h. Os resultados foram expressos como porcentagem de sobrevivência e são representativos de dois experimentos diferentes. A análise estatística utilizada foi o teste de log rank. Painel A: * $p = 0.0399$ (veículo versus BOC-1); Painel B: * $p = 0.0388$ (veículo versus LXA₄) e * $p = 0.0374$ (veículo versus BML-111). $n = 10$ por grupo.

5.18. Efeito do tratamento tardio com LXA₄ na sepse induzida por pneumonia

Para a melhor compreensão dos efeitos que o tratamento tardio com a LXA₄ teve no aumento da sobrevivência dos animais, e como ela é um importante agente anti-inflamatório e pró-resolutivo, avaliamos alguns parâmetros inflamatórios e de dano de órgãos. O tratamento tardio dos animais sépticos com a LXA₄ diminuiu a inflamação exacerbada do final do processo, como reportado pela redução das citocinas pró-inflamatórias TNF- α (Figura 26A) e IL-1 β (Figura 26B). Investigamos também se os efeitos benéficos da LXA₄ poderiam ser mediados pela citocina anti-inflamatória IL-10, mas como observamos na Figura 26C, o tratamento dos animais com a LXA₄ não alterou a concentração de IL-10 circulante.

Investigamos ainda se a redução do processo inflamatório poderia ter consequências positivas para os animais tratados tardiamente com a LXA₄. Os animais sépticos exibiram aumentos de lactato (Figura 27A) e creatinina (Figura 27B) plasmáticos indicando disfunção de órgãos, e os animais que foram tratados com LXA₄ tiveram os valores desses marcadores semelhantes aos dos animais controle (Figura 27A e 27B).

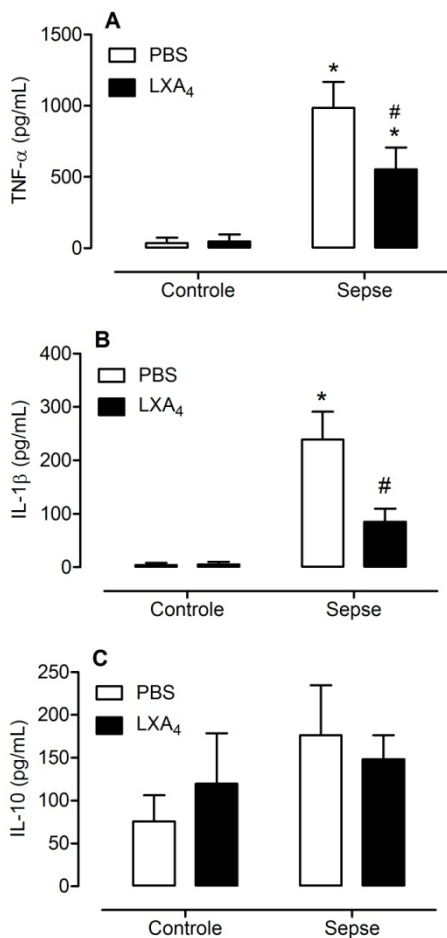


Figura 26: Efeito do tratamento tardio com LXA₄ na produção de citocinas em camundongos inoculados com *K. pneumoniae*. Os animais foram inoculados (i.t.) com 4×10^8 UFC de *K. pneumoniae* e 24 h após a indução da sepse os camundongos receberam LXA₄ (2,5 µg/kg, i.p.). Doze horas após o tratamento com a LXA₄, amostras de sangue foram obtidas para dosagem das citocinas TNF-α (A), IL-1β (B) e IL-10 (C). As barras representam a média ± erro padrão da média de 6 a 7 animais. Para a análise estatística, os valores foram transformados como descrito na seção 4.4 para alcançarem normalidade e homogeneidade de variância. *p < 0,05 em relação ao grupo controle; #p < 0,05 em relação ao grupo sepse veículo (ANOVA de duas vias seguida pelo *post hoc* de Bonferroni).

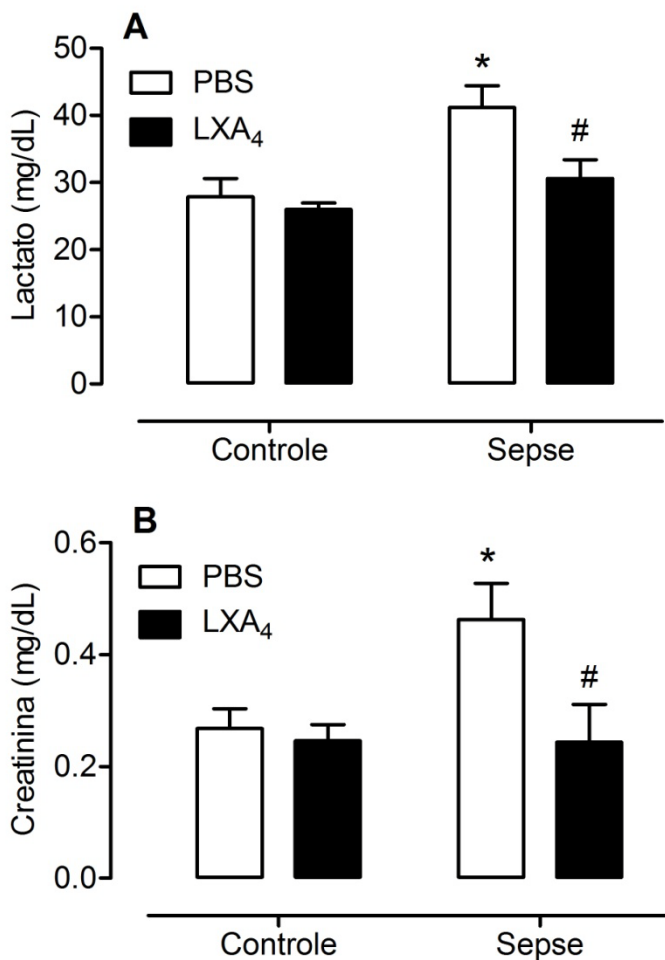


Figura 27: Efeito do tratamento tardio com LXA₄ na disfunção orgânica de camundongos inoculados com *K. pneumoniae*. Os animais foram inoculados (i.t.) com 4×10^8 UFC de *K. pneumoniae* e 24 h após a indução da sepse os camundongos receberam LXA₄ (2,5 μ g/kg, i.p.). Doze horas após o tratamento com a LXA₄, amostras de sangue foram obtidas para dosagem de lactato (A) e creatinina (B). As barras representam a média \pm erro padrão da média de 6 a 7 animais. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle; # $p < 0,05$ em relação ao grupo sepse veículo (ANOVA de duas vias seguida pelo *post hoc* de Bonferroni).

6. DISCUSSÃO

Os nomes dos promissores agentes testados mudam de artigo para artigo, mas a mensagem é sempre a mesma: “novo agente falha em mostrar eficácia em ensaios clínicos de fase II e III”. É essa falta de um tratamento adequado desta síndrome tão antiga, associado ao conhecimento insuficiente sobre ela, que sustenta nosso interesse em estudar sepse.

As alternativas terapêuticas na sepse permanecem um desafio devido principalmente à complexidade desta síndrome. Os modelos animais têm sido utilizados para estudar a patogênese e investigar potenciais agentes terapêuticos. Entretanto até agora, não tiveram nenhum sucesso em humanos (BONE et al., 1995; FISHER et al., 1996; MCCLOSKEY et al., 1994; POLI-DE-FIGUEIREDO et al., 2008).

O único tratamento disponível para pacientes sépticos era a proteína C ativada (Drotrecogin Alfa; Xigris®, Eli Lilly; Alemanha) que acabou seguindo o caminho de outros tantos fármacos (ABRAHAM et al., 2005; GENTRY et al., 2009) e foi retirada do mercado em 2011, uma década após ser aprovada pelo FDA (ANGUS, 2012; WENZEL; EDMOND, 2012). Atualmente o que é feito na clínica são intervenções básicas preconizadas nos hospitais, como antibioticoterapia, remoção do foco infeccioso quando possível, administração de corticoides, reposição de volume, entre outros, sem nenhum tratamento específico para a sepse.

Embora a transposição de dados de estudos em animais para o ambiente clínico seja intrinsecamente difícil, principalmente por conta das diferenças entre as espécies, algumas dessas falhas podem ser atribuídas ao uso inadequado e também ao desconhecimento dos modelos animais disponíveis. A aplicabilidade dos resultados de modelos murinos em doenças humanas depende da compreensão das diferenças e semelhanças entre as espécies.

Além disso, os ensaios clínicos agrupam os pacientes sépticos em um único grande grupo, independente da origem ou do agente causador

da infecção, o que pode ser um grande erro. Acreditamos que para aumentar o sucesso dos ensaios clínicos, as terapias devem ser direcionadas de acordo com a fonte da infecção.

Nos estudos de sepse, são utilizados modelos animais que podem ser divididos em três categorias principais: a) administração exógena de uma toxina, como LPS ou zimosan, na verdade, modelos de endotoxemia; b) administração exógena de patógenos viáveis, principalmente de bactérias; e c) rompimento das barreiras protetoras endógenas dos animais, como os modelos de CLP (ligação e perfuração do ceco) e CASP (perfuração do colo ascendente através de um *stent*). Enquanto modelos como CLP e CASP são úteis para entender a sepse polimicrobiana, frequentemente a sepse humana é causada por apenas um único patógeno (ALBERTI et al., 2002). Além disso, mais do que peritonites, a pneumonia é uma das principais causas de sepse, sendo responsável por mais de 50% dos casos (ALBERTI et al., 2002; ANGUS; WAX, 2001).

Há um grande número de estudos com infecções pulmonares, sendo que na maioria deles, as avaliações são pontuais e mais direcionadas ao local da infecção (SOARES et al., 2002), sem muitas análises sistêmicas ou temporais. Muitos estudos utilizam a infusão intravenosa (COGEN; MOORE, 2009; GREISMAN; DUBUY; WOODWARD, 1979; WANG et al., 2001) ou a administração intraperitoneal (GREISMAN; DUBUY; WOODWARD, 1979; SUTHERLAND et al., 2010) de agentes causadores de pneumonia, ou ainda, uma combinação de dois insultos para mimetizar infecções nosocomiais que resultam de imunodepressão: queimadura seguida por inoculação de bactéria nos pulmões dos animais (DAVIS et al., 2004; HORTON et al., 2007) ou indução de pneumonia após o modelo de CLP (MUENZER et al., 2006).

Como os compartimentos intravenoso e intraperitoneal são os locais mais comuns em modelos de sepse, e geralmente os estudos avaliam um único tempo após a infecção, resolvemos avaliar as mudanças que acontecem ao longo do tempo no modelo de sepse induzida por pneumonia, já que os pulmões representam a mais importante fonte de

infecção na sepse humana. Nosso principal interesse foi um melhor entendimento do modelo, bem como a padronização do mesmo em nosso laboratório.

Começamos nosso estudo pela avaliação da taxa de sobrevivência dos animais. Neste modelo não observamos nenhuma morte anterior a 36 h após a infecção. Diferente de outros modelos, como o CLP, em que a mortalidade dos animais já começa nas primeiras 6 a 12 h após o insulto, o que não reproduz o curso temporal da sepse humana que geralmente são de dias ou até semanas, o início tardio de morte confere uma grande vantagem ao modelo de sepse induzida por pneumonia.

Outra vantagem é que a taxa de mortalidade se relaciona muito bem com o número de UFC injetado nos animais, o que permite ao experimentador optar pela gravidade da sepse que deseja obter. Todos os camundongos que foram inoculados com 1×10^8 UFC de *K. pneumoniae* sobreviveram, os que receberam 4×10^8 UFC exibiram um pouco mais de 50% de mortalidade, enquanto que todos os animais inoculados com 1×10^9 UFC, sucumbiram em 60 h. Optamos por realizar os demais experimentos com 4×10^8 UFC de *K. pneumoniae* pois esta foi uma quantidade de bactérias que levou a uma sepse consistente de intensidade intermediária, permitindo uma janela adequada de trabalho. Os camundongos *Swiss* são mais resistentes às infecções pulmonares por *Klebsiella* do que outras linhagens, como o C57BL/6, justificando as diferentes concentrações de bactérias necessárias para induzir letalidade em uma linhagem e outra (MIZGERD; SKERRETT, 2008).

Além disso, todos os animais submetidos à inoculação de 4×10^8 UFC de *K. pneumoniae* apresentaram os sinais visuais clássicos de sepse como piloereção, letargia, taquipneia, e também apresentaram uma importante perda de peso em todos os períodos avaliados. A perda de peso é característica da sepse, e em parte reflete a caquexia típica que ocorre nessa patologia, bem como a redução na ingestão de água e comida no período pós-operatório (NARDI et al., 2012), já que os animais controle também perderam peso nas primeiras 24 h.

Em relação ao componente inflamatório do presente modelo, a análise histológica dos pulmões dos animais com sepse mostrou um importante infiltrado de células PMN para o espaço alveolar em todos os tempos avaliados, sendo que o pico observado foi em 24 h. Da mesma maneira que a análise histológica, a contagem de células das amostras do BAL dos animais sépticos também mostrou uma grande quantidade de leucócitos, principalmente de PMN, com pico também em 24 h. O aumento da migração de PMN para o foco infeccioso coincidiu com o desenvolvimento de leucopenia nos animais, sugerindo que ambos os eventos estão relacionados, já que os leucócitos aderem ao endotélio capilar e transmigram através do interstício para os alvéolos frente à presença de patógenos ou partículas estranhas, sendo este um dos principais fenômenos de proteção do organismo (KOLACZKOWSKA; KUBES, 2013).

A enzima MPO está presente principalmente em células PMN, mais especificamente nos grânulos azurófilos, contribuindo com a capacidade bactericida dessas células (KLEBANOFF, 1970). Dessa forma, quantificamos também o recrutamento de neutrófilos de maneira indireta através da medida da atividade da MPO nas amostras dos pulmões dos animais, a qual, corroborando os dados histológicos e de contagem de células, estava aumentada em todos os tempos avaliados.

Como esperado, o número de bactérias encontradas no BAL estava bastante aumentado em 6 h, sendo que seu número foi reduzindo ao longo do tempo provavelmente devido ao controle da infecção pelo hospedeiro. A infecção não ficou restrita ao local da inoculação da bactéria, como demonstrado pelo aumento de UFC no tecido esplênico e cardíaco. Esse achado mostra que esse modelo é capaz de produzir infecção e inflamação sistêmicas. Embora a presença de bactérias na corrente sanguínea tenha sido transitória, e em alguns animais até ausente, a presença de bacteremia não é essencial para o desenvolvimento de sepse. A rápida depuração de bactéria da corrente sanguínea e sua preferência por certos órgãos são eventos bem descritos (AL-BANNA et al., 2008; WICHER et al., 1996). Além disso, há presença de cultura positiva em apenas 30 a 50% dos pacientes, e ainda,

em ~30% deles, o local da infecção nem é mesmo conhecido (KIEFT et al., 1993).

A presença de um foco infeccioso identificável é clinicamente relevante e representa uma vantagem deste modelo. Endotoxemia e injeção de bactérias diretamente na corrente sanguínea são modelos sem a presença de foco infeccioso, não reproduzindo tão bem as reais características da sepse humana (POLI-DE-FIGUEIREDO et al., 2008). Além disso, diferentemente da administração de endotoxinas cuja importância como modelo de sepse é bastante controversa, sendo considerada mais um modelo de endotoxicose (BURAS; HOLZMANN; SITKOVSKY, 2005; DEITCH, 1998; POLI-DE-FIGUEIREDO et al., 2008), a inoculação de *K. pneumoniae* proporciona uma infecção disseminada com um foco bem definido.

As citocinas pró-inflamatórias, principalmente TNF- α e IL-1 β , são elementos chave na endotoxemia, sepse e choque séptico, sendo parte essencial da resposta inflamatória sistêmica (TSIOTOU et al., 2005; WALLEY et al., 1996). A injeção de LPS tem como característica um aumento alto, rápido e transitório de citocinas plasmáticas (DEITCH, 1998). Nesse sentido, o modelo de sepse induzida por pneumonia parece reproduzir melhor a resposta inflamatória sustentada que ocorre na sepse humana. Houve aumento de IL-1 β em todos os tempos avaliados, e observamos um aumento sistêmico mais tardio e de duração mais longa na concentração da citocina pró-inflamatória TNF- α , sendo que no local da infecção o aumento já foi bastante importante nas primeiras 6 h. Assim, enquanto que no foco infeccioso o TNF- α aparece agudamente, sugerindo um importante papel na gênese do processo, sistemicamente essa citocina parece importante para a manutenção da resposta inflamatória. Já a citocina IL-1 β parece ter importância crucial em todas as etapas do processo neste modelo.

O TNF- α regula uma grande gama de funções, como aumento da expressão de moléculas de adesão em leucócitos, plaquetas, células endoteliais e epiteliais, ativação das vias fibrinolítica e trombótica, produção de NO, entre outras (QIU et al., 2011). A IL-1 β também é um

importante mediador inflamatório, e induz a síntese e secreção de outras citocinas e quimiocinas, promovendo o recrutamento de neutrófilos para o local da inflamação (OPAL et al., 1997). A importância dessas citocinas na sepse é ressaltada por vários estudos clínicos avaliando a eficácia de antagonistas ou anticorpos contra TNF- α (EICHACKER, 2002; MORRIS et al., 2012; QIU et al., 2011; RICE et al., 2006) ou IL-1 β na sepse (EICHACKER, 2002; OPAL et al., 1997).

Em relação à citocina anti-inflamatória IL-10, foi observado aumento apenas no local da infecção restrita ao tempo de 24 h. A IL-10 atua principalmente inibindo a produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IFN- γ e IL-12 (CAVALCANTI et al., 2012). Podemos especular que a redução do TNF- α observada no foco infeccioso em 24 h, pode ser devida ao aumento de IL-10 nesse momento. Corroborando achados prévios, sistemicamente essa citocina não parece importante em modelos de pneumonia (GREENBERGER et al., 1995; VAN DER POLL et al., 1996), mas o aumento de IL-10 no foco infeccioso já foi anteriormente relatado em modelos de pneumonia tanto por *Klebsiella pneumoniae* (GREENBERGER et al., 1995; MOORE et al., 2002) quanto por *Streptococcus pneumoniae* (VAN DER POLL et al., 1996). Em ambos os casos a liberação de IL-10 foi relacionada com o impedimento da resposta do hospedeiro frente à infecção, e consequentemente com o aumento da mortalidade.

Curiosamente, em modelos de sepse por peritonite, a IL-10 tem um papel protetor para o hospedeiro (VAN DER POLL et al., 1995), mostrando que o papel benéfico ou maléfico dessa citocina na sepse depende do compartimento em que se encontra a infecção. Essa resposta distinta dependente do local da infecção também acontece com outras citocinas como o IFN- γ . Foi mostrado que quando a origem da infecção foi pulmonar, o IFN- γ desempenhou um papel protetor ao hospedeiro, entretanto, quando a infecção foi de origem intravenosa, o papel dessa citocina foi irrelevante (MOORE et al., 2002).

Esses dados mostram a importância de se estudar diferentes modelos de sepse e direcionar os tratamentos conforme a origem da

infecção, bem como conforme o tempo, já que alguns mediadores que são importantes em determinado compartimento e momento, podem não o serem em outros. Um paciente que desenvolve sepse devido a uma peritonite é certamente diferente de outro que adquiriu sepse a partir de uma pneumonia, muito embora os ensaios clínicos considerem esses pacientes como sendo praticamente iguais, a ponto de serem submetidos à mesma terapia experimental. Ainda, a maioria dos modelos animais que encorajam os ensaios clínicos é de peritonite, e a maior parte dos pacientes desenvolve sepse a partir de pneumonia (ALBERTI et al., 2002; ANGUS; WAX, 2001; SILVA et al., 2004). O que parece é que os agentes terapêuticos falham nos ensaios clínicos, não somente porque a transposição do modelo animal para o humano é difícil, mas porque a interpretação dos trabalhos é realizada de maneira inadequada. A falha não parece apenas do modelo animal, mas também (e talvez principalmente) da interpretação humana.

Outro importante mediador da sepse é o NO, o qual está envolvido em praticamente todas as respostas do hospedeiro frente à infecção, como inflamação, disfunção cardiovascular, aumento da permeabilidade vascular, migração e ativação de leucócitos, além de ter ação microbicida (ASSREUY, 2006; BENJAMIM; FERREIRA; CUNHA, 2000; FERNANDES; ASSREUY, 2008; MONCADA; PALMER; HIGGS, 1991). Vinte e quatro horas após a infecção, a concentração de metabólitos do NO (NOx; nitrato + nitrito) no plasma e no BAL dos animais sépticos aumentou, sendo este aumento muito mais expressivo nos estágios finais da sepse (48 h). De maneira interessante, a maior quantidade dos metabólitos do NO tanto no local quanto sistemicamente coincidiu com a redução do processo infeccioso e com o aumento expressivo da enzima NOS-2 no pulmão e coração, bem como com o momento em que se iniciou a morte dos animais. Embora o NO seja uma importante ferramenta do hospedeiro contra infecções (MONCADA; PALMER; HIGGS, 1991), o excesso de NO produzido pode causar efeitos cardiovasculares indesejados (ASSREUY, 2006; SORDI et al., 2011) e exercer efeitos citotóxicos através da reação com ROS e consequente formação de peroxinitrito (ONOO-). O peroxinitrito, por sua vez, pode causar dano direto às células epiteliais

(LANGE et al., 2010; SZABÓ, 1996), além de um grande comprometimento da troca gasosa por interagir com as proteínas do surfactante pulmonar (SZABÓ; MÓDIS, 2010; SZABÓ, 1996), entre outros.

A expressão da NOS-2 e o aumento de NO já foram reportados em trabalhos prévios de sepse, mas tais estudos mostram aumento da expressão da NOS-2 dentro de poucas horas após o estímulo (KAN et al., 2004; PREISER et al., 2001). Lange e colaboradores realizaram o curso temporal das NOS em um modelo de sepse ovina, mas eles não correlacionaram a expressão da NOS-2 com produção de NO ou com mortalidade, e o estudo foi conduzido apenas até 24 h após a infecção (LANGE et al., 2010). Os nossos resultados mostraram que a expressão da NOS-2 e a mortalidade nesse modelo de pneumonia séptica ocorrem de maneira lenta quando comparado ao modelo de CLP ou endotoxemia (KAN et al., 2004; LANGE et al., 2010; PREISER et al., 2001; WU; WILSON; TYML, 2003). Avaliamos também a expressão das isoformas NOS-1 e NOS-3 nos tecidos cardíaco e pulmonar dos animais, entretanto não foram diferentes do controle. Dessa maneira acreditamos que a expressão tardia da NOS-2 nos pulmões e coração dos animais, juntamente com outros fatores, contribuiu de maneira importante para a mortalidade nesse modelo.

Embora tenhamos observado aumento da expressão da NOS-2 no tecido pulmonar, não investigamos qual seria sua fonte celular. Gebaska e colaboradores mostraram que a expressão da NOS-2 em modelos de endotoxemia depende do sequestro de neutrófilos dentro da vasculatura pulmonar (GEBASKA; OLSZANECKI; KORBUT, 2005). Por outro lado, outros trabalhos mostraram que a expressão da NOS-2 no tecido pulmonar também ocorre em células epiteliais (HJOBBERG et al., 2004), principalmente nas células do tipo II (SUNIL et al., 2002). Baseado no ensaio de atividade da MPO no tecido pulmonar e de acordo com o perfil de aumento de neutrófilos no BAL, as células PMN permaneceram elevadas em todos os tempos avaliados, não coincidindo, portanto, com o perfil de expressão da NOS-2 nos pulmões. O perfil de aumento das células mononucleares foi semelhante ao das células PMN,

logo, também distinto do padrão de expressão da NOS-2. Dessa maneira, embora não investigado nesse trabalho, acreditamos que são as células epiteliais as principais fontes de NOS-2 nesse modelo.

Além disso, como citado anteriormente, é bem descrito que a disfunção cardiovascular que acontece na sepse é importante e em parte dependente das altas concentrações de NO que são produzidas pelas enzimas NOS, principalmente a isoforma 2 (ASSREUY, 2006; FERNANDES; ASSREUY, 2008; FERNANDES et al., 2009; SORDI et al., 2011). Entretanto, nesse modelo de pneumosepse, os animais desenvolveram hipotensão e hiporreatividade a agentes vasoconstritores, importantes indicadores da disfunção cardiovascular (ASSREUY, 2006; O'BRIEN et al., 2007), antes mesmo de ocorrer aumento de NO plasmático, sugerindo que outros mediadores também participam desse processo, como prostaciclina e o EDHF (do inglês, *Endothelium-Derived Hyperpolarization Factor*). A identidade do EDHF continua desconhecida, sendo possíveis mediadores o H_2O_2 e íons K^+ (PRYSYAZHNA; RUDYK; EATON, 2012). Como a sepse é um processo dinâmico com muitas variações ao longo do tempo (FERNANDES et al., 2009; SORDI; FERNANDES; ASSREUY, 2010; SORDI et al., 2011), pode ser que neste modelo o NO tenha um papel importante mais no final desse processo. É importante também perceber que essa disfunção cardiovascular persistente que foi observada pode ser um determinante da mortalidade nesse modelo.

Além do comprometimento do sistema cardiovascular, observamos o aumento transitório da concentração plasmática de creatinina, lactato, AST e ALT, indicando disfunção de múltiplos órgãos. O comprometimento da funcionalidade de alguns órgãos e sistemas, mesmo que temporário, ilustra a relevância e a severidade deste modelo, o que nos leva a acreditar que com a quantidade de bactéria que inoculamos, este pode ser considerado um modelo de sepse grave e choque séptico.

Outra grande vantagem desse modelo é a facilidade de aumentar ou reduzir a quantidade de UFC de bactéria inoculada nos animais,

podendo-se ajustar a gravidade da infecção de acordo com o interesse do pesquisador. Em outros modelos como o CLP, ajustar a quantidade de conteúdo cecal extravasado para tornar o modelo mais ou menos grave é um pouco mais difícil de padronizar, levando a variações maiores dentro do mesmo grupo experimental (BURAS; HOLZMANN; SITKOVSKY, 2005).

Assim, uma vez caracterizado o modelo e observado a importância do mesmo pelas semelhanças com a sepse humana, e devido ao fato de que as principais alterações foram observadas nos tempos de 6 h e 24 h, resolvemos investigar o papel da LXA₄ na resolução da inflamação na sepse nesses dois tempos. Como levantado em nossa hipótese de trabalho (item 2), algumas ações da LXA₄ assemelham-se a eventos que acontecem na sepse. Assim, em um primeiro momento investigamos se haveria o aumento da síntese endógena desse mediador no nosso modelo.

De fato, a concentração de LXA₄ no foco infeccioso (BAL) dos animais sépticos aumentou ~ 25% dentro das seis primeiras horas, retornando aos níveis basais 24 h após. Não houve diferença na concentração plasmática do mediador entre os grupos. Como a maior produção de LXA₄ foi observada na mucosa pulmonar, acreditamos que a principal fonte desse mediador seja a interação entre PMN-células epiteliais ou entre PMN-PMN.

Além do aumento da LXA₄ no foco infeccioso, também observamos o aumento da expressão do receptor FPR2/ALX no tecido pulmonar dos animais sépticos através de ensaio de imunofluorescência. Muitos trabalhos já mostraram a expressão do FPR2/ALX nas células do epitélio pulmonar (BONNANS et al., 2007; LEVY et al., 2002), bem como a importância do receptor em modelos de asma (LEVY et al., 2002; PETERS-GOLDEN, 2002), fibrose cística (KARP et al., 2004) e de inflamação alérgica das vias aéreas provocada por ovalbumina (CHEN et al., 2010). A maioria dos trabalhos aponta um papel anti-inflamatório potencialmente benéfico da LXA₄ mediado pela via FPR2/ALX nessas doenças (BONNANS et al., 2007; KARP et al.,

2004; LEVY et al., 2002; PETERS-GOLDEN, 2002). Assim, esses dados sugerem fortemente que as vias anti-inflamatórias estão bastante operantes neste processo e que a LXA₄ endógena esteja exercendo seus efeitos através da sua ligação a esses receptores.

A LXA₄ é um agente anti-inflamatório e pró-resolução, e pensamos que ela pode ser considerada um novo e importante mediador da fase anti-inflamatória (CARS) que ocorre durante a sepse. A sugestão de que a LXA₄ possa ser um mediador da CARS, até onde sabemos, é inédita. Como outros autores (ADIB-CONQUY; CAVAILLON, 2008), também acreditamos que na sepse não há uma relação temporal entre SIRS e CARS, mas sim que essas fases ocorrem conjuntamente, sendo esse fato um dos principais determinantes da resposta desordenada que acontece nessa síndrome. Ainda, como a LXA₄ está sendo produzida nas primeiras horas após a infecção, numa fase em que a redução da resposta inflamatória pode beneficiar a propagação do patógeno, ela pode representar perigo ao hospedeiro. Acreditamos que nesse caso, a produção de LXA₄ no início da sepse esteja favorecendo o patógeno. Assim, o momento da sepse é crucial para que agentes anti-inflamatórios exerçam um papel benéfico ao hospedeiro e não ao patógeno (SERHAN et al., 2007).

A ideia de que a LXA₄ pode favorecer patógenos já foi levantada por outros autores (ALIBERTI; BAFICA, 2005; BAFICA et al., 2005), mas o presente estudo é o primeiro que apresenta esse conceito na sepse. Para suportar essa ideia, nós administramos tanto a LXA₄ quanto o seu análogo BML-111 no início da sepse, e observamos o agravamento do processo infeccioso, provavelmente devido à redução da migração de PMN para o foco. A redução da migração de PMN é uma das ações anti-inflamatórias mais bem descritas da LXA₄ (SERHAN; SAVILL, 2005; SERHAN; YACOUBIAN; YANG, 2008; YE et al., 2009).

Embora o ensaio de citometria de fluxo não tenha revelado um aumento da expressão do receptor FPR2/ALX em neutrófilos de animais sépticos, os agonistas e antagonista desse receptor foram capazes de modular essa população de células de maneira importante. Como já é

descrito na literatura, a modulação dessas células pela LXA_4 se dá principalmente de maneira indireta, através da redução da expressão de moléculas de adesão em neutrófilos e células endoteliais, da redução da produção do agente quimiotático IL-8 pelas células epiteliais, e da estimulação da produção de NO pelas células endoteliais, sendo que todos estes efeitos resultam na redução da migração de células PMN para o foco (MADERNA; GODSON, 2009; SERHAN et al., 2007). Embora não tenhamos investigado esses mecanismos no nosso modelo, é possível que os efeitos observados sejam decorrentes destas ações já bem descritas da LXA_4 .

Um achado bastante interessante observado nos ensaios de citometria de fluxo foi o aumento da expressão dos receptores FPR2/ALX em macrófagos (CD11c+ CD11b+ F4/80+) e em uma população de células mieloides imaturas (CD11c+ CD11b+ Gr-1+ F4/80+). As células mieloides imaturas encontradas são uma população heterogênea com núcleo em forma de anel (*ring-like*) que expandem em praticamente todas as condições inflamatórias (GABRILOVICH; NAGARAJ, 2009). O aumento dessa população de células na sepse já foi descrito previamente (BRUDECKI et al., 2012; CUENCA et al., 2011; DELANO et al., 2007), mas o aumento da expressão do receptor anti-inflamatório FPR2/ALX nessas células é um dado novo e bastante interessante.

Uma vez que o receptor FPR2/ALX foi fortemente expresso nessas células imaturas, seria razoável pensar que a LXA_4 pudesse modular também essa população heterogênea. O tratamento precoce dos animais com a LXA_4 ou com o seu análogo, além de promover a menor migração das células PMN para o foco, também reduziu a migração das células *ring-like*, ilustrando que a LXA_4 também é capaz de modular negativamente o recrutamento dessa população de células. Embora a maioria dos estudos mostre que essas células mieloides imaturas exibam função imunossupressora (ARORA et al., 2010; GABRILOVICH; NAGARAJ, 2009), outros estudos sugerem que essas células, na verdade, protegem o hospedeiro de infecções, uma vez que elas estão envolvidas na produção de quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias

(DELANO et al., 2007), bem como na produção de ROS e de NO pela NOS-2 (CUENCA et al., 2011; PASTUŁA; MARCINKIEWICZ, 2011). Como a migração de células foi avaliada 6 h após a infecção, de acordo com o trabalho de Brudecki e colaboradores (2012) é provável que nesse momento as células *ring-like* estejam exibindo um fenótipo pró-inflamatório. Dessa maneira sugerimos que, juntamente com a redução de PMN para o foco, a redução das células *ring-like* também contribua para o agravamento do processo infeccioso.

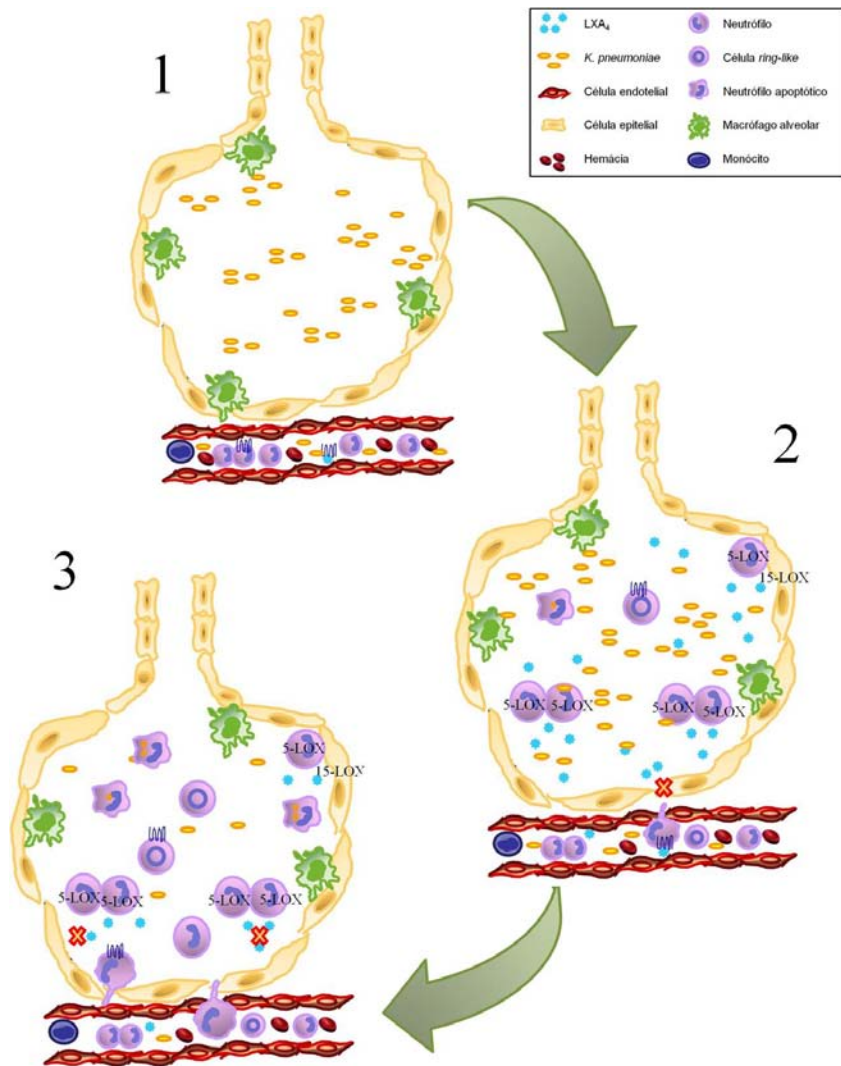
Como levantado anteriormente, observamos também um expressivo aumento da expressão do FPR2/ALX em macrófagos dos animais sépticos. Embora seja descrito que a LXA₄ estimule a quimiotaxia de células mononucleares frente a alguns estímulos (MADERNA; GODSON, 2009), não observamos nenhuma alteração quantitativa dessas células no foco infeccioso em resposta à administração de agonistas ou antagonistas do receptor FPR2/ALX. Alguns trabalhos de sepe mostram que agentes pró-resolução como as lipoxinas (WALKER et al., 2011) e resolvinas (SPITE et al., 2009) aumentam a migração de células mononucleares para o foco, reduzindo o processo infeccioso mesmo com a redução da migração de neutrófilos. Esses achados diferem dos nossos dados, pois observamos que frente à administração de LXA₄ ou do análogo BML-111, a redução da migração de PMN levou ao agravamento da infecção, sem haver alteração no número de células mononucleares. Não sabemos o motivo dessa discrepância, mas podemos especular que talvez a LXA₄ possa ter aumentado a saída desses fagócitos do local inflamado através do sistema linfático, já que esta é uma ação bem descrita desse mediador (CAMPBELL et al., 2007; SERHAN; YACOUBIAN; YANG, 2008), e dessa maneira, não foi possível observar o aumento dessas células no foco infeccioso.

Ainda, essas diferenças poderiam ser devidas à intensidade da infecção, do momento em que foi feita a intervenção farmacológica, do tipo do patógeno, e do modelo experimental, já que os trabalhos citados acima utilizaram o modelo de CLP. Ademais, a ação melhor descrita da LXA₄ em macrófagos é o aumento da capacidade de fagocitar PMN apoptóticos, sem necessariamente aumentar o número destas células no

foco. De qualquer maneira, são necessários estudos adicionais para entender e esclarecer essas diferenças.

Contrariamente, e confirmando que a liberação de LXA₄ endógena no início da sepse esteja favorecendo o patógeno, o tratamento dos animais com o antagonista do receptor FPR2/ALX (BOC-1) nas primeiras horas após a infecção promoveu o aumento da migração de leucócitos, principalmente de PMN, para o foco, reduziu a disseminação e a infecção local (Esquema 15), bem como aumentou a taxa de sobrevivência dos animais. Assim mostramos que a inibição da ação da LXA₄ no início do processo da sepse foi capaz de melhorar a resposta do hospedeiro contra a infecção.

Como o receptor FPR2/ALX é considerado promíscuo devido a grande variedade de ligantes que possui, na tentativa de descartar que o efeito do BOC-1 seja pelo antagonismo de outro possível mediador endógeno, também avaliamos a migração de células para o foco infeccioso após a inibição da produção endógena de LXA₄. Para isso pré-tratamos os animais sépticos com o inibidor da 5-LOX (BWA4C) ou com o inibidor da 15-LOX (PD146176), as principais enzimas envolvidas na síntese de LXA₄ nas mucosas. Embora a 12-LOX também seja importante para a biossíntese de LXA₄ nos vasos sanguíneos através da interação entre PMN e plaquetas, a produção de LXA₄ pela 15-LOX no epitélio pulmonar é muito bem descrita e bastante importante em humanos (BONNANS et al., 2007), exibindo proteção em doenças inflamatórias das vias respiratórias (BONNANS et al., 2007; LEVY et al., 2002). E corroborando os resultados do BOC-1, o tratamento dos animais com ambos os inibidores resultou no aumento da migração de células para o foco infeccioso, sugerindo fortemente que o BOC-1 esteja de fato antagonizando os efeitos da LXA₄ produzida endogenamente através do bloqueio dos receptores FPR2/ALX.



Esquema 15: Papel da LXA₄ no início da sepse. A presença do patógeno nos pulmões dos animais (1), através da liberação de PAMPs, estimula o recrutamento de leucócitos para o local. A interação entre PMN-PMN e PMN-células epiteliais leva ao aumento da biossíntese de LXA₄ no foco infeccioso (2), exercendo papel inibitório na quimiotaxia e ativação de células, prejudicando o controle da infecção. A administração do antagonista do receptor FPR2/ALX, BOC-1, levou a uma maior migração de células para o foco e um adequado controle da infecção (3), acarretando em aumento da sobrevivência dos animais.

Esses resultados reforçam ainda mais a importância que o controle inicial da infecção tem na sobrevivência dos animais. Embora alguns estudos mostrem que o aumento de neutrófilos pode trazer danos também ao hospedeiro (HENSON; JONHSTON, 1987), é bem descrito que o recrutamento de neutrófilos para o local da infecção aumenta a *clearance* de bactérias e aumenta a sobrevivência na sepse (CRACIUN; SCHULLER; REMICK, 2010; PAULA-NETO et al., 2011; SPILLER et al., 2010), principalmente quando este aumento ocorre nos momentos iniciais do processo (CRACIUN; SCHULLER; REMICK, 2010).

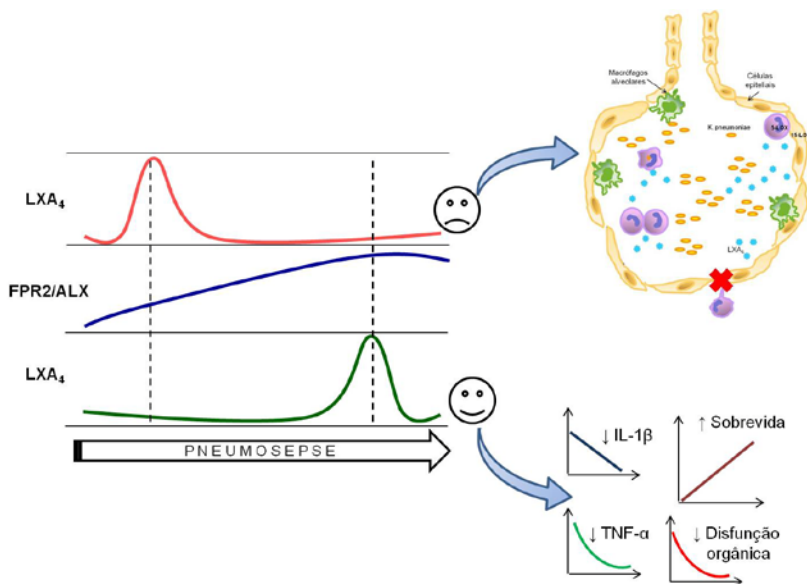
Além do papel anti-inflamatório e pró-resolução, já foi descrito que a LXA₄ e seus análogos são capazes de promover relaxamento dependente de endotélio, tendo um importante papel na modulação do tônus vascular (LEFER et al., 1988; VON DER WEID et al., 2004). Assim, investigamos o possível envolvimento da LXA₄ na hipotensão e hiporreatividade a agentes vasoconstritores que ocorre na sepse através do tratamento dos animais com o antagonista BOC-1. Observamos que o antagonismo da LXA₄ foi capaz de prevenir parcialmente o desenvolvimento da hipotensão e reverter uma parcela da hiporreatividade à fenilefrina que ocorre na sepse. Já foi mostrado que a LXA₄ está envolvida na hipotensão causada pela aspirina, sendo esta dependente de endotélio. Em vasos de condutância, como na aorta, foi mostrado que o relaxamento era NO-dependente, mas na microcirculação o relaxamento foi atribuído ao EDHF (LEFER et al., 1988; VON DER WEID et al., 2004). Como a identidade do EDHF ainda é desconhecida, neste caso podemos especular que o relaxamento pode ser mediado pela PGI₂ já que a LXA₄ é capaz de estimular a liberação deste mediador pelas células endoteliais (BREZINSKI et al., 1989). Acreditamos que essa melhora dos aspectos cardiovasculares dos animais contribuiu, junto com outros fatores, para o aumento da sobrevivência frente ao tratamento com o BOC-1.

É interessante notar que a redução da mortalidade dos animais foi observada apenas quando o BOC-1 foi administrado no início do processo, falhando quando administrado mais tardiamente na sepse (24 h). Esse fato vai ao encontro do perfil de biossíntese de LXA₄ que

observamos no nosso modelo o qual foi maior nas primeiras horas após a infecção, corroborando outros trabalhos que observaram um perfil semelhante frente a outros estímulos (BANNENBERG et al., 2005). Já o tratamento dos animais com a LXA₄ ou com o seu análogo sintético BML-111 no início da sepse, não alterou de maneira significativa a taxa de mortalidade, apesar de agravar o quadro infeccioso.

Como a sepse é um evento dinâmico que exhibe variações ao longo do tempo, e dados da literatura mostram que agentes pró-resolução exercem papel benéfico na sepse (SPITE et al., 2009; WALKER et al., 2011), resolvemos investigar se o efeito do tratamento com a LXA₄ em tempos mais avançados traria benefícios ao hospedeiro, já que o processo infeccioso já não é tão acentuado, mas a inflamação ainda é importante. Assim tratamos os animais com a LXA₄ ou com seu análogo BML-111 24 h após a infecção, e corroborando com trabalhos prévios (WALKER et al., 2011) observamos o aumento da sobrevida dos animais.

Acreditamos que o tratamento em períodos mais tardios da sepse com a LXA₄ tenha aumentado a sobrevida dos animais por proteger o hospedeiro de uma resposta inflamatória acentuada tardia, como podemos observar pela redução das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-1 β . Consequentemente, acreditamos que a redução da resposta inflamatória durante as fases mais tardias previne a disfunção de órgãos, como sugerem os resultados obtidos de redução de lactato e creatinina plasmáticos, reduzindo a gravidade da sepse. Assim, conjuntamente esses fatores contribuíram para o aumento da sobrevida dos animais (Esquema 16).



Esquema 16: Duplo papel da LXA_4 em diferentes tempos da sepse. No início do processo, o aumento da geração de LXA_4 endógena agrava a infecção. Em tempos mais tardios, ela reduz o processo inflamatório exacerbado e a disfunção orgânica, aumentando a sobrevida dos animais.

Embora não tenhamos avaliado a participação de outros possíveis ligantes endógenos do FPR2/ALX que podem ser liberados em processos infecciosos, como a anexina-1 e proteína sérica amiloide A, nem a participação do receptor aril-hidrocarboneto (AhR) nas ações da LXA_4 , as semelhanças observadas no curso temporal dos acontecimentos sugerem que esses efeitos sejam realmente mediados pela via LXA_4 -FPR2/ALX. Uma limitação que deve ser comentada é sobre as ferramentas farmacológicas que utilizamos nesse trabalho. Como antagonista de FPR2/ALX, o BOC-2 é considerado um pouco mais seletivo que o BOC-1 (YE et al., 2009), mas diversos trabalhos já mostraram que o BOC-1 é capaz de antagonizar a resposta da LXA_4 mediada por FPR2/ALX tanto em camundongos (CONTE et al., 2010;

JOHN et al., 2007; SOUZA et al., 2007) quanto em células humanas (FIORUCCI et al., 2003), além de antagonizar o efeito da AT-RvD1 (do inglês, *Aspirin-Triggered Resolvin D1*) mediado pelo FPR2/ALX (BENTO et al., 2011). Dentre todos os antagonistas, o considerado mais seletivo para o FPR2/ALX é o peptídeo WRW4 (STENFELDT et al., 2007; YE et al., 2009), entretanto faltam trabalhos na literatura utilizando essa ferramenta em camundongos. Ademais, é descrito que os peptídeos BOC-1 e BOC-2 inibem as funções dos FPRs, mas a seletividade desses antagonistas para os subtipos de várias espécies distintas não é muito clara, já que os receptores humanos e murinos não são exatamente idênticos. Apesar das diferenças existentes entre humanos e camundongos tanto no que diz respeito à anatomia e fisiologia, quanto à farmacologia, há importantes semelhanças que justificam os estudos com modelos animais. É de extrema importância que essas diferenças sejam lembradas e levadas em consideração tanto para o desenho experimental quanto para a interpretação dos resultados.

Nosso trabalho confirma a importância das avaliações temporais nos estudos de sepse, sendo que isso tem sido objeto de investigação no nosso laboratório ao longo dos anos (FERNANDES et al., 2009; SORDI; FERNANDES; ASSREUY, 2010; SORDI et al., 2011). Nossos dados reforçam a complexidade dessa síndrome e a dificuldade de se conseguir um tratamento adequado para essa patologia, já que a sepse é uma faca de dois gumes: no início do processo, a resposta pró-inflamatória deve ser intensa para controlar a infecção, e mais tardiamente deve ser bem regulada para não prejudicar o hospedeiro. Qualquer intervenção inadequada nesse processo pode ter consequências deletérias irreversíveis.

7. CONCLUSÕES

O presente estudo mostra que a sepse induzida por pneumonia é um processo dinâmico que exhibe grandes variações ao longo do tempo. Mediadores importantes no início do processo não são necessariamente relevantes em momentos mais tardios. Há uma janela temporal em que mediadores pró- e anti-inflamatórios podem ser benéficos ou representar perigo ao hospedeiro.

Dentre os mediadores anti-inflamatórios, mostramos que a LXA_4 está aumentada no foco infeccioso no início da sepse, e esse aumento inicial contribuiu para uma resposta inapropriada do hospedeiro frente à infecção. Suportando a ideia de um papel prejudicial da LXA_4 no início da sepse, mostramos que a inibição farmacológica do seu receptor teve impacto positivo na sobrevivência dos animais sépticos. Finalmente, quando administrada em momentos mais tardios, a LXA_4 reduziu a resposta inflamatória excessiva e aumentou a sobrevivência dos animais.

Esses dados sugerem pela primeira vez, que a redução nos mecanismos anti-inflamatórios da LXA_4 no início do processo, ou o seu aumento em períodos mais tardios, são intervenções que se mostraram benéficas na sepse induzida por pneumonia e podem ser interessantes estratégias terapêuticas no auxílio do tratamento dessa patologia.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAM, E. et al. Drotrecogin alfa (activated) for adults with severe sepsis and a low risk of death. **The New England Journal of Medicine**, v. 353, n. 13, p. 1332-41, 29 set. 2005.

ADIB-CONQUY, M.; CAVAILLON, J.-M. Compensatory anti-inflammatory response syndrome. **Thrombosis and Haemostasis**, p. 36-47, 6 dez. 2008.

AL-BANNA, N. A et al. Histopathological and ultrastructural studies of a mouse lung model of *Campylobacter jejuni* infection. **Journal of Medical Microbiology**, v. 57, n. Pt 2, p. 210-7, fev. 2008.

ALBERTI, C. et al. Epidemiology of sepsis and infection in ICU patients from an international multicentre cohort study. **Intensive Care Medicine**, v. 28, n. 2, p. 108-21, fev. 2002.

ALIBERTI, J.; BAFICA, A. Anti-inflammatory pathways as a host evasion mechanism for pathogens. **Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids**, v. 73, n. 3-4, p. 283-8, 2005.

ALIBERTI, J.; SERHAN, C.; SHER, A. Parasite-induced Lipoxin A4 Is an Endogenous Regulator of IL-12 Production and Immunopathology in *Toxoplasma gondii* Infection. **Journal of Experimental Medicine**, v. 196, n. 9, p. 1253-1262, 4 nov. 2002.

ANGUS, D. C. et al. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. **Critical Care Medicine**, v. 29, n. 7, p. 1303-10, jul. 2001.

ANGUS, D. C.; WAX, R. S. Epidemiology of sepsis: an update. **Critical Care Medicine**, v. 29, n. 7 Suppl, p. S109-16, jul. 2001.

ARIEL, A. et al. Aspirin-triggered lipoxin A4 and B4 analogs block extracellular signal-regulated kinase-dependent TNF- α secretion from human T cells. **Journal of Immunology**, v. 170, n. 12, p. 6266-72, 15 jun. 2003.

ARORA, M. et al. TLR4/MyD88-induced CD11b+Gr-1 int F4/80+ non-migratory myeloid cells suppress Th2 effector function in the lung. **Mucosal Immunology**, v. 3, n. 6, p. 578-93, nov. 2010.

ASSREUY, J. Nitric oxide and cardiovascular dysfunction in sepsis. **Endocrine, Metabolic & Immune disorders drug targets**, v. 6, n. 2, p. 165-73, jun. 2006.

ATAR, S. et al. Atorvastatin-induced cardioprotection is mediated by increasing inducible nitric oxide synthase and consequent S-nitrosylation of cyclooxygenase-2. **American Journal of Physiology. Heart and circulatory physiology**, v. 290, n. 5, p. H1960-8, maio. 2006.

BAE, Y. S. et al. Differential activation of formyl peptide receptor-like 1 by peptide ligands. **Journal of Immunology**, v. 171, n. 12, p. 6807-13, 15 dez. 2003.

BAFICA, A. et al. Host control of Mycobacterium tuberculosis is regulated by 5-lipoxygenase – dependent lipoxin production. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 115, n. 6, 2005.

BANNENBERG, G. L. et al. Exogenous pathogen and plant 15-lipoxygenase initiate endogenous lipoxin A4 biosynthesis. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 199, n. 4, p. 515-23, 16 fev. 2004.

BANNENBERG, G. L. et al. Molecular circuits of resolution: formation and actions of resolvins and protectins. **Journal of Immunology**, v. 174, n. 7, p. 4345-55, 1 abr. 2005.

BECK, M. A. et al. Selenium deficiency increases the pathology of an influenza virus infection. **FASEB Journal**, v. 15, n. 8, p. 1481-3, jun. 2001.

BENJAMIM, C. F.; FERREIRA, S. H.; CUNHA, F. Q. Role of nitric oxide in the failure of neutrophil migration in sepsis. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 182, n. 1, p. 214-23, jul. 2000.

BENTO, A. F. et al. Omega-3 fatty acid-derived mediators 17(R)-hydroxy docosahexaenoic acid, aspirin-triggered resolvin D1 and resolvin D2 prevent experimental colitis in mice. **Journal of Immunology**, v. 187, n. 4, p. 1957-69, 15 ago. 2011.

BIRNBAUM, Y. et al. Augmentation of myocardial production of 15-epi-lipoxin-a4 by pioglitazone and atorvastatin in the rat. **Circulation**, v. 114, n. 9, p. 929-35, 29 ago. 2006.

BLOMGRAN, R.; ERNST, J. D. Lung neutrophils facilitate activation of naive antigen-specific CD4+ T cells during Mycobacterium tuberculosis infection. **Journal of Immunology**, v. 186, n. 12, p. 7110-9, 15 jun. 2011.

BONE, R. C. Sir Isaac Newton, sepsis, SIRS and CARS. **Critical Care Medicine**, v. 24, n. 7, p. 1125-1128, 1996.

BONNANS, C. et al. Synthesis and anti-inflammatory effect of lipoxins in human airway epithelial cells. **Biomedicine & pharmacotherapy = Biomédecine & pharmacothérapie**, v. 61, n. 5, p. 261-7, jun. 2007.

BRASH, A. R. Lipoxygenases: Occurrence, Functions, Catalysis, and Acquisition of Substrate. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 34, p. 23679-23682, aug. 1999.

BREZINSKI, M. E. et al. Lipoxins stimulate prostacyclin generation by human endothelial cells. **FEBS letters**, v. 245, n. 1-2, p. 167-72, 13 mar. 1989.

BRUDECKI, L. et al. Myeloid-derived suppressor cells evolve during sepsis and can enhance or attenuate the systemic inflammatory response. **Infection and Immunity**, v. 80, n. 6, p. 2026-34, jun. 2012.

BURAS, J. A.; HOLZMANN, B.; SITKOVSKY, M. Animal models of sepsis: setting the stage. **Nature Reviews Drug discovery**, v. 4, n. 10, p. 854-65, out. 2005.

CAMPBELL, E. L. et al. Resolvin E1 promotes mucosal surface clearance of neutrophils: a new paradigm for inflammatory resolution. **FASEB Journal**, v. 21, n. 12, p. 3162-70, out. 2007.

CAVALCANTI, Y. V. N. et al. Role of TNF-Alpha, IFN-Gamma, and IL-10 in the Development of Pulmonary Tuberculosis. **Pulmonary medicine**, v. 2012, n. 745483, p. 1-10, jan. 2012.

CHEN, K. et al. A critical role for the G protein-coupled receptor mFPR2 in airway inflammation and immune responses. **Journal of Immunology**, v. 184, n. 7, p. 3331-5, 1 abr. 2010.

CHIANG, N. et al. Aspirin triggers antiinflammatory 15-epi-lipoxin A4 and inhibits thromboxane in a randomized human trial. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 42, p. 15178-83, 19 out. 2004.

CHIANG, N. et al. The Lipoxin Receptor ALX : Potent Ligand-Specific and Stereoselective Actions in Vivo. **Pharmacological Reviews**, v. 58, n. 3, p. 463-487, 2006.

CLÀRIA, J.; SERHAN, C. N. Aspirin triggers previously undescribed bioactive eicosanoids by human endothelial cell-leukocyte interactions. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 92, n. 21, p. 9475-9, 10 out. 1995.

COGEN, A. L.; MOORE, T. A. Beta2-microglobulin-dependent bacterial clearance and survival during murine *Klebsiella pneumoniae* bacteremia. **Infection and Immunity**, v. 77, n. 1, p. 360-6, jan. 2009.

COHEN, J. The immunopathogenesis of sepsis. **Nature**, v. 420, n. 6917, p. 885-91, 2002.

CONTE, F. P. et al. Lipoxin A(4) attenuates zymosan-induced arthritis by modulating endothelin-1 and its effects. **British Journal of Pharmacology**, v. 161, n. 4, p. 911-24, out. 2010.

CRACIUN, F. L.; SCHULLER, E. R.; REMICK, D. G. Early enhanced local neutrophil recruitment in peritonitis-induced sepsis improves bacterial clearance and survival. **Journal of immunology**, v. 185, n. 11, p. 6930-8, 1 dez. 2010.

CUENCA, A. G. et al. A paradoxical role for myeloid-derived suppressor cells in sepsis and trauma. **Molecular Medicine**, v. 17, n. 3-4, p. 281-92, 2011.

DAVIS, K. A et al. Burn injury and pulmonary sepsis: development of a clinically relevant model. **The Journal of Trauma**, v. 56, n. 2, p. 272-8, fev. 2004.

DEITCH, E. A. Animal models of sepsis and shock: a review and lessons learned. **Shock**, v. 10, n. 6, p. 442-5, jan. 1998.

DELANO, M. J. et al. MyD88-dependent expansion of an immature GR-1(+)CD11b(+) population induces T cell suppression and Th2 polarization in sepsis. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 204, n. 6, p. 1463-74, 11 jun. 2007.

DINARELLO, C. A. Anti-inflammatory Agents: Present and Future. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 935-50, 19 mar. 2010.

DUFTON, N.; PERRETTI, M. Therapeutic anti-inflammatory potential of formyl-peptide receptor agonists. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 127, n. 2, p. 175-88, ago. 2010.

EICHACKER, P. Q. Risk and the Efficacy of Antiinflammatory Agents: Retrospective and Confirmatory Studies of Sepsis. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 166, n. 9, p. 1197-1205, 19 jul. 2002.

EVANS, J. H. et al. Intracellular calcium signals regulating cytosolic phospholipase A2 translocation to internal membranes. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 276, n. 32, p. 30150-60, agos. 2001.

FERNANDES, D. et al. Late , but Not Early , Inhibition of Soluble Guanylate Cyclase Decreases Mortality in a Rat Sepsis Model. **Journal of Pharmacological and Experimental Therapeutics**, v. 328, n. 3, p. 991-999, 2009.

FERNANDES, D.; ASSREUY, J. Nitric oxide and vascular reactivity in sepsis. **Shock**, v. 30 Suppl 1, n. December 2007, p. 10-3, out. 2008.

FILEP, J. G.; KHREISS, T.; JÓZSEF, L. Lipoxins and aspirin-triggered lipoxins in neutrophil adhesion and signal transduction. **Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids**, v. 73, n. 3-4, p. 257-62, 2005.

FIORUCCI, S. et al. Evidence that 5-lipoxygenase and acetylated cyclooxygenase 2-derived eicosanoids regulate leukocyte-endothelial adherence in response to aspirin. **British Journal of Pharmacology**, v. 139, n. 7, p. 1351-9, ago. 2003.

FISHER, C. J. et al. Treatment of septic shock with the tumor necrosis factor receptor: Fc Fusion Protein. **The New England Journal of Medicine**, v. 334, n. 26, p. 1697-1702, 1996.

FUNK, C. D. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. **Science**. v. 294, n. 5548, p. 1871-5, 30 nov. 2001.

GABRILOVICH, D. I.; NAGARAJ, S. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. **Nature Reviews Immunology**, v. 9, n. 3, p. 162-74, mar. 2009.

GANGEMI, S. et al. Aging is characterized by a profound reduction in anti-inflammatory lipoxin A4 levels. **Experimental Gerontology**, v. 40, n. 7, p. 612-4, jul. 2005.

GEBSKA, A.; OLSZANECKI, R.; KORBUT, R. Endotoxaemia in rats: role of leukocyte sequestration in rapid pulmonary nitric oxide synthase-2 expression. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 56, n. 2, p. 299-311, 2005.

GENTRY, C. A et al. Adverse outcomes associated with the use of drotrecogin alfa (activated) in patients with severe sepsis and baseline bleeding precautions. **Critical Care Medicine**, v. 37, n. 1, p. 19-25, jan. 2009.

GEROULANOS, S.; DOUKA, E. T. Historical perspective of the word "sepsis". **Intensive Care Medicine**, v. 32, n. 12, p. 2077, dez. 2006.

GILES, K. M. et al. Glucocorticoid augmentation of macrophage capacity for phagocytosis of apoptotic cells is associated with reduced p130Cas expression, loss of paxillin/pyk2 phosphorylation, and high levels of active Rac. **Journal of Immunology**, v. 167, p. 976-986; 2001.

GILROY, D. W. et al. Inducible cyclooxygenase may have anti-inflammatory properties. **Nature Medicine**, v. 5, n. 6, p. 698-701, jun. 1999.

GILROY, D. W. et al. Inflammatory resolution: new opportunities for drug discovery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 3, n. 5, p. 401-16, maio. 2004.

GODSON, C. et al. Cutting edge: lipoxins rapidly stimulate nonphlogistic phagocytosis of apoptotic neutrophils by monocyte-derived macrophages. **Journal of Immunology**, v. 164, n. 4, p. 1663-7, 15 fev. 2000.

GOULDING, N. J. et al. Anti-inflammatory lipocortin 1 production by peripheral blood leucocytes in response to hydrocortisone. **Lancet**, v. 335, n. 8703, p. 1416-8, 16 jun. 1990.

GRANGER, D. L. et al. Metabolic fate of L-arginine in relation to microbistatic capability of murine macrophages. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 85, n. 1, p. 264-73, jan. 1990.

GREISMAN, S. E.; DUBUY, J. B.; WOODWARD, C. L. Experimental gram-negative bacterial sepsis: prevention of mortality not preventable by antibiotics alone. **Infection and Immunity**, v. 25, n. 2, p. 538-57, ago. 1979.

GRONERT, B. K. et al. Identification of a Human Enterocyte Lipoxin A4 Receptor that is regulated by IL-13 and Interferon γ and inhibits Tumor Necrosis Factor α -induced IL-8 release. **Journal of Experimental Medicine**, v. 187, n. 8, p. 4-13, 1998.

GRONERT, K. et al. Selectivity of Recombinant Human Leukotriene D4, Leukotriene B4, and Lipoxin A4 Receptors with Aspirin-Triggered 15-epi-LXA4 and Regulation of Vascular and Inflammatory Responses. **American Journal of Pathology**, v. 158, n. 1, p. 3-9, 2001.

GROSSER, N. et al. Heme oxygenase-1 induction may explain the antioxidant profile of aspirin. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 308, n. 4, p. 956-960, set. 2003.

HE, H.-Q. et al. Functional characterization of three mouse formyl Peptide receptors. **Molecular Pharmacology**, v. 83, n. 2, p. 389-98, fev. 2013.

HELGADOTTIR, A. et al. The gene encoding 5-lipoxygenase activating protein confers risk of myocardial infarction and stroke. **Nature Genetics**, v. 36, n. 3, p. 233-9, mar. 2004.

HENSON, P.; JONHSTON, R. Tissue Injury in Inflammation. Oxidants, Proteinases and Cationic Proteins. **Journal of Clinical Investigation**, v. 79, n. 3, p. 669-674, 1987.

HJOBERG, J. et al. Expression of nitric oxide synthase-2 in the lungs decreases airway resistance and responsiveness. **Journal of Applied Physiology**, v. 97, n. 1, p. 249-59, jul. 2004.

HORTON, J. W. et al. Bactericidal/permeability increasing protein attenuates the myocardial inflammation/dysfunction that occurs with burn complicated by subsequent infection. **Journal of Applied Physiology**, v. 103, n. 3, p. 948-58, set. 2007.

JIN, S.W. et al. Posttreatment with aspirin-triggered lipoxin A4 analog attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice: the role of heme oxygenase-1. **Anesthesia and Analgesia**, v. 104, n. 2, p. 369-77, fev. 2007.

JOHN, C. D. et al. Formyl peptide receptors and the regulation of ACTH secretion: targets for annexin A1, lipoxins, and bacterial peptides. **FASEB Journal**, v. 21, n. 4, p. 1037-46, abr. 2007.

JÓZSEF, L. et al. Lipoxin A4 and aspirin-triggered 15-epi-lipoxin A4 inhibit peroxynitrite formation, NF-kappa B and AP-1 activation, and IL-8 gene expression in human leukocytes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 20, p. 13266-71, 1 out. 2002.

KAN, W. et al. 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**, v. 21, n. 3, p. 281-7, mar. 2004.

KARP, C. L. et al. Defective lipoxin-mediated anti-inflammatory activity in the cystic fibrosis airway. **Nature Immunology**, v. 5, n. 4, p. 388-92, abr. 2004.

KIM, S. F.; HURI, D. A; SNYDER, S. H. Inducible nitric oxide synthase binds, S-nitrosylates, and activates cyclooxygenase-2. **Science**, v. 310, n. 5756, p. 1966-70, 23 dez. 2005.

KLEBANOFF SJ. Myeloperoxidase: contribution to the microbicidal activity of intact leukocytes. **Science**. v. 169, n. 3950, p. 1095-7, set. 1970.

KOLACZKOWSKA, E., KUBES, P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. **Nature Review Immunology**, v. 13, n. 3, p. 159-75, mar. 2013.

LANGE, M. et al. Time course of nitric oxide synthases, nitrosative stress, and poly(ADP ribosylation) in an ovine sepsis model. **Critical Care**, v. 14, n. 4, p. R129, jan. 2010.

LE, Y.; MURPHY, P. M.; WANG, J. M. Formyl-peptide receptors revisited. **Trends in Immunology**, v. 23, n. 11, p. 541-8, nov. 2002.

LEFER, A. et al. Lipoxins A4 and B4 Comparison of eicosanoids having bronchoconstrictor and vasodilator actions but lacking platelet aggregatory activity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 85, p. 8340-8344, 1988.

LEVY, B. D. et al. Multi-pronged inhibition of airway hyper-responsiveness and inflammation by lipoxin A(4). **Nature Medicine**, v. 8, n. 9, p. 1018-23, set. 2002.

LIU, Y. et al. Glucocorticoids promote nonphlogistic phagocytosis of apoptotic leukocytes. **Journal of Immunology**, v. 162, n. 6, p. 3639-46, 15 mar. 1999.

MACHADO, F. S. et al. Anti-inflammatory actions of lipoxin A4 and aspirin-triggered lipoxin are SOCS-2 dependent. **Nature Medicine**, v. 12, n. 3, p. 330-4, mar. 2006.

MADDOX, J. F. et al. Lipoxin A4 stable analogs are potent mimetics that stimulate human monocytes and THP-1 cells via a G-protein-linked lipoxin A4 receptor. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 11, p. 6972-8, 14 mar. 1997.

MADERNA, P. et al. Modulation of phagocytosis of apoptotic neutrophils by supernatant from dexamethasone-treated macrophages and annexin-derived peptide Ac(2-26). **Journal of Immunology**, v. 174, n. 6, p. 3727-33, 15 mar. 2005.

MADERNA, P.; GODSON, C. Lipoxins: resolutionary road. **British Journal of Pharmacology**, v. 158, n. 4, p. 947-59, out. 2009.

MIGEOTTE, I.; COMMUNI, D.; PARMENTIER, M. Formyl peptide receptors: a promiscuous subfamily of G protein-coupled receptors controlling immune responses. **Cytokine & growth factor reviews**, v. 17, n. 6, p. 501-19, dez. 2006.

MIZGERD, J. P.; SKERRETT, S. J. Animal models of human pneumonia. **American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology**, v. 294, n. 3, p. L387-98, mar. 2008.

MONCADA, S.; PALMER, R.; HIGGS, E. Nitric Oxide: Physiology, Pathophysiology and Pharmacology. **Pharmacological Reviews**, v. 43, n. 2, p. 109-142, 1991.

MOORE, L. J. et al. Sepsis in general surgery: a deadly complication. **American Journal of Surgery**, v. 198, n. 6, p. 868-74, dez. 2009.

MOORE, T. A. et al. Divergent Role of Gamma Interferon in a Murine Model of Pulmonary versus Systemic Klebsiella pneumoniae Infection. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 11, p. 6310-8, nov. 2002.

MORRIS, P. E. et al. A placebo-controlled, double-blind, dose-escalation study to assess the safety, tolerability and pharmacokinetics / pharmacodynamics of single and multiple intravenous infusions of AZD9773 in patients with severe sepsis and septic shock. **Critical Care**, v. 16, n. 1, p. R31, jan. 2012.

MOVAHEDI, K. et al. Identification of discrete tumor-induced myeloid-derived suppressor cell subpopulations with distinct T cell-suppressive activity. **Blood**, v. 111, n. 8, p. 4233-44, 15 abr. 2008.

MUENZER, J. T. et al. Pneumonia after cecal ligation and puncture: a clinically relevant "two-hit" model of sepsis. **Shock**, v. 26, n. 6, p. 565-70, dez. 2006.

MUNFORD, R. S.; PUGIN, J. Normal Responses to Injury Prevent Systemic Inflammation and Can Be Immunosuppressive. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 163, n. 2, p. 316-21, fev. 2001.

NAGARAJ, S. et al. Regulatory myeloid suppressor cells in health and disease. **Cancer Research**, v. 69, n. 19, p. 7503-6, 1 out. 2009.

NARDI, G. M. et al. Opioid analgesics in experimental sepsis: effects on physiological, biochemical, and haemodynamic parameters. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, p. 1-7, 5 abr. 2012.

NASCIMENTO-SILVA, V. et al. Novel lipid mediator aspirin-triggered lipoxin A4 induces heme oxygenase-1 in endothelial cells. **American Journal of Physiology. Cell physiology**, v. 289, n. 3, p. C557-63, set. 2005.

OPAL, S. et al. Confirmatory interleukin-1 receptor antagonist trial in severe sepsis: A phase III , randomized , doubleblind , placebo-controlled, multicenter trial. **Critical Care Medicine**, v. 25, n. 7, p. 1115-1124, 1997.

O'BRIEN, J. M. et al. Sepsis. **The American Journal of Medicine**, v. 120, n. 12, p. 1012-22, dez. 2007.

PAMPLONA, F. A. et al. Anti-inflammatory lipoxin A4 is an endogenous allosteric enhancer of CB1 cannabinoid receptor. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 51, p. 21134-9, dez. 2012.

PARKINSON, J. F. Lipoxin and synthetic lipoxin analogs: an overview of anti-inflammatory functions and new concepts in immunomodulation. **Inflammation & Allergy - Drug Targets**, v. 5, p. 91-106, 2006.

PASTUŁA, A.; MARCINKIEWICZ, J. Myeloid-derived suppressor cells: a double-edged sword? **International Journal of Experimental Pathology**, v. 92, n. 2, p. 73-8, abr. 2011.

PAUL-CLARK, M. J. et al. 15-epi-lipoxin A4-mediated induction of nitric oxide explains how aspirin inhibits acute inflammation. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 200, n. 1, p. 69-78, 5 jul. 2004.

PAULA-NETO, H. A et al. Inhibition of guanylyl cyclase restores neutrophil migration and maintains bactericidal activity increasing survival in sepsis. **Shock**, v. 35, n. 1, p. 17-27, jan. 2011.

PERRETTI, M. et al. Endogenous lipid- and peptide-derived anti-inflammatory pathways generated with glucocorticoid and aspirin treatment activate the lipoxin A4 receptor. **Nature Medicine**, v. 8, n. 11, p. 1296-302, nov. 2002.

PERRETTI, M.; D'ACQUISTO, F. Annexin A1 and glucocorticoids as effectors of the resolution of inflammation. **Nature Reviews Immunology**, v. 9, n. 1, p. 62-70, jan. 2009.

PERRETTI, M.; FLOWER, R. J. Measurement of lipocortin 1 levels in murine peripheral blood leukocytes by flow cytometry: modulation by glucocorticoids and inflammation. **British Journal of Pharmacology**, v. 118, n. 3, p. 605-10, jun. 1996.

PETERS-GOLDEN, M. "Good" lipids for asthma. **Nature Medicine**, v. 8, n. 9, p. 931-2, set. 2002.

POLI-DE-FIGUEIREDO, L. F. et al. Experimental models of sepsis and their clinical relevance. **Shock**, v. 30 Suppl 1, p. 53-9, out. 2008.

PREISER, J. C. et al. Time course of inducible nitric oxide synthase activity following endotoxin administration in dogs. **Nitric oxide: biology and chemistry**, v. 5, n. 2, p. 208-11, abr. 2001.

PRYSYAZHNA, O.; RUDYK, O.; EATON, P. Single atom substitution in mouse protein kinase G eliminates oxidant sensing to cause hypertension. **Nature Medicine**, v. 18, n. 2, p. 286-90, fev. 2012.

QIU, P. et al. The evolving experience with therapeutic TNF inhibition in sepsis: considering the potential influence of risk of death. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v. 20, n. 11, p. 1555-1564, 2011.

RANGEL-FRAUSTO, M. S. Sepsis: still going strong. **Archives of Medical Research**, v. 36, n. 6, p. 672-81, 2005.

REVILLE, K. et al. Lipoxin A4 redistributes myosin IIA and Cdc42 in macrophages: implications for phagocytosis of apoptotic leukocytes. **The Journal of Immunology**, v. 176, p. 1878-1888, 2006.

RICE, T. W. et al. Safety and efficacy of affinity-purified, anti-tumor necrosis factor-alpha, ovine fab for injection (CytoFab) in severe sepsis. **Critical Care Medicine**, v. 34, n. 9, p. 2271-81, set. 2006.

RIVOLTINI, L. et al. Immunity to cancer: attack and escape in T lymphocyte-tumor cell interaction. **Immunological reviews**, v. 188, n. 1, p. 97-113, out. 2002.

RODGERS, K. et al. Lipoxin A4 modifies platelet-derived growth factor-induced pro-fibrotic gene expression in human renal mesangial cells. **The American Journal of Pathology**, v. 167, n. 3, p. 683-94, set. 2005.

RODRIGUEZ, P. C.; QUICENO, D. G.; OCHOA, A. C. L-arginine availability regulates T-lymphocyte cell-cycle progression. **Blood**, v. 109, n. 4, p. 1568-73, 15 fev. 2007.

SCANNELL, M.; MADERNA, P. Lipoxins and annexin-1: resolution of inflammation and regulation of phagocytosis of apoptotic cells. **TheScientificWorldJournal**, v. 6, p. 1555-73, jan. 2006.

SCHALDACH, C. M.; RIBY, J.; BJELDANES, L. F. Lipoxin A4: a new class of ligand for the Ah receptor. **Biochemistry**, v. 38, n. 23, p. 7594-600, 8 jun. 1999.

SCHWAB, J. M. et al. Resolvin E1 and protectin D1 activate inflammation-resolution programmes. **Nature**, v. 447, n. 7146, p. 869-74, 14 jun. 2007.

SERHAN, C. N. Lipoxins and aspirin-triggered 15-epi-lipoxins are the first lipid mediators of endogenous anti-inflammation and resolution. **Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids**, v. 73, n. 3-4, p. 141-62, 2005.

SERHAN, C. N. et al. Resolution of inflammation: state of the art, definitions and terms. **FASEB Journal**, v. 21, n. 2, p. 325-32, fev. 2007.

SERHAN, C. N.; CHIANG, N.; VAN DYKE, T. E. Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. **Nature Reviews Immunology**, v. 8, n. 5, p. 349-61, maio. 2008.

SERHAN, C. N.; SAVILL, J. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. **Nature Immunology**, v. 6, n. 12, p. 1191-7, dez. 2005.

SERHAN, C. N.; YACOUBIAN, S.; YANG, R. Anti-inflammatory and proresolving lipid mediators. **Annual review of Pathology**, v. 3, p. 279-312, jan. 2008.

SILVA, E. et al. Brazilian Sepsis Epidemiological Study (BASES study). **Critical Care**, v. 8, n. 4, p. R251-60, ago. 2004.

SOARES, A. C. et al. Role of the platelet-activating factor (PAF) receptor during pulmonary infection with gram negative bacteria. **British Journal of Pharmacology**, v. 137, p. 621-628, 2002.

SOARES, M. P. et al. Heme oxygenase-1 modulates the expression of adhesion molecules associated with endothelial cell activation. **Journal of Immunology**, v. 172, n. 6, p. 3553-63, 15 mar. 2004.

SORDI, R. et al. Early potassium channel blockade improves sepsis-induced organ damage and cardiovascular dysfunction. **British Journal of Pharmacology**, v. 163, n. 6, p. 1289-301, jul. 2011.

SORDI, R.; FERNANDES, D.; ASSREUY, J. Differential involvement of potassium channel subtypes in early and late sepsis-induced hyporesponsiveness to vasoconstrictors. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 56, n. 2, p. 184-9, ago. 2010.

SOUZA, D. G. et al. The required role of endogenously produced lipoxin A4 and annexin-1 for the production of IL-10 and inflammatory hyporesponsiveness in mice. **Journal of Immunology**, v. 179, n. 12, p. 8533-43, 15 dez. 2007.

SPECTOR, W. G., WILLOUGHBY, D. A. The inflammatory response. **Bacteriological Review**, v. 27, p. 118-154, 1963.

SPILLER, F. et al. Hydrogen sulfide improves neutrophil migration and survival in sepsis via K+ATP channel activation. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 182, n. 3, p. 360-8, 1 ago. 2010.

SPITE, M. et al. Resolvin D2 is a potent regulator of leukocytes and controls microbial sepsis. **Nature**, v. 461, n. 7268, p. 1287-91, 29 out. 2009.

SPITE, M.; SERHAN, C. N. Novel lipid mediators promote resolution of acute inflammation: impact of aspirin and statins. **Circulation Research**, v. 107, n. 10, p. 1170-84, 12 nov. 2010.

STENFELDT, A.-L. et al. Cyclosporin H, Boc-MLF and Boc-FLFLF are antagonists that preferentially inhibit activity triggered through the formyl peptide receptor. **Inflammation**, v. 30, n. 6, p. 224-9, dez. 2007.

SUNIL, V. R. et al. Activation of type II alveolar epithelial cells during acute endotoxemia. **American Journal of Physiology. Lung cellular and molecular physiology**, v. 282, n. 4, p. L872-80, abr. 2002.

SUTHERLAND, R. E. et al. Mast cell IL-6 improves survival from Klebsiella pneumoniae and Sepsis by Enhancing Neutrophil Killing. **The Journal of Immunology**, v. 181, p. 5598-5605, 2010.

SVENSSON, C. I.; ZATTONI, M.; SERHAN, C. N. Lipoxins and aspirin-triggered lipoxin inhibit inflammatory pain processing. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 204, n. 2, p. 245-52, 19 fev. 2007.

SZABÓ, C. The Pathophysiological Role of Peroxynitrite in Shock, Inflammation, and Ischemia-Reperfusion injury. **Shock**, v. 6, n. 1, p. 79-88, 1996.

SZABÓ, C.; MÓDIS, K. Pathophysiological roles of peroxynitrite in circulatory shock. **Shock**, v. 34 Suppl 1, n. 16, p. 4-14, set. 2010.

TSIOTOU, A. G. et al. Septic shock; current pathogenetic concepts from a clinical perspective. **Medical Science Monitor**, v. 11, n. 3, p. 76-85, 2005.

VAN DER POLL, T. et al. Interleukin-10 impairs host defense in murine pneumococcal pneumonia. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 174, n. 5, p. 994-1000, nov. 1996.

VANCE, R. E. et al. The opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* carries a secretable arachidonate 15-lipoxygenase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 7, p. 2135-9, 17 fev. 2004.

VON DER WEID, P.Y. et al. Aspirin-triggered, cyclooxygenase-2-dependent lipoxin synthesis modulates vascular tone. **Circulation**, v. 110, n. 10, p. 1320-5, 7 set. 2004.

WALKER, J. et al. Lipoxin a4 increases survival by decreasing systemic inflammation and bacterial load in sepsis. **Shock**, v. 36, n. 4, p. 410-6, out. 2011.

WALLACE, J. L.; FIORUCCI, S. A magic bullet for mucosal protection... and aspirin is the trigger! **Trends in pharmacological sciences**, v. 24, n. 7, p. 323-6, jul. 2003.

WALLEY, K. R. et al. Balance of inflammatory cytokines related to severity and mortality of murine sepsis. **Infection and Immunity**, v. 64, n. 11, 1996.

WANG, E. et al. Pulmonary and Systemic Host Response to Streptococcus pneumoniae and Klebsiella pneumoniae Bacteremia in Normal and Immunosuppressed Mice. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 9, p. 5294-5304, 2001.

WARD, N. S.; CASSERLY, B.; AYALA, A. The compensatory anti-inflammatory response syndrome (CARS) in critically ill patients. **Clinics in Chest Medicine**, v. 29, n. 4, p. 617-25, dez. 2008.

WENZEL, R. P.; EDMOND, M. B. Septic Shock — Evaluating Another Failed Treatment. **The New England Journal of Medicine**, v. 366, n. 22, p. 2122-2124, 2012.

WICHER, K. et al. Target organs of infection in guinea pigs with acquired congenital syphilis. **Infection and Immunity**, v. 64, n. 8, p. 3174-9, ago. 1996.

WU, F.; WILSON, J. X.; TYML, K. Ascorbate inhibits iNOS expression and preserves vasoconstrictor responsiveness in skeletal muscle of septic mice. **American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology**, v. 285, n. 1, p. R50-6, jul. 2003.

YE, R. D. et al. International Union of Basic and Clinical Pharmacology . LXXIII. Nomenclature for the Formyl Peptide Receptor (FPR) Family. **Pharmacological Reviews**, v. 61, n. 2, p. 119-161, 2009.