UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA

PAPEL PROTETOR DO RECEPTOR QUIMIOTÁTICO CCR5
DURANTE A SEPSE EXPERIMENTAL

FERNANDA VARGAS E SILVA CASTANHEIRA

RIBEIRÃO PRETO

2012

FERNANDA VARGAS E SILVA CASTANHEIRA

PAPEL PROTETOR DO RECEPTOR QUIMIOTÁTICO CCR5

DURANTE A SEPSE EXPERIMENTAL

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Área de Concentração: Farmacologia
Orientador: Prof. Dr. Fernando de Queiróz Cunha

RIBEIRÃO PRETO

2012

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por quaisquer meios convencionais ou eletrônicos, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica

Castanheira, Fernanda Vargas e Silva

Papel protetor do receptor quimiotático CCR5 durante a sepse experimental
Ribeirão Preto, 2012.
103p.

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências.
Área de concentração: Farmacologia- Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo.

Orientador: Cunha, Fernando de Queiróz.

Palavras-chave: Sepses; CCR5; Migração de neutrófilos.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Fernanda Vargas e Silva Castanheira

Papel protetor do receptor quimiotático CCR5 durante a sepse experimental.

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Farmacologia

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. Fernando de Queiróz Cunha
FMRP-USP

Prof. Dr. Dario Simões Zamboni
FMRP-USP

Prof. Dr. Jamil Assreuy
UFSC

Trabalho realizado no Laboratório de Dor e Inflamação do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo com auxílio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Dedicatória

Dedicatória

*Aos meus pais, **Ralfo e Deta,***

*pelo amor, carinho, alegrias, ensinamentos, educação, coragem e incentivos
em minha vida.*

*Aos meus irmãos, **Marcelo e Marina,***

*pelo amor, carinho, amizade, incentivos e alegrias compartilhadas durante
todos esses anos de nossas vidas.*

Agradecimentos

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Fernando de Queiróz Cunha, pela oportunidade de ingressar em seu grupo de pesquisa e em seu laboratório, pela orientação e pelos valiosos ensinamentos que contribuíram muito para o meu crescimento profissional e intelectual.

Ao professor Dr. José Carlos Alves-Filho, pela participação no delineamento deste trabalho, pelos ensinamentos e contribuições que certamente contribuíram para meu aprimoramento científico e crescimento profissional.

Ao professor Dr. Thiago Mattar Cunha, pela participação neste trabalho, pelos ensinamentos e confiança durante esses anos, pela contribuição para o meu crescimento científico e pela amizade.

Ao professor Dr. Dario Zamboni, pelo aceite em participar desta banca avaliadora, que será de grande valia para as discussões deste trabalho, e pela confiança em permitir a minha participação em trabalhos de seu grupo de pesquisa que, certamente, contribuíram para meu aprimoramento científico.

Ao professor Dr. Jamil Assreuy, pela disponibilidade em participar desta banca examinadora, que será de grande valia para as discussões deste trabalho.

Ao professor Dr. Sérgio Ferreira, pelas discussões científicas, pelo carinho e pelos momentos de descontração ao longo desses anos.

Aos amigos Fabiane Sônego e ao Alexandre Kanashiro, pela participação no delineamento experimental deste trabalho e ajuda nos experimentos, pela leitura, correções e conversas sobre esse e outros trabalhos, pela grande contribuição no meu aprendizado e crescimento científico e, acima de tudo, pela grande amizade, carinho e companheirismo compartilhados durante esses anos. Muito obrigada!

Aos amigos Paula Czaikoski, Fabrício, Jhimmy, Rafael França, Sílvia, Daniele Nascimento, Adriana e Walter pelas discussões científicas sobre este trabalho, momentos de diálogo e aprendizado, pelos ensinamentos, pela amizade e momentos de descontração durante esses anos.

Ao professor Dr. Fernando Spiller, pelos ensinamentos e confiança durante o meu primeiro ano neste laboratório, pelas conversas e pela contribuição no meu aprimoramento científico e pela amizade durante todos esses anos.

Aos amigos Sabrina, Larissa, Fabi, Paula, Panda, Jhimmy, Jaqueline, Fabrício, Gabi, Rafa França, Adriana, Kana, Paulo e Walter pela amizade, pela convivência e pelo

companheirismo durante os momentos de lazer e descontração, momentos imprescindíveis durante esses anos. Muito obrigada!

Aos demais colegas e amigos do laboratório de Inflamação e Dor: Larissa, Raphael Panda, Jaqueline, Gabriela, Paulo, Guilherme, Daniel, Cristina, Andressa Freitas, Flávio, Rafael Ferreira, Maria Cláudia, Andressa Duarte, Rangel, Vanessa, Miriam, Alexandre Lopes, Flávia, Jozi, Andressa Zaparolli, Andreza Urba, David, Paula Barbim, Thiago Garlet, pelas maravilhosas companhias, momentos de descontração e alegrias.

Ao amigo Rafael Poloni pela grande amizade desde os primeiros dias em que nos conhecemos, pelo apoio incondicional nos momentos mais difíceis dessa trajetória, pela disponibilidade e prontidão em sempre ajudar durante esses anos e pelos momentos de descontração e alegria que passamos juntos.

Ao amigo Alejandro Prado por compartilhar das dificuldades e dos momentos de alegria durante esses anos.

Aos amigos e funcionários do departamento de Farmacologia, pelo carinho, momentos de diversão, e aprendizado divididos.

Aos técnicos Giu, Katinha, Diva, Serginho, Ieda e Fernando pelo suporte técnico, pela amizade, pelo carinho, pela disponibilidade, pela atenção e pela ajuda durante todo esse período. Muito obrigada por tudo! Ainda, obrigada Giu pelas dosagens de citocinas e quimiocinas presentes nesse trabalho.

Aos funcionários dos biotérios: Júlio, Rubinho, Inês e Eliana, pelo suporte na criação, distribuição e cuidado com os animais utilizados neste estudo.

Aos professores do departamento de Farmacologia pelo convívio e ensinamentos passados, e aqueles de outros departamentos que foram importantes na minha formação profissional.

Ao Ramon e ao Acácio e às secretárias Soninha e Fátima, pela disponibilidade em sempre ajudar, pelo auxílio em questões burocráticas, pela paciência, pelo carinho e pela amizade.

Ao CNPq, CAPES e FAPESP, pelo auxílio financeiro na realização deste trabalho, em especial ao CNPq, pelo fornecimento da bolsa.

A todos, que direta ou indiretamente, contribuíram para meu crescimento pessoal e profissional e para a realização deste trabalho.

Muito obrigada!

“É muito melhor arriscar coisas grandiosas, alcançar triunfo e glória, mesmo expondo-se à derrota, do que formar fila com os pobres de espírito, que nem sofrem muito, nem gozam muito, porque vivem nesta penumbra cinzenta que não conhecem a vitória nem a derrota”.

Franklin Roosevelt

Resumo

Resumo

A sepse é uma resposta inflamatória sistêmica resultante da inabilidade do sistema imune em controlar uma infecção, onde a taxa de sobrevivência está associada ao recrutamento de neutrófilos para o local da infecção. Tem sido demonstrado que a expressão de receptores quimiotáticos pode ser alterada durante a sepse. Neutrófilos de animais *naïves* respondem às quimiocinas CXCL, mas são irresponsivos às quimiocinas CC. Entretanto, dados do nosso laboratório mostram que a expressão de CXCR2 é reduzida na sepse, prejudicando a migração de neutrófilos para o foco da infecção. Além disso, ocorre o aparecimento do receptor CCR2 nos neutrófilos, levando à infiltração dessas células no pulmão e outros órgãos. Nesse contexto, o nosso objetivo foi investigar a possível expressão do receptor CCR5 em neutrófilos e seu papel na evolução da sepse. Demostramos que animais sham-operados expressam baixos níveis de CCR5 e altos níveis de CXCR2. Entretanto, sob a condição de sepse experimental induzida por ligação e perfuração do ceco (CLP), neutrófilos circulantes e que migraram para a cavidade peritoneal expressam altos níveis de CCR5 em paralelo com a internalização de CXCR2. Além disso, animais deficientes para CCR5 (CCR5^{-/-}), submetidos à CLP, apresentam diminuição na taxa de sobrevivência, redução na migração de neutrófilos para o foco da infecção, aumento da disseminação bacteriana, aumento no infiltrado de neutrófilos no pulmão e aumento nos níveis de marcadores de lesão do coração e rim, quando comparados com animais selvagens (WT). Adicionalmente, a incubação de neutrófilos isolados da medula óssea com LPS aumentou a expressão de CCR5 e os tornou responsivos à MIP-1 β (ligante de CCR5), induzindo quimiotaxia. Também demonstramos que o receptor CCR5 possui importante papel durante a adesão de neutrófilos ao endotélio vascular para posterior migração. Em conjunto, esses resultados indicam que durante a CLP, o aumento da expressão de CCR5 em neutrófilos tem um papel protetor, visto que animais CCR5^{-/-} sépticos apresentam reduzida migração de neutrófilos para o foco infeccioso, inflamação sistêmica acentuada e baixa taxa de sobrevivência.

Abstract

Abstract

Sepsis is a systemic inflammatory response resulted from the inability of the innate immune system to control infections, being the survival rate associated to the recruitment of neutrophils to the infection site. It has been demonstrated that chemokine receptors expression profile can be altered under sepsis conditions. Neutrophils from naïve mice respond to CXC chemokines, but are usually unresponsive to CC chemokines. However, data from our laboratory show that CXCR2 expression is down regulated, impairing the neutrophil migration to infection focus. In addition, CCR2 appears on the surface of neutrophils, mediating the accumulation of these cells in the lung and other organs. In this context, we aimed to investigate the possible expression of CCR5 receptor on neutrophils and its role on sepsis evolution. We showed that neutrophils from sham mice express high levels of CXCR2 and low levels of CCR5. However, during experimental sepsis, induced by cecal ligation and puncture (CLP), in parallel with CXCR2 internalization, neutrophils from the circulation or from the peritoneal cavity express higher levels of CCR5. Interestingly, deficient mice for the CCR5 receptor (CCR5^{-/-}), undergone to CLP show decreased survival rate, reduction in the neutrophil migration to the site of infection, increase in the numbers of bacteria, increase in the neutrophil infiltration in lung and heart and increase in the levels of markers of injuries in heart and kidney, when compared to wild type mice (WT). In addition, the incubation of bone marrow derived-neutrophils with LPS enhances the expression of CCR5 and renders them responsive to CCL4 (a ligant of CCR5)-induced chemotaxis. Moreover, we demonstrated that CCR5 receptor has an important role during neutrophil adhesion to the vascular endothelium before transmigration. Together, these results indicate that during CLP-induced sepsis, the increase of the expression of CCR5 on neutrophils plays a host protective role, since CCR5^{-/-} mice under sepsis present reduced neutrophil migration to infection focus, high systemic inflammation and low survival rate.

Lista de abreviaturas

Lista de abreviaturas

ACCP	<i>American College of Chest Physicians</i>
BSA	Albumina sérica bovina
CC	Subfamília de quimiocinas CC, com dois resíduos de cisteínas (CC) adjacentes
CCL2	Quimiocina ligante 2, com dois resíduos de cisteínas (CC) adjacentes- também conhecida como MCP-1
CCL3	Quimiocina ligante 3, com dois resíduos de cisteínas (CC) adjacentes- também conhecida como MIP-1 α
CCL4	Quimiocina ligante 4, com dois resíduos de cisteínas (CC) adjacentes- também conhecida como MIP-1 β
CCL5	Quimiocina ligante 5, com dois resíduos de cisteínas (CC) adjacentes- também conhecida como RANTES
CCR1	Receptor 1 de quimiocinas com dois resíduos de cisteínas (CC) adjacentes
CCR2	Receptor 2 de quimiocinas com dois resíduos de cisteínas (CC) adjacentes
CCR5	Receptor 5 de quimiocinas com dois resíduos de cisteínas (CC) adjacentes
CCR5^{-/-}	Animal deficiente para o receptor CCR5
CkMB	Creatinina quinase MB
CLP	Ligação e perfuração do ceco
CXC	Subfamília de quimiocinas CXC, com dois primeiros resíduos de cisteína separados por um aminoácido
CXCL1	Quimiocina ligante 1, com dois primeiros resíduos de cisteína separados por um aminoácido (CXC) – também conhecida como KC
CXCL2	Quimiocina ligante 2, com dois primeiros resíduos de cisteína separados por um aminoácido (CXC) – também conhecida como MIP-2
CXCL8	Quimiocina ligante 8, com dois primeiros resíduos de cisteína separados por um aminoácido (CXC) – também conhecida como IL-8
CXCR2	<i>Chemokine (C-X-C motif) receptor 2</i>
DMSO	Dimetil Sulfóxido
DPOC	Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica
EDTA	Etilenodiaminatetracetato de sódio
E.P.M.	Erro padrão médio
FACS	Citometria de fluxo
GPCR	Receptores acoplados à proteína G
HBSS	<i>Hank's Balanced Salt Solution</i>
i.p.	Intraperitoneal
ICAM	Molécula de adesão intracelular

IL	Interleucina
KC	<i>keratinocyte-derived chemokine</i>
KDa	Kilo Dalton
LPS	Lipopolissacarídeo
LTA	Ácido Lipoteicóico
MIP-1α	<i>Monocyte chemotactic protein 3</i> (conhecida como CCL3)
MIP-1β	<i>Monocyte chemotactic protein 4</i> (conhecida como CCL4)
MIP-2	<i>Macrophage-inflammatory protein-2</i> (conhecida como CXCL2)
M.O.	Medula óssea
MPO	Mieloperoxidase
NFκB	<i>Fator de transcrição nuclear kappa B</i>
PBS	Tampão salina fosfato
PE	Ficoeritrina
PGN	Peptideoglicanas
PRR	Receptor de reconhecimento padrão
PaO₂	Pressão parcial de oxigênio no sangue
s.c.	Sub-cutâneo
SCC	<i>Society of Critical Care Medicine</i>
SIRS	Síndrome da resposta inflamatória sistêmica
TLR	Receptor do tipo <i>Toll-like</i>
TLR2	Receptor do tipo <i>Toll-like 2</i>
TLR4	Receptor do tipo <i>Toll-like 4</i>
TNF	Fator de necrose tumoral
UFC=CFU	Unidades formadoras de colônia
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
VCAM	Molécula de adesão de célula vascular
WT	<i>Wide-type</i> (animais selvagens – C57BL/6)

Lista de figuras

Lista de figuras

Figura 1: Expressão do receptor quimiotático CCR5 em neutrófilos circulantes após a CLP 58

Figura 2: Expressão do CCR5 em neutrófilos circulantes de animais deficientes para CCR5 59

Figura 3: Expressão do CXCR2 em neutrófilos ciurculantes após a CLP _____ 62

Figura 4: Expressão do CCR5 e do CXCR2 em neutrófilos circulantes após a CLP _____ 63

Figura 5: Expressão do CCR5 em neutrófilos do lavado peritoneal após a CLP _____ 65

Figura 6: Ativação de TLR4 induz a expressão do CCR5em neutrófilos _____ 67

Figura 7: Ativação de TLR4 leva à responsividade quimiotática de neutrófilos para a quimiocina MIP-1 β ligante do CCR5 _____ 69

Figura 8: Animais deficientes do receptor quimiotático CCR5 e da quimiocina MIP-1 α são mais suscetíveis à CLP _____ 71

Figura 9: Animais CCR5^{-/-} apresentam falência na migração de neutrófilos para o foco infeccioso após a CLP _____ 73

Figura 10: Animais CCR5^{-/-} apresentam maior crescimento bacteriano no foco infeccioso e na circulação após a CLP _____ 75

Figura 11: Quantificação de MIP-2 na circulação após a CLP _____ 76

Figura 12: Animais CCR5^{-/-} apresentam maior infiltrado neutrofílico no pulmão após a CLP **Erro! Indica**

Figura 13: Animais CCR5^{-/-} apresentam maior lesão cardíaca e renal após a CLP _____ 80

Figura 14: Quantificação de quimiocinas no lavado peritoneal após a CLP _____ 82

Figura 15: Avaliação da adesão de leucócitos durante a sepse _____ 84

Sumário

Sumário

1. INTRODUÇÃO	26
1.1. SEPSE.....	27
1.1.1. DEFINIÇÃO E EPIDEMIOLOGIA	27
1.1.2. FISIOPATOLOGIA	30
1.2. MIGRAÇÃO DE NEUTRÓFILOS DURANTE A SEPSE: FOCO INFECCIOSO VERSUS INFILTRADO NEUTROFÍLICO	31
1.3. QUIMIOCINAS E SEUS RECEPTORES DURANTE A SEPSE.....	35
1.3.1. CCR5	38
2. OBJETIVOS.....	41
OBJETIVO GERAL.....	42
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	42
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	43
3.1. CAMUNDONGOS	44
3.2. PURIFICAÇÃO DOS POLIMORFONUCLEARES (PMNs) DA MEDULA ÓSSEA (M.O.)	44
3.3 ENSAIO DE QUIMIOTAXIA	45
3. 4 EXPRESSÃO DE CCR5 POR CITOMETRIA DE FLUXO	46
3. 5 MODELO EXPERIMENTAL DE SEPSE POLIMICROBIANA	46
3. 6 MIGRAÇÃO DE NEUTRÓFILOS PARA A CAVIDADE PERITONEAL	47
3. 7 CONTAGEM TOTAL DE LEUCÓCITOS.....	468
3. 8 CONTAGEM DIFERENCIAL DE LEUCÓCITOS	48
3.9 QUANTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS	48
3.10 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA MIELOPEROXIDASE (MPO)	49
3.11 QUANTIFICAÇÃO DE QUIMIOCINAS NO LAVADO PERITONEAL E NO SORO	50
3.12 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA CREATININA QUINASE-MB (CK-MB) E DA CONCENTRAÇÃO DE URÉIA NO SORO	51
3.13 MICROSCOPIA INTRAVITAL.....	52
3.14 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS	53
3.15 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	54
4. RESULTADOS.....	56
4.1. EXPRESSÃO DO RECEPTOR QUIMIOTÁTICO CCR5 EM NEUTRÓFILOS CIRCULANTES DURANTE A SEPSE.....	57
4.2. EXPRESSÃO DOS RECEPTORES QUIMIOTÁTICOS CXCR2 E CCR5 EM NEUTRÓFILOS CIRCULANTES DURANTE A SEPSE	60

4.3. EXPRESSÃO DO RECEPTOR QUIMIOTÁTICO CCR5 EM NEUTRÓFILOS DA CAVIDADE PERITONEAL DE CAMUNDONGOS DURANTE A SEPSE.....	64
4.4. ATIVAÇÃO DO TLR4 INDUZ A EXPRESSÃO DO CCR5 E INTERNALIZAÇÃO DO CXCR2 EM NEUTRÓFILOS	66
4.5. ATIVAÇÃO DE TLR4 LEVA À RESPONSABILIDADE QUIMIOTÁTICA DE NEUTRÓFILOS PARA A QUIMIOCINA MIP-1B, LIGANTE DO CCR5.....	68
4.6. ANIMAIS DEFICIENTES DE CCR5 E MIP-1A SÃO MAIS SUSCETÍVEIS À SEPSE POLIMICROBIANA.....	70
4.7. ANIMAIS DEFICIENTES DE CCR5 APRESENTAM DIMINUIÇÃO NA MIGRAÇÃO DE NEUTRÓFILOS PARA A CAVIDADE PERITONEAL	72
4.8. ANIMAIS CCR5 ^{-/-} APRESENTAM MENOR EFICIÊNCIA NO CONTROLE DA INFECÇÃO.....	74
4.9. ANIMAIS CCR5 ^{-/-} APRESENTAM MAIOR INFLAMAÇÃO SISTÊMICA DURANTE A SEPSE POLIMICROBIANA.....	76
4.10. ANIMAIS CCR5 ^{-/-} APRESENTAM MAIOR INFILTRADO NEUTROFÍLICO NO PULMÃO DURANTE A SEPSE POLIMICROBIANA	77
4.11. ANIMAIS CCR5 ^{-/-} APRESENTAM MAIOR LESÃO CARDÍACA E RENAL DURANTE A SEPSE POLIMICROBIANA.....	79
4.12. QUANTIFICAÇÃO DE QUIMIOCINAS NO FOCO DA INFECÇÃO APÓS A CLP	81
4.13. ANIMAIS CCR5 ^{-/-} APRESENTAM DIMINUIÇÃO NO NÚMERO DE ADESÃO DE LEUCÓCITOS QUANDO NA PRESENÇA DA QUIMIOCINA MIP-1B.....	83
5. DISCUSSÃO	85
6. CONCLUSÃO	95
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	97

Introdução

1 Introdução

1.1.Sepse

1.1.1. Definição e epidemiologia

A sepsé é uma resposta inflamatória sistêmica resultante da inabilidade do sistema de defesa do organismo em controlar uma infecção (Cohen, 2002). Até o ano de 1991, termos e definições imprecisas foram utilizados nos casos de sepsé, dificultando a identificação do quadro real e a instauração de uma terapia precoce (Riedemann *et al.*, 2003). No intuito de caracterizar termos apropriados para auxiliar o diagnóstico e permitir o esclarecimento dos estágios desta doença, o *American College of Chest Physicians (ACCP)* e a *Society of Critical Care Medicine (SCC)* se reuniram na *Consensus Conference*, em 1991. A partir desta conferência, novas definições se tornaram facilmente aplicáveis aos diferentes estágios da doença. A tabela 1 define os principais termos relacionados à sepsé. Assim, a sepsé foi definida como uma resposta inflamatória sistêmica frente à infecção, caracterizando um processo progressivo de lesão tecidual, onde disfunção de múltiplos órgãos e sistemas (DMOS) representa sua expressão mais grave (Bone *et.al.*,1992).

Tabela 1. Definições de sepse e outros conceitos importantes

Termo	Definições
Infecção	Processo patológico causado pela invasão de tecidos, fluidos e cavidades do corpo normalmente estéreis por micro-organismos patogênicos.
Bacteremia	Presença de bactérias viáveis no sangue.
Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica (SIRS)	Resposta inflamatória sistêmica a uma variedade de insultos clínicos graves. A resposta é manifestada por duas ou mais das seguintes condições: - Temperatura > 38° ou < 36°C; - Frequência cardíaca > 90 batimentos/min; - Frequência respiratória > 20 movimentos/min ou PaCO ₂ < 32 torr (< 4,3 kPa); - Leucócitos > 12.000 células/mm ³ ou 10% de formas imaturas (bastões).
Sepse	Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica concomitante com uma infecção.
Sepse Grave	Sepse associada à disfunção orgânica, hipoperfusão ou hipotensão.
Choque séptico	Estado no qual o paciente apresenta falência circulatória aguda caracterizada por hipotensão arterial persistente não responsiva a vasoconstritores e a reposição de fluidos.
Síndrome da Disfunção Múltipla de Órgãos (MODS)	Presença de função orgânica alterada em pacientes agudamente enfermos, nos quais a homeostase não pode ser mantida sem intervenção.

Adaptado de Bone *et al.*, 1992.

Apesar dos grandes avanços na compreensão da fisiopatologia da sepse e do surgimento de novas intervenções terapêuticas, a incidência desta vem crescendo assustadoramente. No Brasil, um estudo epidemiológico multicêntrico denominado BASES (*Brazilian Sepsis Epidemiological Study*) revelou que a incidência de sepse é de 57 para cada 1000 pacientes-dia admitidos nas Unidades de Terapia Intensiva (UTI) e que o custo médio de cada paciente internado nesta condição por dia é de aproximadamente 1.870,74 e 1.412,46 reais para os não sobreviventes e sobreviventes, respectivamente, com período médio de internação em torno de 9 a 10 dias (Silva *et al.*, 2004; Sogayar *et al.*, 2008). Além disso, o índice de mortalidade é de cerca de 34,7%, podendo chegar a 52,2% no caso de pacientes que evoluem para choque séptico, uma das principais complicações observadas nessa patologia. Nos Estados Unidos, a sepse é a segunda principal causa de morte entre pacientes em UTI e a décima causa geral de morte. Os custos para o tratamento foram calculados em torno de 17 bilhões de dólares para os mais de 750.000 pacientes que desenvolvem sepse anualmente (Angus *et al.*, 2001).

Considerando as repercussões sociais e econômicas desencadeadas pela sepse, intensos estudos a fim de entender a fisiopatologia da sepse são ainda necessários. A fisiopatologia da sepse é intensamente estudada em nosso laboratório, utilizando principalmente o modelo de sepse induzida por ligação e perfuração do ceco (CLP) (Alves-filho *et al.*, 2009; Freitas *et al.*, 2009; Secher *et al.*, 2009). Nesse modelo, através de cirurgia, o ceco do animal é exposto e perfurado fazendo com que o conteúdo fecal seja extravasado na cavidade abdominal desencadeando uma sepse polimicrobiana. A gravidade da doença é diretamente

proporcional à quantidade de bactérias extravasada na cavidade (Benjamim *et al.*, 2000).

1.1.2. Fisiopatologia

O termo sepse tem origem grega, com significado referente à putrefação, devido ao mau odor exalado pelos portadores desta doença (Beutler & Rietschel, 2003). A sepse decorre de infecções bacterianas, fúngicas ou virais (Jean-Baptiste *et al.*, 2007). No entanto, infecções bacterianas são as mais frequentes, com proporções similares de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas como agentes etiológicos desta patologia (Vincent *et al.*, 2006).

Durante um processo infeccioso, o patógeno é reconhecido pelas células residentes, que iniciam a resposta inflamatória. Quando um número limitado de bactérias invade um organismo, a resposta local geralmente é suficiente para combater o patógeno. Entretanto, durante a sepse, a resposta local não é capaz de combater o patógeno levando à disseminação bacteriana e causando a resposta inflamatória sistêmica (Stearns-Kurosawa *et.al.*, 2011).

Para que a resposta seja desencadeada contra o patógeno, é necessário o reconhecimento deste pelas células do hospedeiro (Janeway *et al.*, 2001), que acontece através de receptores de reconhecimento padrão de patógenos (*PRRs* - *pattern recognition receptor*). Os receptores melhores descritos entre os *PRRs* são os receptores do tipo *Toll* (*TLR* - *Toll-like receptor*), os quais são capazes de reconhecer vários produtos bacterianos como o lipopolissacarídeo (LPS) de bactérias gram-negativas, o ácido lipoteicóico (LTA) e peptideoglicanas (PGN) de

bactérias gram-positivas, bem como componentes da parede celular de fungos e ácidos nucléicos virais. No caso de bactérias gram-negativas, um dos receptores importantes para o seu reconhecimento pelo hospedeiro é o TLR4 (*Toll-like receptor 4*), responsável pelo reconhecimento do LPS (Martin *et al*, 2003). A ligação do LPS ao domínio extracelular do TLR4 inicia uma complexa via de transdução de sinais, que culmina na ativação do fator de transcrição nuclear B (NF- κ B) e posterior aumento de citocinas próinflamatórias (Miller *et al.*, 2005).

De fato, a secreção de citocinas pelas células inflamatórias residentes, induzida pela ativação dos receptores de reconhecimento padrão, tem um papel importante na estimulação da síntese de moléculas de adesão na superfície de células endoteliais colaborando, desta forma, para o recrutamento de outras células para o local da inflamação (Kubes, 2002). No entanto, durante a patogênese da sepse, a alta concentração sistêmica de citocinas, como o fator de necrose tumoral α (*Tumor Necrosis Factor, TNF- α*), interleucina (IL)-1 β , IL-6 e IL-8 acarretam lesões e disfunção de órgãos (Stearns-Kurosawa *et.al.*, 2011).

1.2. Migração de neutrófilos durante a sepse: foco infeccioso *versus* infiltrado neutrofílico

Durante um processo infeccioso, os neutrófilos são as primeiras células a chegar ao foco da infecção. Eles possuem um importante papel na defesa contra infecções bacterianas, incluindo a sepse, devido ao grande estoque de enzimas proteolíticas e a rápida produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio capazes de eliminar bactérias patogênicas (Medzhitov, 2000).

De maneira didática, a migração dos neutrófilos da corrente sanguínea para o foco inflamatório durante um processo infeccioso envolve as seguintes etapas: marginação, rolamento, adesão e transmigração, e ocorre nas vênulas pós-capilares (Alves-Filho *et al.*, 2008). A liberação de mediadores inflamatórios produzidos pelas células residentes no foco infeccioso induz a expressão de moléculas conhecidas como selectinas no endotélio vascular e nos leucócitos. Durante o processo de marginação, movimento do neutrófilo do centro para a periferia das vênulas, a expressão das selectinas nos leucócitos (L-selectinas) e nas células endoteliais (P e E-selectinas) possibilita a interação entre essas células, processo denominado rolamento. Durante este processo, os neutrófilos podem ser ativados por diferentes vias de sinalização, incluindo os agentes quimioatraentes, por exemplo, as quimiocinas. A ativação de receptores com sete domínios transmembrânicos acoplados à proteína G (GPCRs), presentes nos neutrófilos, pelas quimiocinas resulta na ativação das integrinas, moléculas de adesão presentes nos leucócitos e quando ativadas, interagem com membros de imunoglobulinas, presentes na membrana celular de células endoteliais (*ICAM - intracellular adhesion molecule* e *VCAM – vascular cell adhesion molecule*), possibilitando a firme adesão dos neutrófilos ao endotélio. Após aderidos, os neutrófilos respondem ao gradiente quimiotático e completam o processo de transmigração (Alves-Filho *et al.*, 2008). Uma vez presentes no foco inflamatório, os neutrófilos fagocitam e liberam os grânulos contendo enzimas líticas e polipeptídios antimicrobianos (Segal, 2005).

A importância dos neutrófilos durante um processo infeccioso é claramente ilustrada por patologias ou tratamentos em que o número de neutrófilos está drasticamente reduzido. Um exemplo são os pacientes em tratamento

quimioterápico, os quais apresentam infecções bacterianas e fúngicas em decorrência da neutropenia (Faurischou *et al.*, 2003). Além disso, animais que tiveram seus neutrófilos depletados se mostraram mais susceptíveis à infecção bacteriana causada por *S. aureus*, exibindo altos níveis séricos de citocinas, sinais graves de infecção e aumento do índice de mortalidade, sugerindo que a destruição dos patógenos pelos neutrófilos é uma etapa crítica durante uma infecção (Verdrengh *et al.*, 1997).

Entretanto, durante a sepse, a migração de neutrófilos para o foco infeccioso parece variar de acordo com a gravidade da síndrome, associando-se, consequentemente, à taxa de mortalidade. Nosso grupo de pesquisa tem demonstrado que após a indução da sepse por um estímulo não grave, ocorre uma eficiente migração destas células para o foco, com consequente *clearance* bacteriano e sobrevida dos animais. Entretanto, quando os animais são submetidos a um estímulo séptico grave, os neutrófilos não conseguem chegar até o foco infeccioso, resultando em disseminação bacteriana e morte (Benjamim *et al.*, 2000; Crosara-Alberto *et al.*, 2002; Alves-Filho *et al.*, 2005; Rios-Santos *et al.*, 2007; Alves-Filho *et al.*, 2008). Além disso, pacientes com sepse grave possuem redução da resposta quimiotática dos neutrófilos, sendo que esta redução é mais pronunciada nos pacientes que não sobrevivem à sepse (Tavares-Murta, 2002).

Apesar dos mecanismos envolvidos na falência da migração de neutrófilos durante a sepse não estarem completamente elucidados, vários trabalhos demonstram que a alta concentração sistêmica de citocinas, como TNF- α , IL-6, IL-1 β e IL-8, bem como de outros mediadores, como proteínas de fase aguda, mediadores gasosos, espécies reativas de oxigênio, entre outros, pode levar à redução da

migração de neutrófilos para o foco infeccioso, pela redução da interação entre os neutrófilos e o endotélio (Tavares-Murta *et al.*, 1998; Benjamim *et al.*, 2000; Benjamim *et al.*, 2002; Alves-Filho *et al.*, 2005; Alves-Filho *et al.*, 2008). Além destes mecanismos, a ativação direta dos TLR promove redução na expressão de receptores quimiotáticos CXCR2 em neutrófilos, contribuindo para a inibição da migração de neutrófilos para o foco infeccioso durante a sepse (Alves-Filho *et al.*, 2009; Alves-Filho *et al.*, 2010).

Embora os neutrófilos sejam cruciais no combate às infecções como discutido acima, estas células podem ter um papel nocivo durante a sepse. Uma disfunção grave presente a muitos pacientes com sepse severa e talvez da maioria dos pacientes com choque séptico é a síndrome da disfunção de múltiplos órgãos e sistemas (DMOS). Dados da literatura têm sugerido que o infiltrado de neutrófilos em órgãos distantes do foco infeccioso, como pulmão ou fígado, pode participar da disfunção de múltiplos órgãos (Hewett *et al.*, 1992; Jaeschke *et al.*, 1996; Hierholzer *et al.* 1998; Matesic *et al.*, 2000). Além disso, vários trabalhos do nosso laboratório têm demonstrado que paralelamente à falência de migração de neutrófilos para o foco infeccioso, ocorre um aumento no infiltrado neutrofílico em órgãos distantes do local da infecção, como pulmão, coração, rim e fígado (Alves-filho *et al.*, 2008; Asaduzzaman *et al.*, 2008; Ozturk *et al.*, 2008; Elphick *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2009; Souto *et al.*, 2010). Dessa forma, estas células apresentam também um papel deletério quando presentes em órgãos distantes do foco infeccioso, conduzindo para lesão tecidual e perda da função orgânica (Asaduzzaman *et al.*, 2008; Ozturk *et al.*, 2008; Elphick *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2009).

1.3. Quimiocinas e seus receptores durante a sepse

As quimiocinas são importantes mediadores envolvidos na migração e ativação de leucócitos (Gale & McColl, 1999). Elas são compostas de 70 a 125 aminoácidos, com massa molecular de 6 a 14 kDa (Kim & Broxmeyer, 1999) e são divididas em quatro subfamílias, baseadas na posição de um ou dois resíduos de cisteínas, localizados próximos da região N-terminal da proteína:

α ou CXC - Os dois primeiros resíduos de cisteína se encontram separados por um aminoácido. Inclui-se neste grupo a IL-8 (CXCL8), o PF4 (fator plaquetário 4) (CXCL4), o NAP-2 (CXCL7), os GRO α (CXCL1), β (CXCL2) e γ (CXCL3), o ENA-78 (CXCL5), a IP-10 (CXCL10), dentre pelo menos mais outras 8 descritas. Em camundongos, apesar de não estar bem definido, as quimiocinas KC e MIP-2 corresponderiam aos CXCL1 e CXCL2 humanos, não havendo, como equivocadamente pensado, um correspondente para CXCL8 humano;

β ou CC - Possui os dois primeiros resíduos colocados um adjacente ao outro e é representado pela proteína inibitória de macrófagos (MIP)-1 α (CCL3) e β (CCL4), a proteína quimiotática para monócitos (MCP)-1 (CCL2), 2 (CCL8), 3 (CCL7), o RANTES (“Regulated upon Activation Normal T cell Expressed and Secreted”) (CCL5), a eotaxina (CCL11), formando uma família acima de 28 quimiocinas;

γ ou C - Representadas pela linfotactina (XCL1) e SCM-1 β (XCL2), este grupo apresenta apenas dois dos quatro resíduos de cisteína;

δ ou CX3C – Apenas com a fractalcina (CX3CL1), essa quimiocina atípica, apresenta na sua estrutura três aminoácidos separando seus dois primeiros resíduos de cisteína.

As quimiocinas atuam em receptores de sete alças transmembrânicas acoplados à proteína G (GPCR). Até o presente momento, foram identificados 7 receptores CXCR (1-7), 10 CCR (1-10), 1 CR e 1 CX3CR (Hartl *et al.*, 2008). Os receptores da família CCR são basicamente expressos em linfócitos, macrófagos e monócitos. Já os receptores da família CXCR e CX3CR são expressos, predominantemente, em neutrófilos, os quais respondem, portanto, às quimiocinas CXC e CX3C (Olson & Ley, 2002).

Dada a importância do processo de migração celular durante condições fisiopatológicas, entre elas a sepse, vários grupos de pesquisa, incluindo o nosso, vêm avaliando o papel das quimiocinas e seus receptores na evolução da sepse. O receptor CXCR2 é o principal receptor quimiotático para os neutrófilos e interage com as quimiocinas CXCL2/MIP-2, CXCL1/KC (murino) e CXCL8 (humanos). A migração de neutrófilos para o foco infeccioso durante a sepse não grave é dependente do CXCR2. Entretanto, o nosso grupo demonstrou recentemente que durante uma sepse grave ocorre internalização do CXCR2 em neutrófilos e esta internalização é responsável pela falência da migração de neutrófilos para o foco infeccioso (Rios-Santos *et al.*, 2007; Alves-Filho *et al.*, 2008; Alves-Filho *et al.*, 2009; Alves-Filho *et al.*, 2010; Spiller *et al.*, 2010).

Normalmente, os neutrófilos não expressam os receptores da família CCR. Entretanto, trabalhos da literatura vêm demonstrando que em determinadas condições inflamatórias os neutrófilos passam a expressar diferentes receptores e a responder a diferentes quimiocinas que são funcionalmente inativas para essas células em condições normais (Solomkin *et al.*, 1994; Johnston *et al.*, 1999; Bless *et al.*, 2000).

Um dos exemplos de aumento de expressão de receptores da família CCR em neutrófilos ocorre com o receptor CCR2. Foi demonstrado que o aumento da expressão de CCR2 em neutrófilos durante a sepse tem importante papel na migração de neutrófilos para órgãos distantes. Souto e colaboradores (2010) observaram que animais deficientes para CCR2 e submetidos à CLP apresentam uma menor mortalidade em relação aos animais falso-operados, devido à redução do infiltrado neutrofílico nos pulmões, rins e coração, com menor disfunção nestes órgãos, mesmo não havendo resolução na falência de migração de neutrófilos para o foco infeccioso.

Além disso, neutrófilos circulantes de animais sépticos também têm aumento na expressão do RNA mensageiro para CCR5 em relação aos animais sham, e esses neutrófilos respondem à quimiocina MIP-1 α (Speyer *et al.*, 2004). Ainda, o papel da quimiocina MIP-1 α foi avaliado durante a sepse. MIP-1 α pode ser produzida por vários tipos celulares, incluindo linfócitos, monócitos/macrófagos, mastócitos, basófilos, células epiteliais e fibroblastos, e exerce seu efeito biológico através dos receptores CCR1 e CCR5. Em modelo de sepse induzida por CLP, animais deficientes para MIP-1 α apresentaram maior mortalidade que animais selvagens (Takahashi *et al.*, 2002). No entanto, como MIP-1 α pode se ligar à CCR1 e à CCR5 o papel do receptor CCR5 em neutrófilos durante a sepse é ainda desconhecido.

1.3.1 CCR5

O receptor CCR5 é um receptor quimiotático da família CC e consiste de 352 resíduos de aminoácidos. Este receptor possui vários ligantes naturais, incluindo MIP-1 α (CCL3), MIP-1 β (CCL4) e RANTES (CCL5), sendo que MIP-1 α e RANTES podem se ligar a outros receptores da família CC, enquanto MIP-1 β é conhecido por ser o mais específico para CCR5 (Choi & An, 2011). Esses ligantes estão presentes em grandes quantidades em tecidos inflamados, como no líquido sinovial em pacientes com artrite inflamatória (Loetscher *et al.*, 1998; Wang & Liu, 2003), no sistema nervoso central de camundongos com encefalomielite autoimune (Bagaeva *et al.*, 2003), no pulmão de pacientes com Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC) (Fuke, *et al.*, 2004) e no pâncreas de animais com pancreatite aguda (Moreno *et al.*, 2006).

O CCR5 é basicamente expresso em linfócitos, monócitos e macrófagos. Vários trabalhos mostram a sua importância durante a infecção do vírus da imunodeficiência humana (VIH). Nesta doença, este receptor funciona como correceptor para a entrada do vírus nas células T, sendo que indivíduos deficientes para CCR5 são resistentes à infecção por VIH (Oppermann, 2004).

Trabalhos da literatura demonstram importante papel do CCR5 durante diferentes modelos de doenças. Recentemente, Moreira e colaboradores (2008) demonstraram que camundongos deficientes para CCR5 (CCR5^{-/-}) conseguem controlar o crescimento e a disseminação de leveduras *P. brasiliensis*, quando comparados aos camundongos selvagens (WT), sugerindo que CCR5 modula a migração e a função supressora de células T reguladoras (Treg). Além disso,

animais CCR5^{-/-} também são capazes de controlar a infecção por algumas bactérias como *Mycobacterium tuberculosis* (Algood & Flynn, 2004) e *Listeria monocytogenes* (Zhong *et al.*, 2004), ou ainda o desenvolvimento de tumores (Ng-Cashin *et al.*, 2003), sugerindo que sua ausência poderia limitar a migração das Treg em diferentes patologias. Por outro lado, outros trabalhos demonstraram que animais CCR5^{-/-} são mais susceptíveis à infecção com *T. gondii* (Aliberti *et al.*, 2000), apresentando maior carga parasitária quando comparados aos camundongos WT.

Entretanto, Ariel e colaboradores (2006) mostraram um diferente papel para o receptor CCR5. Neste trabalho, foi demonstrado que o CCR5 está envolvido com o processo de resolução da inflamação por diminuir os níveis das quimiocinas MIP-1 α e RANTES presentes no local da inflamação em modelo de peritonite induzida por zimosan. Assim, animais deficientes para CCR5 apresentaram uma maior quantidade das quimiocinas MIP-1 α e RANTES na cavidade peritoneal, quando comparados aos animais WT. Nesse mesmo contexto, Doodes e colaboradores (2009) demonstraram que, em modelo de artrite induzida por proteoglicano, o aumento da severidade da doença em animais CCR5^{-/-} foi correlacionando com elevados níveis de RANTES no soro desses animais.

Recentemente, foi demonstrado que durante certas patologias, o CCR5 passa a ser expresso em neutrófilos. Hartl e colaboradores (2008) demonstraram que durante DPOC e artrite reumatóide, neutrófilos do lavado broncoalveolar e do fluido sinovial passam a expressar CCR5 e a responder à quimiocina MIP-1 β , respectivamente. Entretanto, Ariel e colaboradores (2006) demonstraram que a expressão de CCR5 em neutrófilos está diretamente relacionada com a apoptose dessas células, sendo que neutrófilos apoptóticos apresentam uma maior expressão

de CCR5, mas não respondem à quimiocina MIP-1 β . Ainda, foi demonstrado que a incubação de neutrófilos com ligantes de TLR2 e NOD2 leva ao aumento da expressão de CCR5 em neutrófilos (Hartl *et al.*, 2008).

No entanto, não existem trabalhos demonstrando o papel do receptor CCR5 durante a evolução da sepse. Como descrito anteriormente, durante a sepse induzida por CLP, neutrófilos de animais sépticos têm aumento na expressão do RNA mensageiro para CCR5 (Speyer *et al.*, 2004). Como a migração de neutrófilos é importante para o controle da infecção durante a sepse e sabendo da importância dos receptores quimiotáticos nesse processo, decidimos investigar o papel deste receptor com a finalidade de melhor compreender os mecanismos envolvidos na fisiopatologia da sepse, uma vez que nesse processo novos alvos terapêuticos podem ser revelados.

Objetivos

2 Objetivos

2.1 Objetivo geral

- Investigar o papel do receptor de quimiocina CCR5 na fisiopatologia da sepse.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a cinética da expressão do receptor CCR5 em neutrófilos murinos após indução da sepse pelo modelo de CLP;
- Investigar o mecanismo envolvido no aumento de expressão do CCR5 nos neutrófilos durante a sepse;
- Avaliar a importância do CCR5 na sepse experimental induzida pelo modelo de CLP.

Material e métodos

3 Material e métodos

3.1 Camundongos

No presente estudo foram utilizados camundongos isogênicos da linhagem C57BL/6 (selvagens – *wild type*, WT), camundongos deficientes de CCR5 (CCR5^{-/-}) e camundongos deficientes de MIP-1α (MIP-1α^{-/-}), machos ou fêmeas de 5 a 8 semanas de idade. O número de animais utilizados por grupo foi igual a 5 ou aquele indicado nas legendas. Esses animais foram provenientes do Biotério Central e do Biotério de Camundongos Isogênicos do Departamento de Genética da FMRP-USP. Antes dos experimentos, os camundongos foram acondicionados em caixas de polipropileno com tampa em aço galvanizado, no biotério do Departamento de Farmacologia da FMRP-USP, mantidos em condições ideais, ciclo de claro/escuro de 12 h, temperatura controlada (23-25 °C) com livre acesso à ração e água *ad libitum*.

3.2 Purificação dos polimorfonucleares (PMNs) da medula óssea (M.O.)

A purificação dos neutrófilos da M.O. foi realizada através da centrifugação em gradiente de Percoll. Resumidamente, células totais da medula óssea foram obtidas do fêmur e tíbia de camundongos, com base na metodologia descrita por Pinho (Pinho *et al.*, 2007). Em seguida, as células foram lavadas 2 vezes e ressuspensas em 2 ml de HBSS para cada animal. A suspensão obtida foi transferida para um tubo falcon contendo um gradiente de Percoll, nas mesmas diluições e procedimentos utilizados para a separação dos neutrófilos do sangue

total. As células foram quantificadas em câmara de Neubauer ou com o auxílio de um contador automático de células (Coulter Ac.T) e a pureza avaliada pela contagem diferencial, realizada a partir de esfregaços preparados com o auxílio de uma citocentrífuga (Cytospin 3; Shandon ®).

3.3 Ensaio de quimiotaxia

Em uma câmara de quimiotaxia (câmara de Boyden; 48 poços; Neuro Probe, Inc., Cabin John, MD–USA), primeiramente no compartimento inferior, foi adicionado 28,6µL dos estímulos quimiotáticos, a quimiocina MIP-2 (30 ng/ml, PeproTech Inc., Rocky Hill, NJ, EUA) ou a quimiocina MIP-1β (1 ng/ml, PeproTech Inc., Rocky Hill, NJ, EUA), e como controle negativo da migração foi utilizado o RPMI/BSA 0,1%. Sobre o compartimento inferior foi colocado uma membrana de polycarbonato (5µm; Poretics Membranes; Osmonics, Laboratory & Specialty Products Group; Livermore, CA-USA). Sobre essa membrana foi colocada uma membrana de polietileno, onde a parte superior da câmara foi encaixada e 50µL da suspensão de neutrófilos (1×10^6 /ml) foi adicionado. Após 1 hora de incubação a 37°C a membrana de polycarbonato foi retirada, passada em solução fisiológica, corada com o kit de coloração Diff-Quik (Baxter Scientific Products; Baxter Health Corporation, McGaw Park, IL – USA) e fixada em lâmina. Os neutrófilos foram contados em microscópio óptico, cinco campos (1000X) em cada poço. Cada experimento foi realizado em triplicata.

3.4 Expressão de CCR5 por citometria de fluxo

A análise de citometria de fluxo foi realizada com neutrófilos purificados da medula óssea de camundongos, com sangue total dos camundongos e com células do lavado peritoneal. Os neutrófilos purificados ou células totais foram ressuspensos à $0,5 \times 10^6$ células/100 μ L em tampão de FACS (PBS 1x, 20 mM de Glicose e 0,5% de BSA). As amostras foram incubadas com 10 μ L de soro de coelho durante 40 minutos, à 4 °C. Em seguida, foram adicionados às amostras os anticorpos monoclonais anti-GR1 conjugado com Percp (1:200; BD Biosciences) e anti-CCR5 conjugado com PE (1:50; R&D Systems), sendo incubadas por 30 minutos a 4° C. Posteriormente, as células foram lavadas com 2 ml do tampão de FACS e ressuspensas em 200 μ L de PBS-Formol a 1%. A fluorescência foi analisada no aparelho FACSort (Becton Dickinson, San Jose, CA – USA) utilizando o programa Lysis II ou WinMDI 2.8.

3.5 Modelo experimental de sepse polimicrobiana

Foi utilizado como modelo de sepse polimicrobiana, o modelo de ligação e perfuração do ceco (CLP) originalmente descrito por Baker (Baker *et al.*, 1983), com algumas modificações. Resumidamente, os camundongos foram anestesiados com injeção i.p. de tribromoetanol 2,5 % (10 μ L/g), sendo em seguida realizada uma incisão de 1cm no abdômen e o ceco exposto e ligado logo abaixo da válvula ileocecal, sem obstrução total. Após a ligadura, o ceco foi perfurado de acordo com o grau de gravidade desejado:

- 1- Sham (ou falso operado) - os animais sham-operados (controles) foram submetidos ao mesmo procedimento, porém sem as perfurações.
- 2- Sepses moderada (CLP) - foram realizadas sete perfurações com agulha 26G.
- 3- Sepses sub-letal (CLP) – foram realizadas três perfurações com agulha 26G.

Em seguida, o ceco foi pressionado gentilmente para certificar a saída das fezes pelas perfurações e colocado de volta no abdômen, sendo a incisão suturada. Uma injeção subcutânea de 1 ml de solução salina foi administrada nos camundongos a fim de hidratar os animais até a volta da anestesia. A mortalidade dos animais foi avaliada durante o período de 12 dias após a indução da sepsis. Para avaliação da migração celular e de outros parâmetros, os animais foram sacrificados após 6 e 24 horas da CLP.

3.6 Migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal

A migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal foi determinada 6 e 24 horas após a indução da sepsis. Os animais foram sacrificados, a pele do abdômen aberta com uma incisão mediana sem lesar a musculatura e a cavidade peritoneal foi lavada com 1,5 ml de tampão PBS contendo EDTA (1 mM). A partir do lavado peritoneal foram feitas as contagens totais e diferenciais das células.

3.7 Contagem total de leucócitos

A contagem total foi realizada com auxílio de contador automático de células (Coulter Ac.T) e expressa como número de células x 10^6 / ml.

3.8 Contagem diferencial de leucócitos

A contagem diferencial foi realizada a partir de esfregaços preparados com o auxílio de uma citocentrífuga (Cytospin 3; Shandon ®). Quarenta microlitros do lavado peritoneal foram fixados em lâminas e corados pelo método de May-Grünwald Giemsa. As células foram examinadas em microscópio óptico através da objetiva de imersão em óleo (aumento de 1000 vezes), sendo contadas 100 células por lâmina, diferenciando-se dois tipos celulares: neutrófilos e mononucleares. A quantificação de cada tipo celular presente na cavidade peritoneal foi calculada pela percentagem dessas células contadas nos esfregaços e pela quantidade de células totais obtida na contagem total. Os resultados estão expressos como número de neutrófilos x 10^6 /cavidade.

3.9 Quantificação de bactérias

A quantificação do número de bactérias no lavado peritoneal e sangue foi realizada 6 e 24 horas após a indução da sepse. Os animais WT e CCR5^{-/-} foram sacrificados, em seguida foi coletado o lavado peritoneal e sangue. O lavado peritoneal foi diluído (1:100; 1:1000; 1:10.000) em PBS estéril, enquanto o sangue

foi utilizado puro ou diluído em PBS estéril (1:10) e 10 µL dessas soluções semeados em placas de Petri contendo meio Agar Mueller Hinton (Difco Laboratories). Todo o procedimento foi realizado sob condições estéreis. Após a semeadura, as placas foram incubadas por 18 horas a 37°C e o número de unidades formadoras de colônias (CFU) foi quantificado. Os resultados estão expressos como Log de CFU/ml.

3.10 Determinação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO)

A quantificação do acúmulo de neutrófilos no pulmão e coração dos animais submetidos à sepse foi determinada pelo ensaio da atividade da mieloperoxidase no homogeneizado do pulmão e coração, obtidos 6 e 24 horas após indução da sepse (Alves-filho *et al.*, 2006). Para tanto, após perfusão com salina, o pulmão e coração de cada animal foi coletado, colocado em 200µL de tampão gelado, em pH 4,7 (NaCl 0,1 M, NaPO₄ 0,02 M, NaEDTA 0,012 M) e posteriormente homogeneizados com o auxílio de um triturador (Pollytron). O material homogeneizado foi em seguida centrifugado a 3.000 rpm por 15 minutos a 4°C. Foi realizado então um choque hipotônico no sedimento celular (*pellet*) com 1000 µl de NaCl 0,2%. Depois de nova centrifugação a 3000 rpm por 15 minutos a 4°C, o "*pellet*" foi ressuspenso em tampão NaPO₄ (pH 5,4) contendo 0,5% de brometo de hexadeciltrimetilamonio (HTAB) e novamente homogeneizado. A seguir esse homogeneizado foi centrifugado a 13.000 rpm por 15 minutos a 4°C. Após centrifugação, 3 e 50 µL do sobrenadante do pulmão e coração, respectivamente, foram colocados em placa de 96 poços para o ensaio. Em cada poço foram adicionadas 25 µL de TMB (3, 3', 3, 3'-

tetramethylbenzidine; 1,6 mM final na placa). Logo após, 100 µL de H₂O₂ (0,5 mM final na placa) foram adicionados nos poços e a placa foi incubada por 5 min a 37 °C. A seguir a reação foi interrompida com ácido sulfúrico 4 M. A quantificação dos neutrófilos foi feita a partir de uma curva padrão de neutrófilos (obtidos da cavidade peritoneal 6 horas após camundongos serem injetados com carragenina e diluídos seriadamente em NaPO₄ 0,08 M (1 x 10⁵ neutrófilos/ poço/ 50 µL). Foi determinada a absorbância em leitor de ELISA (Spectra Max 250; Molecular Devices) no comprimento de onda de 450 nm. Os resultados estão expressos como número de neutrófilos por 100 mg de tecido.

3.11 Quantificação de quimiocinas no lavado peritoneal e no soro

A quantificação de MIP-1α, MIP-2 e KC no lavado peritoneal e soro foi realizada 24 horas após a indução de sepse. As dosagens de quimiocinas no sobrenadante do lavado peritoneal e no soro foram realizadas através de método imunoenzimático (ELISA). Placas de 96 poços foram cobertas com 50 µL/poço do anticorpo específico anti-MIP-1α (2 µg/mL), anti-KC (2 µg/mL) e anti-MIP-2 (1 µg/mL) (Pharmigen, San Diego, CA, USA). Estes anticorpos foram diluídos em solução de ligação (binding buffer) pH 9,0 e incubados por 18-24 horas a 4°C. As placas foram lavadas por três vezes com PBS/Tween-20 (0,05% Sigma). As ligações não específicas foram bloqueadas com 100 µL de PBS/BSA 1% por 120 minutos em temperatura ambiente. As amostras e o padrão (curva padrão) contendo as concentrações para MIP-1α (2000 pg/mL), KC (4000 pg/mL) e MIP-2 (4000 pg/mL) (Pharmigen) foram colocados nas placas (50 µL) e incubados por 18-24 horas à 4°C.

Após esse período, as placas foram lavadas com PBS/Tween e 50 µL dos anticorpos biotinilados específicos para cada quimiocina foram adicionados nas concentrações: MIP-1α (1:1000), KC (0,2 µg/mL) e MIP-2 (0,2 µg/mL). Após uma hora, as placas foram lavadas com PBS/Tween e o conjugado avidinaperoxidase, na diluição de 1/5000 adicionado a cada poço e as placas incubadas por 30 min. As placas foram lavadas com PBS/Tween e 100 µL do substrato OPD (o-fenilenediaminadihidrocloreto; Sigma) em tampão substrato (pH 5,0) foram adicionados. As placas então foram incubadas por 15 a 20 min em temperatura ambiente. A reação foi interrompida com 50 µL de H₂SO₄ (1 M) e a densidade óptica medida a 490 nm em espectrofotômetro (Spectra Max-250, Molecular Devices). Os resultados foram expressos em pg/mL.

3.12 Determinação da atividade da enzima creatinina quinase-MB (CK-MB) e da concentração de uréia no soro

Amostras de sangue foram coletadas 6 e 24 após a CLP. As dosagens das enzimas creatinina quinase-MB (CK-MB), marcador de lesão cardíaca, e da uréia, marcador de lesão renal, foram determinadas no soro dos animais através do uso de Kits analítico (Labtest) e as absorbâncias foram determinadas em leitor de ELISA, no comprimento de onda de 340 nm para CK-MB e 600 nm para uréia.

3.13 Microscopia Intravital

A microscopia intravital foi realizada 4 horas após a indução da sepse, em animais selvagens e deficientes para CCR5. Os animais foram anestesiados com injeção i.p. de tribromoetanol 2,5 % (10 µl/g) e por meio de uma laparotomia o mesentério foi exposto para avaliação in situ da microcirculação. Os animais foram mantidos sobre uma placa aquecida a 37 °C, dotada de área transparente, sobre a qual o tecido foi fixado. A preparação foi mantida úmida e aquecida por irrigação com salina estéril à 37 °C. A placa aquecida foi mantida sobre o *charriot* de um microscópio óptico triocular, ao qual estavam acoplados um fototubo, com sistema de lentes ampliadoras superpostas, uma câmera e um monitor de vídeo que permitiu a projeção e gravação das imagens. O aumento final foi de 3400 vezes. Os vasos selecionados para o estudo foram vênulas pós-capilares com diâmetro variando entre 10 e 16 µm. A adesão foi avaliada em uma extensão de 100 µm² de vênula, definida na tela do monitor, onde 10 µm no tecido correspondem a 3,4 cm na tela. O número de células aderidas foi avaliado utilizando-se imagens visualizadas no vídeo. Após a contagem do número de células aderidas em uma dada seção do leito vascular, foi adicionada a quimiocina MIP-1β sobre essa mesma seção e, após 5 minutos, o número de células aderidas foi contado novamente. O resultado foi estimado pela média de todos os animais, sendo expresso como número de leucócitos aderidos a cada 100 µm², antes e após a adição de MIP-1β.

3.14 Protocolos experimentais:

Após a purificação dos neutrófilos da medula óssea dos camundongos, foram realizados alguns protocolos experimentais:

3.14.1 Expressão dos receptores CCR5 e CXCR2 nos neutrófilos WT e CCR5^{-/-}: neutrófilos purificados da medula óssea, 10⁶ neutrófilos por ml, dos animais WT e CCR5^{-/-}, foram estimulados com LPS durante 1 ou 3 horas em estufa úmida a 37°C e 5% de CO₂, seguido do ensaio de citometria de fluxo para marcação dos receptores CCR5 e CXCR2.

3.14.2 Quimiotaxia dos neutrófilos WT: neutrófilos purificados da medula óssea, 10⁶ neutrófilos por ml, dos animais WT foram incubados com o agonista do receptor TLR4, lipopolissacarídeo (LPS, de *Escherichia. coli*, B4, Sigma, 50µg/ml) durante 2 horas em estufa úmida a 37°C e 5% de CO₂, seguido da migração *in vitro*, quimiotaxia, para as quimiocinas MIP-2 e MIP1-β.

Após indução da sepse, pelo modelo de ligação e perfuração do ceco (CLP) foram realizados alguns protocolos experimentais:

3.14.3 Indução da CLP para avaliação da expressão dos receptores CCR5 e CXCR2 em neutrófilos circulantes e da cavidade peritoneal: Camundongos WT foram submetidos ao modelo de CLP. O sangue e o lavado peritoneal dos animais foram coletados 3, 6, 12, 24 e 48 horas após a CLP e a expressão de CCR5 e CXCR2 foi avaliada por citometria de fluxo.

3.14.4 Indução da CLP, sobrevida dos animais WT, CCR5^{-/-} e MIP1- α ^{-/-}:

Camundongos WT, CCR5^{-/-} e MIP1- α ^{-/-} foram submetidos ao modelo de CLP e a sobrevida desses animais foi analisada durante 12 dias.

3.14.5 Indução da CLP para avaliação de MPO nos tecidos, migração de leucócitos para a cavidade peritoneal, dosagens de quimiocinas, quantificação de bactérias e dosagens de marcadores de lesão tecidual: Camundongos WT e CCR5^{-/-} foram submetidos ao modelo de CLP, após 6 e 24 horas o sangue desses animais foi retirado para obtenção do soro para dosagem de quimiocinas, de marcadores de lesão tecidual e para quantificação de bactérias na circulação. Os órgãos, como pulmão e coração, foram retirados para avaliar indiretamente o seqüestro de neutrófilos para esses órgãos, pela dosagem da mieloperoxidase (MPO). Foi realizado o lavado peritoneal desses animais e contagem total e diferencial dos leucócitos, além de dosagem de quimiocinas e quantificação das bactérias para o foco da infecção.

3.14.6 Indução da CLP para avaliação da adesão de leucócitos por microscopia intravital: Camundongos WT e CCR5^{-/-} foram submetidos ao modelo de CLP, após 4 horas os animais foram anestesiados para avaliação da adesão leucocitária nas vênulas mesentéricas por microscopia intravital.

3.15 Análises estatísticas

A sobrevida dos animais foi expressa em porcentagem de animais sobreviventes e o teste 2x utilizado para determinar as diferenças entre as curvas de sobrevivência. Os demais resultados foram analisados por Análise de Variância

(ANOVA), seguida pelo teste de Bonferroni para determinação da significância entre os grupos. Os resultados foram expressos como média $\pm$ E.P.M. e as diferenças foram consideradas estatisticamente diferentes para $P < 0,05$.

Resultados

4 Resultados

4.1 Expressão do receptor quimiotático CCR5 em neutrófilos circulantes durante a sepse

O receptor quimiotático CCR5 não é expresso em neutrófilos em condições fisiológicas. Porém, alguns trabalhos vêm demonstrando que, em certas condições patológicas ou experimentais, os neutrófilos passam a expressar este receptor (Solomkin *et al.*, 1994). Com o intuito de verificar a importância do CCR5 em neutrófilos durante a sepse, inicialmente analisamos sua expressão em neutrófilos circulantes após CLP.

Para avaliar a cinética de expressão do CCR5 em neutrófilos circulantes, foi realizada uma curva tempo-resposta. Após 3, 6, 12, 24 e 48 horas da CLP, o sangue dos animais foi coletado e as células marcadas com os anticorpos anti-Gr1 (para identificação da população dos neutrófilos) e anti-CCR5 para posterior análise por citometria de fluxo. Como observado nas análises apresentadas nas **Figuras 1A-F**, verificamos que neutrófilos de animais falso-operados (Sham) não apresentam expressão detectável de CCR5 (**Figura 1A**). Entretanto, observamos que ocorre aumento da expressão do CCR5 em neutrófilos após a CLP, de maneira dependente do tempo, com pico de expressão 24 horas após a CLP (**Figuras 1E e 1G**), sendo que após 48 horas a expressão de CCR5 é reduzida (**Figuras 1F e 1G**).

A especificidade da marcação para CCR5 foi confirmada em neutrófilos de animais deficientes para esse receptor (CCR5^{-/-}), os quais, ao contrário de animais “wild type” (WT), não apresentaram expressão desse receptor após a CLP (**Figuras 2A-B**).

Figura 1: Expressão do receptor quimiotático CCR5 em neutrófilos circulantes após a CLP. (A-F) Análise por citometria de fluxo da expressão de CCR5 em neutrófilos circulantes de animais C57BL/6. (A) Expressão de CCR5 em neutrófilos circulantes de animais falso-operados (Sham). (B-F) Expressão de CCR5 em neutrófilos circulantes, 3 (B), 6 (C), 12 (D), 24 (E) e 48 (F) horas após a CLP. (G) Gráfico representativo da porcentagem de neutrófilos expressando CCR5 em diferentes momentos após a CLP. Os resultados são representativos de dois experimentos realizados com três animais por grupo e estão expressos como média $\pm$ E.P.M. * $P < 0,05$ versus sham (ANOVA seguido de Bonferroni).

Figura 2: Expressão do CCR5 em neutrófilos circulantes de animais deficientes para CCR5. (A-B) Análise por citometria de fluxo da expressão de CCR5 em neutrófilos do sangue de animais CCR5^{-/-}. (A) Expressão de CCR5 em neutrófilos circulantes de animais falso-operados (Sham). (B) Expressão de CCR5 em neutrófilos circulantes 12 horas após a CLP.

4.2. Expressão dos receptores quimiotáticos CXCR2 e CCR5 em neutrófilos circulantes durante a sepse

Vários trabalhos do nosso laboratório têm demonstrado que durante a sepse ocorre internalização do receptor quimiotático CXCR2 em neutrófilos circulantes, e que esta internalização está diretamente relacionada com a falência da migração de neutrófilos para o foco infeccioso (Rios-Santos *et al.*, 2007). No presente trabalho, como demonstrado na **Figura 1**, observamos aumento da expressão do receptor CCR5 em neutrófilos circulantes após a CLP. Desse modo, avaliamos simultaneamente a internalização do receptor CXCR2 e a expressão de CCR5 na superfície celular dos neutrófilos durante a sepse, investigando se ambos os eventos ocorrem paralelamente.

Inicialmente foi realizada uma curva tempo-resposta para avaliar a cinética da internalização do receptor CXCR2 no modelo de CLP moderada. Após 12, 24 e 48 horas da CLP, o sangue dos animais foi coletado e as células marcadas com os anticorpos anti-Gr1 e anti-CXCR2 para posterior análise de citometria de fluxo. Nas análises apresentadas nas **Figuras 3A-D**, verificamos uma diminuição da expressão de CXCR2 em neutrófilos circulantes após 12 (**Figura 3B**) e 24 horas (**Figura 3C**) da CLP em relação aos animais sham. Interessantemente, observamos que o receptor CXCR2 é novamente expresso e em altos níveis na superfície dos neutrófilos no mesmo tempo em que o CCR5 teve sua expressão reduzida, 48 horas após a CLP (**Figuras 1F e 1G, 3D e 3E**).

Posteriormente, a expressão de ambos CXCR2 e CCR5 foi avaliada em neutrófilos circulantes de animais WT e animais deficientes para CCR5. Após 12

horas da CLP, momento em que o receptor CXCR2 está internalizado e CCR5 está expresso nos neutrófilos, o sangue dos animais foi coletado e incubado com os anticorpos anti-GR1, anti-CXCR2 e anti-CCR5, para posterior análise de citometria de fluxo. Como observado anteriormente, nos neutrófilos dos animais WT, simultaneamente à internalização do receptor CXCR2, ocorre o aparecimento do CCR5, após a CLP (**Figura 4A-B**). No entanto, como esperado, nos neutrófilos dos animais CCR5^{-/-} não observamos o aparecimento da expressão do CCR5, embora tenhamos observado a internalização do CXCR2 (**Figura 4C-E**).

Desse modo, podemos concluir que os eventos de internalização do CXCR2 e a expressão de do CCR5 ocorrem simultaneamente nos neutrófilos durante a progressão da sepse.

Figura 3: Expressão do CXCR2 em neutrófilos circulantes após a CLP. (A-D) Análise por citometria de fluxo da expressão do receptor CXCR2 em neutrófilos do sangue de animais. (A) Expressão do receptor CXCR2 em neutrófilos circulantes de animais falso-operados (Sham). (B-D) Expressão do receptor CXCR2 em neutrófilos circulantes, 12 (B), 24 (C) e 48 (D) horas após a CLP. (E) Gráfico representativo da porcentagem de neutrófilos expressando CXCR2 em diferentes tempos após a CLP. Os resultados são representativos de dois experimentos realizados com três animais por grupo e estão expressos como média $\pm$ E.P.M. * $P < 0,05$ versus sham (ANOVA seguido de Bonferroni).

Figura 4: Expressão do CCR5 e do CXCR2 em neutrófilos circulantes após a CLP. Análise por citometria de fluxo da expressão dos receptores CCR5 e CXCR2 em neutrófilos do sangue de animais WT (A-B) e CCR5^{-/-} (C-D). (A e C) Expressão dos receptores CCR5 e CXCR2 em neutrófilos circulantes de animais falso-operados (Sham). (B e D) Expressão dos receptores CCR5 e CXCR2 em neutrófilos circulantes, 12 horas após a CLP. (E) Gráfico representativo da porcentagem de neutrófilos expressando CCR5 e CXCR2. Os resultados são representativos de dois experimentos realizados com três animais por grupo e estão expressos como média $\pm$ E.P.M. * $P < 0,05$ versus sham (ANOVA seguido de Bonferroni).

4.3. Expressão do receptor quimiotático CCR5 em neutrófilos da cavidade peritoneal de camundongos durante a sepse

Visto que durante a sepse os neutrófilos circulantes expressam o receptor CCR5, o nosso próximo passo foi verificar se o aumento da expressão deste receptor também ocorre em neutrófilos da cavidade peritoneal após a CLP.

A coleta do lavado peritoneal foi realizada 3, 6 e 12 horas após a CLP. Em seguida, as células foram marcadas com os anticorpos anti-Gr1 e anti-CCR5 e analisadas por citometria de fluxo. As **Figuras 5D e 5E** mostram que, 12 horas após a CLP, ocorre aumento significativo da expressão do receptor CCR5 em neutrófilos, em relação à expressão nos animais Sham (**Figura 5A**).

Figura 5: Expressão do CCR5 em neutrófilos do lavado peritoneal após a CLP. (A-D) Análise por citometria de fluxo da expressão do receptor CCR5 em neutrófilos do lavado peritoneal dos animais C57BL/6. (A) Expressão do receptor CCR5 em neutrófilos do lavado peritoneal de animais falso-operados (Sham). (B-D) Expressão do receptor CCR5 em neutrófilos do lavado peritoneal, 3 (B), 6 (C) e 12 horas após a CLP. (E) Gráfico representativo da porcentagem de neutrófilos expressando CCR5 em diferentes momentos após a CLP. Os resultados são representativos de dois experimentos realizados com três animais por grupo e estão expressos como média $\pm$ E.P.M. * $P < 0,05$ versus sham (ANOVA seguido de Bonferroni).

4.4 Ativação do TLR4 induz a expressão do CCR5 e internalização do CXCR2 em neutrófilos

Para investigar o mecanismo pelo qual ocorre aumento da expressão de CCR5 em neutrófilos durante a sepse, investigamos se a ativação de TLR4 pelo LPS, constituinte da parede celular de bactérias gram-negativas presentes na sepse polimicrobiana, induz a expressão de CCR5, da mesma forma que provoca a internalização do CXCR2 (Alves-Filho *et al.*, 2010). Para isso, neutrófilos foram isolados da medula óssea (M.O.) de camundongos e estimulados com LPS. Após 1 **(Figuras 6A-B)** ou 3 horas **(Figuras 6C-D)** de estimulação com LPS, neutrófilos foram marcados com os anticorpos anti-Gr1, anti-CCR5 e anti-CXCR2 para posterior análise por citometria de fluxo. Os resultados nas **Figuras 6A e 6C** demonstram que, como já descrito na literatura, a incubação de neutrófilos com LPS leva a internalização do receptor quimiotático CXCR2 em relação aos neutrófilos não estimulados ou controles. Ainda, conforme descrito anteriormente, neutrófilos quando em repouso ou não ativados, não apresentam expressão detectável do receptor CCR5. No entanto, a expressão de CCR5 foi aumentada nos neutrófilos estimulados com LPS **(Figuras 6B e 6D)**. Como esperado, depois de estimulados com LPS, os neutrófilos dos animais CCR5^{-/-} não apresentaram aumento na expressão desse receptor **(Figura 6E)**.

Figura 6: Ativação de TLR4 induz a expressão do CCR5 em neutrófilos. Neutrófilos foram purificados da medula óssea (MO) dos animais WT (A-D) e $CCR5^{-/-}$ (E) e estimulados com LPS (50 μ g/ml-vermelho) ou meio RPMI (controle-azul). Expressão do receptor CXCR2 após 1(A) e 3 (C) horas de incubação com LPS. Expressão do receptor CCR5 após 1 (B) e 3 (D) horas de incubação com LPS. (E) Expressão do receptor CCR5 em neutrófilos de animais deficientes para CCR5.

4.5 Ativação de TLR4 leva à responsividade quimiotática de neutrófilos para a quimiocina MIP-1 β , ligante do CCR5

Com a finalidade de determinar se o aumento da expressão do CCR5 em neutrófilos pelo LPS é funcional, foi realizado um ensaio de quimiotaxia para a quimiocina MIP-1 β , ligante de CCR5. Para isso, neutrófilos isolados da M.O. foram estimulados ou não (controle) com LPS. Após 2 horas, o ensaio de quimiotaxia dos neutrófilos foi avaliado utilizando uma câmara de *Boyden* modificada.

Como já citado anteriormente, neutrófilos controles respondem à quimiocina MIP-2, muito embora a estimulação de neutrófilos com LTA e LPS resulta em uma diminuição da resposta quimiotática a esta quimiocina (Alves-filho *et al.*, 2009; **Figura 7A**). Por outro lado, os neutrófilos em condições fisiológicas não apresentam resposta para a quimiocina MIP-1 β (Mantovani *et al.*, 2006). No entanto, interessantemente, neutrófilos estimulados com LPS tornam-se responsivos à quimiocina MIP-1 β (**Figura 7B**).

Assim, até o presente momento podemos concluir que a ativação de TLR4 em neutrófilos pelo LPS induz a expressão de CCR5 nessas células e que esse receptor é funcional, ou seja, apresenta atividade quimiotática frente à quimiocina MIP-1 β .

A

B

Figura 7: Ativação de TLR4 leva à responsividade quimiotática de neutrófilos para a quimiocina MIP-1β ligante do CCR5. (A) Quimiotaxia dos neutrófilos isolados da medula óssea (M.O.) dos animais C57BL/6 (WT) para a quimiocina MIP-2 (30 ng/ml) após 2h de incubação com LPS (50 µg/ml) ou meio (RPMI). (B) Quimiotaxia dos neutrófilos da M.O. dos animais WT para a quimiocina MIP-1β (1 ng/ml) após 2h de incubação com LPS (50µg/ml) ou meio (RPMI) Os resultados são representativos de dois experimentos realizados em triplicata e estão expressos como média ± E.P.M. * $P < 0,05$ grupos *versus* respectivos controles (ANOVA seguido de Bonferroni).

4.6 Animais deficientes de CCR5 e MIP-1 α são mais suscetíveis à sepse polimicrobiana

Demonstramos que durante a sepse ocorre aumento de expressão do CCR5 em neutrófilos e que este aumento pode ter um papel biológico por induzir quimiotaxia para a quimiocina MIP-1 β , *in vitro*. Além disso, sabendo da importância da migração de neutrófilos para o foco infeccioso durante o combate de uma infecção (Nathan, 2006) e o envolvimento dos receptores quimiotáticos nesse processo, o nosso próximo objetivo foi avaliar o papel deste receptor durante a sepse polimicrobiana.

Inicialmente, realizamos o modelo de CLP nos animais WT, CCR5^{-/-} e MIP-1 α ^{-/-} (ligante de CCR5) e avaliamos a sobrevivência dos animais diariamente, durante 12 dias. Como podemos observar na **Figura 8A**, os animais CCR5^{-/-} apresentaram maior susceptibilidade do que os animais WT submetidos à sepse sub-letal, na qual 100% dos animais WT sobreviveram contra 57% dos CCR5^{-/-}. Quando utilizamos o modelo de sepse moderada, 62% dos animais WT sobreviveram, enquanto apenas 15% dos CCR5^{-/-} permaneceram vivos até o término da avaliação (**Figura 8B**). Além disso, os animais deficientes para MIP-1 α , um dos ligantes de CCR5, também foram mais suscetíveis à CLP moderada quando comparados aos WT (**Figura 8C**), sendo que enquanto 50% dos animais WT sobreviveram, todos os MIP-1 α ^{-/-} morreram até o sexto dia.

Desse modo, demonstramos que o CCR5 possui importância fisiopatológica durante a sepse.

Figura 8: Animais deficientes do receptor quimiotático CCR5 e da quimiocina MIP1-α são mais suscetíveis à CLP. A sobrevivência dos animais WT, CCR5^{-/-} e MIP1-α^{-/-} submetidos à sepse polimicrobiana, foi avaliada diariamente por um período de 12 dias. Os animais foram submetidos à sepse sub-letal (A) e moderada (B e C). Os resultados são representativos de dois experimentos. Os dados correspondem às porcentagens de sobrevivência de 6 a oito animais por grupo. A taxa de sobrevivência nos animais CCR5^{-/-} e MIP1-α^{-/-} submetidos à CLP foi significativamente diferente dos WT, *P<0,05 (Mantel-Cox logrank).

4.7 Animais deficientes de CCR5 apresentam diminuição na migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal

Sabemos que durante a sepse induzida por CLP, a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal é de extrema importância para evitar a disseminação bacteriana sistemicamente (Benjamim *et al.*, 2000). Assim, com o objetivo de investigar os fatores envolvidos na maior suscetibilidade dos animais CCR5^{-/-} a sepse, avaliamos a migração de neutrófilos para o foco infeccioso, após a indução de sepse moderada. Verificamos que 6 (**Figura 9A**) e 24 (**Figura 9B**) horas após a CLP os animais CCR5^{-/-} tiveram uma significativa redução no recrutamento de neutrófilos para a cavidade peritoneal em relação aos animais WT.

Corroborando com os dados da literatura, demonstramos que a maior taxa de mortalidade dos animais CCR5^{-/-} em relação aos WT está associada com uma menor migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal nos animais CCR5^{-/-}.

Figura 9: Animais CCR5^{-/-} apresentam falência na migração de neutrófilos para o foco infeccioso após a CLP. Animais WT e CCR5^{-/-} foram submetidos à CLP para indução da sepse polimicrobiana. Após 6 (A) e 24 (B) horas, a cavidade peritoneal, correspondente ao foco infeccioso, foi lavada e o número de neutrófilos foi analisado. Os resultados estão expressos como número de neutrófilos $\times 10^6$ /cavidade peritoneal. Os resultados estão expressos como média $\pm$ E.P.M. de cinco animais por grupo. * $P < 0,05$ versus WT submetido à CLP (ANOVA seguido de Bonferroni).

4.8 Animais CCR5^{-/-} apresentam menor eficiência no controle da infecção

Visto que animais CCR5^{-/-} apresentam redução da migração de neutrófilos para o foco infeccioso durante a sepse polimicrobiana e que os neutrófilos estão envolvidos no *clearance* bacteriano, nosso próximo passo foi avaliar o crescimento bacteriano no foco da infecção e também a disseminação bacteriana sistemicamente.

Para tanto, foi quantificado o número de bactérias no lavado peritoneal e no sangue, 6 e 24 horas após a cirurgia. No presente trabalho, não observamos diferença na quantidade de bactérias na circulação e no lavado peritoneal entre animais WT e CCR5^{-/-} 6 horas após a CLP (**Figuras 10A e 10C**, respectivamente). Entretanto, ao analisarmos a quantidade de bactérias no lavado peritoneal e na circulação, após 24 horas da CLP, observamos que os animais deficientes para CCR5, apresentaram uma maior disseminação bacteriana quando comparados aos WT (**Figuras 10B e 10D**).

Desta forma, podemos sugerir que a maior taxa de mortalidade nos animais CCR5^{-/-} em relação aos animais WT é devido à menor migração de neutrófilos para o foco infeccioso com consequente aumento da disseminação bacteriana nesses animais.

Figura 10: Animais CCR5^{-/-} apresentam maior crescimento bacteriano no foco infeccioso e na circulação após a CLP. O número de bactérias foi avaliado no sangue (A e B) e no lavado peritoneal (C e D), após 6 (A e C) e 24 (B e D) h da indução da CLP nos animais WT e CCR5^{-/-}. O número total de bactérias foi estimado pelo cultivo das amostras em placas contendo meio Mueller-Hinton por 18 h. Os resultados são expressos como Log do número de unidades formadoras de colônia (UFC) por ml de amostra (Mann-Whitney U test). * $P < 0,05$ versus WT submetido à CLP.

4.9 Animais CCR5^{-/-} apresentam maior inflamação sistêmica durante a sepse polimicrobiana

A exacerbação da resposta inflamatória sistêmica é um dos fatores agravantes durante a sepse e tem sido associada à presença de bactérias na circulação sanguínea (Raynor *et al.*, 2011). Uma vez confirmado o aumento na carga bacteriana nos animais CCR5^{-/-}, avaliamos a produção da quimiocina MIP-2 no soro de animais submetidos à sepse polimicrobiana grave. De maneira a corroborar o resultado do aumento do crescimento bacteriano local e sistêmico, a produção da quimiocina MIP-2 foi maior nos animais CCR5^{-/-} em relação aos animais WT (**Figura 11**), 24 horas após a CLP.

Figura 11: Quantificação de MIP-2 na circulação após a CLP. MIP-2 foi quantificado por ELISA no soro dos animais obtido 24 horas após indução de CLP. Os dados estão expressos como média $\pm$ E.P.M. de cinco animais por grupo. * $P < 0,05$ versus WT submetido à CLP (ANOVA seguido de Bonferroni).

4.10 Animais CCR5^{-/-} apresentam maior infiltrado neutrofílico no pulmão durante a sepse polimicrobiana

A produção sistêmica de citocinas pró-inflamatórias ocasiona ativação sistêmica de neutrófilos que são sequestrados na microcirculação dos órgãos, levando à lesão e subsequente falência dos mesmos (Asaduzzaman *et al.*, 2008; Ozturk *et al.*, 2008; Elphick *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2009). Um dos meios de avaliação de lesão de órgãos é a quantificação da enzima MPO (mieloperoxidase) nestes órgãos. Uma vez que a enzima MPO está presente em altas concentrações em neutrófilos, a atividade desta pode ser associada ao número de neutrófilos seqüestrados no órgão. Neste contexto e pelo fato de observarmos maior quantidade circulante da quimiocina MIP-2 nos animais CCR5^{-/-}, investigamos se esses animais apresentavam maior infiltrado neutrofílico no pulmão e coração 6 e 24 horas após a CLP.

Observamos que 6 e 24 horas após a CLP, os animais CCR5^{-/-} tiveram um maior infiltrado neutrofílico no pulmão em relação aos animais WT (**Figuras 12C e 12D**). Entretanto, não houve diferença no infiltrado neutrofílico no coração dos animais WT e CCR5^{-/-} após a CLP nos tempos avaliados (**Figuras 12A e 12B**).

Esses resultados confirmam a maior inflamação sistêmica nos animais CCR5^{-/-}, pois o aumento do infiltrado neutrofílico em órgãos secundários indica aumento de lesão orgânica pela ativação inapropriada de neutrófilos na circulação.

Figura 12: Animais CCR5^{-/-} apresentam maior infiltrado neutrofílico no pulmão após a CLP. (A–D) Infiltrado neutrofílico determinado pela atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) no coração (A e B) e pulmão (C e D), 6 (A e C) e 24 (B e D) horas da indução da CLP nos animais WT e CCR5^{-/-}. Os resultados estão expressos como média $\pm$ E.P.M. * $P < 0,05$ versus WT submetido à CLP (ANOVA seguido de Bonferroni).

4.11 Animais CCR5^{-/-} apresentam maior lesão cardíaca e renal durante a sepse polimicrobiana

A falência múltipla de órgãos e sistemas representa uma evolução comum durante a sepse e o infiltrado de neutrófilos em órgãos distantes do foco infeccioso pode participar da falência de múltiplos órgãos. Como demonstramos que animais CCR5^{-/-} apresentam um maior infiltrado neutrofílico no pulmão após a CLP, em relação aos animais WT, avaliamos os níveis séricos dos marcadores de lesão tecidual nesses animais.

As **Figuras 13A-B** mostram que não há diferença nos marcadores de lesão tecidual entre os animais WT e CCR5^{-/-} 6 horas após a CLP. Entretanto, 24 horas após a CLP, observamos aumento da atividade da enzima sérica CK-MB (indicador de lesão cardíaca) (**Figura 13C**) e aumento das concentrações séricas de uréia circulante (indicador de disfunção renal) (**Figura 13D**) nos animais CCR5^{-/-} em relação aos animais WT.

Em conjunto, os resultados obtidos até o momento indicam que o CCR5 tem um papel protetor durante a sepse, visto que animais CCR5^{-/-} apresentam menor migração de neutrófilos para o foco infeccioso e, consequentemente, maior disseminação bacteriana, que induz uma maior resposta inflamatória sistêmica e redução da sobrevida em relação aos animais WT submetidos à CLP.

Figura 13: Animais CCR5^{-/-} apresentam maior lesão cardíaca e renal após a CLP. (A–D) Níveis séricos de (A e C) CK-MB (creatina quinase-MB) e (B e D) de uréia foram mensurados no soro após 6 h (A-B) e 24 h (C-D) da indução da CLP nos animais WT e CCR5^{-/-}. Os resultados estão expressos como média ± E.P.M. * $P < 0,05$ versus WT submetido à CLP (ANOVA seguido de Bonferroni).

4.12 Quantificação de quimiocinas no foco da infecção após a CLP

Visto que animais deficientes para CCR5 parecem ser mais suscetíveis à sepse polimicrobiana em função da redução da migração de neutrófilos, nosso próximo passo foi investigar os mecanismos envolvidos neste processo.

Para que ocorra uma eficiente migração de neutrófilos para o foco infeccioso durante uma infecção, mediadores inflamatórios, como quimiocinas e citocinas, devem ser liberados no local da infecção pelas células residentes (Alves-Filho *et al.*, 2008). Para verificar se a redução na migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal dos animais CCR5^{-/-} ocorre devido à redução na liberação desses mediadores no local da infecção, dosamos as quimiocinas MIP-1 α , MIP-2 e KC após 24 horas da CLP.

De maneira interessante, observamos nas **Figuras 14A e 14C** que os animais deficientes para CCR5 submetidos à CLP apresentaram maior concentração das quimiocinas MIP-1 α e KC em relação aos animais WT também submetidos à CLP. Entretanto, não foi observada diferença nos níveis de MIP-2 entre os animais WT e CCR5^{-/-} após a CLP. Assim, a redução da migração de neutrófilos nos animais CCR5^{-/-} não é devido a uma menor produção de mediadores inflamatórios no foco infeccioso nesses animais.

Figura 14: Quantificação de quimiocinas no lavado peritoneal após a CLP. (A) MIP1- α , (B) MIP-2 e (C) KC foram quantificados por ELISA no lavado peritoneal dos animais obtidos 24 horas após a CLP. Os dados estão expressos como média $\pm$ E.P.M. de cinco animais por grupo. * $P < 0,05$ versus WT submetido à CLP (ANOVA seguido de Bonferroni).

4.13. Animais CCR5^{-/-} apresentam diminuição no número de adesão de leucócitos quando na presença da quimiocina MIP-1 β

Para que a migração leucocitária possa ocorrer durante uma infecção, os leucócitos devem rolar e aderir ao endotélio mesentérico para posterior transmigração (Benjamim *et al.*, 2002). Visto que a redução da migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal durante a sepse não foi devido a uma menor produção de mediadores inflamatórios pelas células residentes de animais CCR5^{-/-}, utilizamos a técnica de microscopia intravital para avaliar se o rolamento e a adesão de leucócitos estavam diminuídos nos animais CCR5^{-/-} 4 horas após a CLP, tempo anterior ao tempo em que observamos diminuição da migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal nos animais CCR5^{-/-}.

Como observado na **Figura 15**, durante a sepse moderada encontramos aumento substancial, mas não significativo, na adesão de leucócitos nos animais WT submetidos à CLP, em relação aos animais CCR5^{-/-} também submetidos à CLP e tratados com salina. Entretanto, quando adicionamos a quimiocina MIP-1 β diretamente sobre o mesentério desses animais, observamos um aumento significativo da adesão leucocitária nos animais WT submetidos à CLP, mas não nos animais sham ou CCR5^{-/-} após a CLP. Como neutrófilos de animais sham não expressam o receptor CCR5, podemos sugerir que o aumento da adesão após adição de MIP-1 β está ocorrendo nos neutrófilos.

Com isso, podemos inferir que o mecanismo envolvido na redução da migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal durante a sepse se deve a uma diminuição da adesão leucocitária nos animais CCR5^{-/-}.

Figura 15: Avaliação da adesão de leucócitos durante a sepse. Animais WT e CCR5^{-/-} foram submetidos à CLP moderada. Após 4 horas, o mesentério foi exposto e analisado por microscopia intravital. O número de células aderidas foi contado na presença de salina. Após, foi adicionado MIP1- β diretamente sobre a mesma região do mesentério e o número de células aderidas foi contado depois de 5 minutos da administração de MIP1- β . O resultado está expresso como número de células aderidas em 100 μm^2 . Os dados estão expressos como média $\pm$ E.P.M. de cinco animais por grupo. * $P < 0,05$ (ANOVA seguido de Bonferroni).

Discussão

5 Discussão

A sepse é uma resposta inflamatória sistêmica resultante da inabilidade do organismo em controlar uma infecção (Cohen, 2002). No presente trabalho, demonstramos que neutrófilos de animais *naïves* não expressam o receptor quimiotático CCR5. No entanto, durante a sepse experimental induzida por CLP, eles passam a expressar o receptor, o qual desempenha importante papel no recrutamento de neutrófilos para o foco infeccioso. Observamos que animais deficientes do CCR5 (CCR5^{-/-}) submetidos à CLP apresentam menor migração de neutrófilos para o foco infeccioso e, conseqüentemente, maior disseminação bacteriana, que induz uma maior resposta inflamatória sistêmica e redução da sobrevida em relação aos animais selvagens.

Os monócitos, macrófagos, mastócitos e linfócitos apresentam alta responsividade quimiotática aos ligantes da família CC (Daly & Rollins, 2003; Laing & Secombes, 2004; Mantovani *et al.*, 2006), enquanto os neutrófilos respondem aos ligantes da família CXC e CX₃C (Baggiolini *et al.*, 1993). Entretanto, diversos trabalhos têm apresentado que, em determinadas condições inflamatórias, os neutrófilos passam a expressar diferentes receptores e a responder a diferentes quimiocinas (Solomkin *et al.*, 1994; Johnston *et al.*, 1999; Bless *et al.*, 2000).

No presente trabalho, demonstramos que durante a sepse induzida pelo modelo de CLP, neutrófilos da circulação e do local da infecção expressam o CCR5, de maneira dependente do tempo após indução da sepse. Trabalhos anteriores já demonstraram a expressão do CCR5 em neutrófilos durante determinadas condições inflamatórias. Hartl e colaboradores (2008) demonstraram que neutrófilos do líquido sinovial e do fluido broncoalveolar de pacientes com artrite reumatóide e

doença pulmonar inflamatória crônica, respectivamente, passam a expressar o CCR5. Entretanto, não foi observado aumento da expressão do CCR5 em neutrófilos circulantes nestes pacientes. Como mencionado anteriormente, a sepse é uma resposta inflamatória sistêmica que é caracterizada pela presença de mediadores inflamatórios como citocinas e quimiocinas, bem como produtos bacterianos na circulação. A presença sistêmica destes mediadores leva à ativação dos neutrófilos na circulação. Desse modo, o aumento da expressão do CCR5 em neutrófilos circulantes de animais sépticos, mas não em neutrófilos circulantes de pacientes com artrite reumatóide e doença pulmonar inflamatória crônica pode ser devido à presença de mediadores que não estão presentes na circulação de pacientes com artrite reumatóide e doença pulmonar inflamatória crônica.

Trabalhos do nosso grupo já haviam demonstrado a internalização do CXCR2 em neutrófilos durante o modelo experimental de sepse polimicrobiana, bem como em pacientes sépticos (Arraes et al., 2005; Rios-Santos et al., 2007; Alves-Filho et al., 2009; Spiller et al., 2010). De forma inédita, neste trabalho, demonstramos que simultaneamente à internalização do CXCR2, ocorre o aparecimento do CCR5 na mesma população de neutrófilos, sugerindo que a expressão desse receptor pode ter um importante papel na migração de neutrófilos durante a sepse, numa fase em que o CXCR2 está internalizado. Além disso, quando analisamos a expressão do CXCR2 em neutrófilos de animais deficientes para CCR5 e submetidos à CLP, observamos que ocorre a internalização do CXCR2, indicando que a internalização deste receptor não é dependente do aumento da expressão do CCR5 em neutrófilos durante a sepse.

Na tentativa de estabelecer o mecanismo responsável pelo aumento da expressão do CCR5 durante a sepse, estudamos, *in vitro*, os efeitos causados em neutrófilos pelos mediadores envolvidos nessa patologia. Anteriormente, foi demonstrado que a ativação de TLR4 pelo LPS (produto de bactérias gram-negativas presentes na sepse polimicrobiana) promove redução na expressão de receptores CXCR2 em neutrófilos durante a sepse (Alves-Filho *et al.*, 2010) e aumento na expressão de CCR2 (Souto *et al.*, 2010). Além disso, outros trabalhos demonstraram que o LPS também é capaz de modular a expressão do CCR5 em monócitos e linfócitos. Juffermans e colaboradores (2000) observaram que a administração de LPS em voluntários saudáveis causa um aumento na expressão do CCR5 em linfócitos, mas uma diminuição na expressão em monócitos (Juffermans *et al.*, 2002). Nesse contexto, investigamos o papel do LPS na expressão do CCR5 em neutrófilos e observamos que paralelamente à internalização do CXCR2, ocorre aumento da expressão do CCR5 em neutrófilos após incubação com LPS.

Dados da literatura têm demonstrado que a expressão do CCR5 em neutrófilos está diretamente relacionada à apoptose dessas células. Durante o processo de resolução da inflamação, neutrófilos entram em apoptose e passam a expressar o CCR5, apesar de não apresentarem quimiotaxia para seus ligantes como MIP-1 β (Ariel *et al.*, 2006). Deste modo, avaliamos a resposta quimiotática dos neutrófilos frente à quimiocina MIP-1 β após incubação dessas células com LPS. Como demonstrado, a incubação dos neutrófilos com LPS leva ao aumento da expressão do CCR5 nessas células. Entretanto, diferentemente do observado por Ariel e colaboradores (2006), demonstramos que esses neutrófilos respondem à quimiocina MIP-1 β . Ainda, nossos dados corroboram os dados de Hartl e

colaboradores (2008), que mostraram que neutrófilos do fluído broncoalveolar e do líquido sinovial de pacientes com artrite reumatoide respondem à quimiotaxia (*in vitro*) induzida por MIP-1 β , via ativação do CCR5. De maneira geral, estes dados sugerem que a expressão do CCR5 também ocorre em neutrófilos viáveis, não sendo somente associada com a apoptose dessas células.

Dada a importância da migração de neutrófilos para o foco infeccioso durante a sepse e uma vez demonstrado que há uma indução de CCR5 funcional nos neutrófilos após a CLP, sugerimos que este receptor poderia ter uma importância biológica nesta doença. Speyer e colaboradores (2004) já haviam mostrado um aumento na expressão de RNA mensageiro para CCR5 em neutrófilos circulantes e da cavidade peritoneal 6 horas após sepse induzida por CLP. Entretanto, ainda não foi demonstrado o papel deste receptor durante a sepse. Neste contexto, analisamos a sobrevida dos animais WT e CCR5^{-/-} após a CLP e observamos que os animais CCR5^{-/-}, após serem submetidos à sepse sub-letal e moderada, apresentaram uma menor sobrevida, quando comparada aos animais controle (WT). Além disso, analisamos também a sobrevida de animais MIP-1 α ^{-/-}, quimiocina ligante do CCR5, e observamos que esses animais também são mais susceptíveis a sepse quando comparados aos WT, o que também foi demonstrado por Takahashi e colaboradores (2002). Assim, investigamos os possíveis mecanismos que poderiam estar envolvidos na diminuição da sobrevida dos animais CCR5^{-/-}.

Nosso grupo já demonstrou, inequivocamente, que há uma intensa falência na migração de neutrófilos para o foco infeccioso durante a sepse, a qual está relacionada com o aumento da mortalidade dos animais na evolução desta síndrome devido à perda do controle local da infecção e, conseqüentemente, disseminação

bacteriana (Tavares-murta *et al.*, 2002; Arraes *et al.*, 2006; Rios-santos *et al.*, 2007; Alves-filho *et al.*, 2008). Nesse contexto, investigamos se a diminuição da sobrevivência dos animais CCR5^{-/-} estava associada à menor migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal desses animais e à diminuição do controle bacteriano. Assim, mostramos que animais deficientes para CCR5 apresentaram uma menor migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal, quando comparados aos animais WT, 6 e 24 horas após indução da sepse. Além disso, observamos também que houve uma diminuição no controle da disseminação bacteriana no foco da infecção e sistemicamente nos animais CCR5^{-/-}.

A presença de bactérias na circulação sanguínea leva à exacerbação da resposta inflamatória sistêmica durante a sepse. Um dos meios de se quantificar a resposta inflamatória sistêmica é pela dosagem de mediadores inflamatórios, como as citocinas e as quimiocinas, na circulação. Assim, avaliamos os níveis séricos de MIP-2 e, corroborando com os dados da literatura, encontramos maiores concentrações desta quimiocina na circulação dos animais CCR5^{-/-} em relação aos animais WT. Anteriormente, foi observado que esses mediadores em altas concentrações na circulação levam a uma inapropriada ativação sistêmica dos neutrófilos, que passam a ser sequestrados em órgãos distantes do local da infecção, podendo lesioná-los (Walley *et al.*, 1996; Van der poll & Van deventer, 1999; Hotchkiss & Karl, 2003). Além disto, foi demonstrado recentemente pelo nosso grupo que animais CCR2^{-/-} apresentam maior resistência à sepse grave que está associada à diminuição do infiltrado neutrofílico em órgãos secundários e consequente redução da lesão tecidual (Souto *et al.*, 2010). Nesse contexto, analisamos o papel do CCR5 no infiltrado neutrofílico dos órgãos secundários.

Diferentemente do observado no trabalho de Souto e colaboradores (2010), mas coerente com a exacerbação da produção sistêmica de MIP-2, animais deficientes para CCR5 apresentaram um maior infiltrado neutrofílico no pulmão, mas não no coração após a CLP, o que pode ter sido dependente da ativação do CCR2 em neutrófilos circulantes nesses animais. Desse modo, nossos resultados sugerem que o CCR5 não está diretamente envolvido na migração de neutrófilos para órgãos secundários, visto que a ausência deste receptor leva ao aumento do infiltrado neutrofílico nesses órgãos. Entretanto, como animais deficientes para CCR5 apresentam uma maior disseminação bacteriana e, conseqüentemente, uma maior concentração de mediadores quimiotáticos na corrente sanguínea, o aumento da infiltração de neutrófilos nos pulmões desses animais pode ser decorrente de uma maior inflamação sistêmica nesses animais.

Outra maneira de se avaliar lesão tecidual é pela análise da concentração e da atividade de marcadores de lesão tecidual encontrados na circulação. Quando analisamos esses marcadores, encontramos aumento da enzima CK-MB (indicador de lesão cardíaca) e da concentração de uréia (indicador de disfunção renal) no plasma dos animais CCR5^{-/-} em relação aos WT, 24 horas após a CLP. Interessantemente, quando avaliamos o infiltrado neutrofílico no coração dos animais, 6 e 24 horas após a CLP, não encontramos diferença entre os animais CCR5^{-/-} e WT. Entretanto, não podemos concluir que a lesão cardíaca não está relacionada ao infiltrado neutrofílico no coração, sendo que o infiltrado neutrofílico no coração pode ter ocorrido entre o período de 6 e 24 horas após a CLP, resultando em uma posterior lesão cardíaca.

Sabemos que para ocorrer uma eficiente migração de neutrófilos durante uma infecção, é necessária uma série de eventos. Por exemplo, a liberação de mediadores inflamatórios produzidos no foco infeccioso pelas células residentes induz a expressão de selectinas no endotélio vascular e nos leucócitos, permitindo o rolamento dos neutrófilos. Durante o processo de rolamento, os neutrófilos podem ser ativados por quimiocinas, resultando na ativação de integrinas responsáveis pela adesão dos neutrófilos ao endotélio. Após aderidos, os neutrófilos respondem ao gradiente quimiotático e completam o processo de transmigração (Alves-Filho *et al.*, 2008). Nesse contexto, para tentar entender a causa da menor migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal nos animais CCR5^{-/-} durante a sepse, quantificamos as quimiocinas MIP-1 α , MIP-2 e KC no lavado peritoneal dos animais WT e CCR5^{-/-} e posteriormente analisamos o rolamento e a adesão leucocitária nas vênulas do mesentério desses animais. Encontramos maiores quantidades das quimiocinas MIP-1 α e KC no lavado peritoneal dos animais CCR5^{-/-} em relação aos animais WT. Desse modo, não podemos explicar a menor migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal dos animais CCR5^{-/-} pela produção de mediadores quimiotáticos no foco infeccioso. Por outro lado, nossos dados corroboram com o trabalho de Ariel e colaboradores (2006) que mostraram que o CCR5 possui importante papel na fase de resolução da inflamação por diminuir os níveis das quimiocinas MIP-1 α e RANTES na cavidade peritoneal em modelo de peritonite induzida por zimosan, visto que animais CCR5^{-/-} apresentaram aumento nos níveis de MIP-1 α e RANTES na cavidade peritoneal.

Ainda, analisamos a adesão dos leucócitos ao endotélio 4 horas após a CLP e observamos um aumento substancial, mas não significativo, na adesão de

leucócitos de animais WT em relação aos animais CCR5^{-/-}. Entretanto, quando adicionamos a quimiocina MIP-1 β diretamente ao mesentério dos animais submetidos à CLP, observamos um acentuado aumento na adesão dos leucócitos ao endotélio dos animais WT, mas não nos animais CCR5^{-/-}. Entretanto, quando adicionamos a quimiocina MIP-1 β sobre o mesentério dos animais sham, não encontramos diferença na adesão leucocitária desses animais antes e depois da adição da quimiocina. Como discutido anteriormente, enquanto monócitos, macrófagos, mastócitos e linfócitos expressam o CCR5, neutrófilos de animais *naïves* não expressam este receptor (Baggiolini *et al.*, 1993). Entretanto, após a CLP, neutrófilos da circulação passam a expressar CCR5. Desse modo, o fato de termos observado aumento da adesão após adição de MIP-1 β nos animais submetidos à CLP, mas não nos animais sham operados, sugere que, quando adicionamos a quimiocina MIP-1 β sobre o mesentério dos animais submetidos à CLP, ocorre um aumento da adesão dos neutrófilos e não de células que em condições fisiológicas expressam o CCR5. De fato, vários trabalhos demonstram que as quimiocinas e citocinas colaboram para ativação de integrinas nos neutrófilos. Conklyn e colaboradores (1996) mostraram que a incubação de células totais do sangue humano com MIP-1 β levou ao aumento de expressão da molécula de adesão CD11b em neutrófilos. Montecucco e colaboradores (2008) mostraram que neutrófilos humanos saudáveis incubados com TNF- α migram para a quimiocina MIP-1 α via ativação de CCR5, por um mecanismo independente do aumento de expressão de CCR5 em neutrófilos. Neste trabalho, foi demonstrado que neutrófilos humanos possuem uma expressão basal de CCR5 e a incubação desses neutrófilos com TNF- α leva à ativação desses receptores, mas não ao aumento de sua

expressão. De forma diferente, foi demonstrado que a migração de neutrófilos frente à quimiocina MIP-1 α se deve ao aumento de expressão da integrina CD11b em neutrófilos tratados com TNF- α (Montecucco *et al.*, 2008). De acordo com os dados da literatura e os nossos resultados, podemos sugerir que as quimiocinas e citocinas podem ativar o receptor quimiotático CCR5 nos leucócitos circulantes, levando ao aumento de expressão da integrina CD11b nessas células, com consequente aumento de adesão leucocitária e transmigração, o mesmo não ocorrendo nos animais CCR5^{-/-}.

Com esses dados, podemos sugerir que o CCR5 está envolvido no processo de adesão dos neutrófilos durante a migração dessas células para o foco infeccioso.

Conclusão

6 Conclusão

No presente trabalho demonstramos que o CCR5 apresenta papel protetor durante a sepse, mediando o processo de migração dos neutrófilos para o foco infeccioso, principalmente em uma fase na qual o receptor CXCR2 está internalizado. Assim, demonstramos um novo papel do receptor CCR5 em neutrófilos durante a sepse, o que pode contribuir para a compreensão da fisiopatologia da sepse e para o desenvolvimento de futuras intervenções terapêuticas no tratamento da mesma.

Referências bibliográficas

7 Referências bibliográficas

- ALGOOD HM, FLYNN JL. CCR5-deficient mice control Mycobacterium tuberculosis infection despite increased pulmonary lymphocytic infiltration. *J Immunol.* 2004; 173:3287-96.
- ALIBERTI J, REIS E SOUSA C, SCHITO M, HIENY S, WELLS T, HUFFNAGLE GB, SHER A. CCR5 provides a signal for microbial induced production of IL-12 by CD8 alpha+ dendritic cells. *Nat Immunol.* 2000; 1:83-7.
- ALVES-FILHO JC, BENJAMIM C, TAVARES-MURTA BM, CUNHA FQ. Failure of neutrophil migration toward infectious focus in severe sepsis: a critical event for the outcome of this syndrome. *Mem.Inst.Oswaldo Cruz* 2005; 1: 223-226.
- ALVES-FILHO JC, DE FREITAS A, RUSSO M, CUNHA FQ. Toll-like receptor 4 signaling leads to neutrophil migration impairment in polymicrobial sepsis. *Critical care medicine* 2006; 34:461-470.
- ALVES-FILHO JC, DE FREITAS A, SPILLER F, SOUTO FO, CUNHA FQ. The role of neutrophils in severe sepsis. *Shock* 2008; 1: 3-9.
- ALVES-FILHO JC, FREITAS A, SOUTO FO, SPILLER F, PAULA-NETO H, SILVA JS, GAZZINELLI RT, TEIXEIRA MM, FERREIRA SH, CUNHA FQ. Regulation of chemokine receptor by Toll-like receptor 2 is critical to neutrophil migration and resistance to polymicrobial sepsis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009; 106: 4018-23.
- ALVES-FILHO JC, SÔNEGO F, SOUTO FO, FREITAS A, VERRI WA JR, AUXILIADORA-MARTINS M, BASILE-FILHO A, MCKENZIE AN, XU D, CUNHA FQ, LIEW FY. Interleukin-33 attenuates sepsis by enhancing neutrophil influx to the site of infection. *Nat Med.* 2010; 16: 708-12.
- ANGUS DC, LINDE-ZWIRBLE WT, LIDICKER J, CLERMONT, PINSKY MR. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med* 2001; 29: 1303-10.
- ARIEL A, FREDMAN G, SUN YP, KANTARCI A, VAN DYKE TE, LUSTER AD, SERHAN CN. Apoptotic neutrophils and T cells sequester chemokines during immune response resolution through modulation of CCR5 expression. *Nat Immunol.*2006; 7: 1209-16.
- ARRAES SM, FREITAS MS, DA SILVA SV, DE PAULA NETO HA, ALVES-FILHO JC, AUXILIADORA MARTINS M, BASILE-FILHO A, TAVARES-MURTA BM, BARJA-FIDALGO C, CUNHA FQ. Impaired neutrophil chemotaxis in sepsis associates with GRK expression and inhibition of actin assembly and tyrosine phosphorylation. *Blood* 2006; 108: 2906-13.
- ASADUZZAMAN M, ZHANG S, LAVASANI S, WANG Y, THORLACIUS H. LFA-1 and MAC-1 mediate pulmonary recruitment of neutrophils and tissue damage in abdominal sepsis. *Shock* 2008; 30: 254-9.
- BAGGIOLINI M, BOULAY F, BADWEY JA, CURNUTTE JT. Activation of neutrophil leukocytes: chemoattractant receptors and respiratory burst. *Faseb J.* 1993; 7: 1004-10.
- BAGAEVA LV, WILLIAMS LP, SEGAL BM. IL-12 dependent/IFN gamma independent expression of CCR5 by myelin-reactive T cells correlates with encephalitogenicity. *J Neuroimmunol* 2003; 137: 109-16.
- BAKER CC, CHAUDRY IH, GAINES HO, BAUE AE. Evaluation of factors affecting mortality rate after sepsis in a murine cecal ligation and puncture model. *Surgery* 1983; 94:331-5.

BENJAMIM CF, FERREIRA SH, CUNHA FQ. Role of nitric oxide in the failure of neutrophil migration in sepsis. *J.Infect.Dis* 2000; 182: 214-223.

BENJAMIM CF, SILVA JS, FORTES ZB, OLIVEIRA MA, FERREIRA SH, CUNHA FQ. Inhibition of leukocyte rolling by nitric oxide during sepsis leads to reduced migration of active microbicidal neutrophils. *Infection and immunity* 2002; 70: 3602-3610.

BEUTLER BE, RIETSCHEL ET. Innate immune sensing and its roots: the story of endotoxin. *Nat Rev Immunol.* 2003; 3: 169-76.

BLESS NM, HUBER-LANG M, GUO RF, WARNER RL, SCHMAL H, CZERMAK BJ, SHANLEY TP, CROUCH LD, LENTSCH AB, SARMA V, et al. Role of CC chemokines (macrophage inflammatory protein-1 β , monocyte chemoattractant protein-1, RANTES) in acute lung injury in rats. *J. Immunol.* 2000; 164: 2650-2659

BONE RC, SIBBALD WJ, SPRUNG CL. The ACCP-SCCM consensus conference on sepsis and organ failure. *Chest* 1992; 101: 1481-3.

CHOI WT & AN J. Biology and clinical relevance of chemokines and chemokine receptors CXCR4 and CCR5 in human diseases. *Experimental Biology and Medicine* 2011; 236: 637-647.

COHEN, J. The immunopathogenesis of sepsis. *Nature* 2002; 420: 885-91.

CONKLYN MJ, NEOTE K, SHOWELL HJ. Chemokine dependent upregulation of cd11b on specific leukocyte subpopulations in human whole blood: effect of anticoagulant on rantes and mip-1 β stimulation. *Cytokine* 1996; 8: 762-766.

CROSARA-ALBERTO DP, DARINI AL, INOUE RY, SILVA JS, FERREIRA SH, CUNHA FQ. Involvement of NO in the failure of neutrophil migration in sepsis induced by *Staphylococcus aureus*. *Br.J.Pharmacol.* 2002; 136: 645-658.

DALY C, ROLLINS BJ. Monocyte chemoattractant protein-1 (CCL2) in inflammatory disease and adaptive immunity: therapeutic opportunities and controversies. *Microcirculation* 2003; 10: 247-57.

DOODES PD, CAO Y, HAMEL KM, WANG Y, RODEGHERO RL, KOBEZDA T, FINNEGAN A. CCR5 Is Involved in Resolution of Inflammation in Proteoglycan-Induced Arthritis. *Arthritis & Rheumatism* 2009; 60:2945-2953

ELPHICK GF, SARANGI PP, HYUN YM, HOLLENBAUGH JA, AYALA A, BIFFL WL, CHUNG HL, REZAIE AR, MCGRATH JL, TOPHAM DJ, REICHNER JS, KIM M. Recombinant human activated protein C inhibits integrin-mediated neutrophil migration. *Blood* 2009; 113:4078-85.

FAURSCHOU M, BORREGAARD N. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes and Infection* 2003; 5: 1317-1327.

FREITAS A, ALVES-FILHO JC, VICTONI T, SECHER T, LEMOS HP, SÔNEGO F, CUNHA FQ, RYFFEL B. IL-17 receptor signaling is required to control polymicrobial sepsis. *J Immunol.* 2009; 182: 7846-54.

FUKE S, BETSUYAKU T, NASUHARA Y, MORIKAWA T, KATOH H, NISHIMURA M. Chemokines in bronchiolar epithelium in the development of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2004; 31:405-12.

GALE LM & MCCOLL SR. Chemokines: extracellular messengers for all occasions?. *Bioessays* 1999; 21:17-28.

HARTL D, KRAUSS-ETSCHMANN S, KOLLER B, HORDIJK PL, KUIJPERS TW, HOFFMANN F, HECTOR A, EBER E, MARCOS V, BITTMANN I, EICKELBERG O, GRIESE M, ROOS D. Infiltrated neutrophils acquire novel chemokine receptor expression and chemokine responsiveness in chronic inflammatory lung diseases. *J Immunol*.2008; 181: 8053-67.

HEWETT JA, SCHULTZE AE, VANCISE S, ROTH RA. Neutrophil depletion protects against liver injury from bacterial endotoxin. *Lab. Invest.* 1992; 66: 347-361.

HIERHOLZER C, KALFF JC, OMERT L, TSUKADA K, LOEFFERT JE, WATKINS SC, BILLIAR TR, TWEARDY DJ. Interleukin-6 production in hemorrhagic shock is accompanied by neutrophil recruitment and lung injury. *Am. J. Physiol.* 1998; 275: L611-L621.

HOTCHKISS RS, KARL IE. The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med.* 2003; 348:138-50.

IMMENSCHUH S, RAMADORI G. Gene regulation of heme oxygenase-1 as a therapeutic target. *Biochemical Pharmacology* 2000; 60: 1121-1128.

JAESCHKE H, FARHOOD A, FISHER MA, SMITH CW. Sequestration of neutrophils in the hepatic vasculature during endotoxemia is independent of beta 2 integrins and intercellular adhesion molecule-1. *Shock* 1996; 6: 351-356.

JANEWAY CA Jr. How the immune system protects the host from infection. *Microbes Infect*, 2001; 3:1167-71.

JEAN-BAPTISTE E. Cellular mechanisms in sepsis. *J Intensive Care Med*, 2007; 22:63-72.

JOHNSTON B, BURNS AR, SUEMATSU M, ISSEKUTZ TB, WOODMAN RC, KUBES P. Chronic inflammation upregulates chemokine receptors and induces neutrophil migration to monocyte chemoattractant protein-1. *J. Clin. Invest.*1999; 103: 1269–1276.

JUFFERMANS NP, PAXTON WA, DEKKERS PE, VERBON A, DE JONGE E, SPEELMAN P, VAN DEVENTER SJ, VAN DER POLL T. Up-regulation of HIV coreceptors CXCR4 and CCR5 on CD4(+) T cells during human endotoxemia and after stimulation with (myco)bacterial antigens: the role of cytokines. *Blood.* 2000; 96:2649-54.

JUFFERMANS NP, WEIJER S, VERBON A, SPEELMAN P, VAN DER POLL T. Expression of human immunodeficiency virus coreceptors CXC chemokine receptor 4 and CC chemokine receptor 5 on monocytes is down-regulated during human endotoxemia. *J Infect Dis.* 2002; 185: 986-9.

- KIM CH, BROXMEYER HE. Chemokines: signal lamps for trafficking of T and B cells for development and effector function. *Journal Leukocyte Biology* 1999; 65:6-15.
- KUBES P. The complexities of leukocyte recruitment. *Semin Immunol* 2002; 14: 65–72.
- LAING KJ, SECOMBES CJ. Trout CC chemokines: comparison of their sequences and expression patterns. *Mol Immunol* 2004; 41: 793-808.
- LOETSCHER P, UGUCCIONI M, BORDOLI L, BAGGIOLINI M, MOSER B, CHIZZOLINI C, DAYER JM. CCR5 is characteristic of Th1 lymphocytes. *Nature* 1998; 391: 344-5.
- MANTOVANI A, BONECCHI R, LOCATI M. Tuning inflammation and immunity by chemokine sequestration: decoys and more. *Nat Rev Immunol*. 2006; 6: 907-18.
- MARTIN GS, MANNINO DM, EATON S, MOSS M. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med*. 2003; 348: 1546-54.
- MATESIC LE, NIEMITZ EL, DE MAIO A, REEVES RH. Quantitative trait loci modulate neutrophil infiltration in the liver during LPS-induced inflammation. *FASEB* 2000; 14: 2247-2254.
- MEDZHITOV R, JANEWAY C Jr. Innate immunity. *N Engl J Med* 2000; 343:338-44.
- MILLER SI, ERNST RK, BADER MW. LPS, TLR4 and infectious disease diversity. *Nat Rev Microbiol*. 2005; 3: 36-46.
- MOREIRA AP, CAVASSANI KA, MASSAFERA TRISTÃO FS, CAMPANELLI AP, MARTINEZ R, ROSSI MA, SILVA JS. CCR5-dependent regulatory T cell migration mediates fungal survival and severe immunosuppression. *J Immunol*. 2008; 180: 3049-56.
- MORENO C, NICAISE C, GUSTOT T, QUERTINMONT E, NAGY N, PARMENTIER M, LOUIS H, DEVIÈRE J. Chemokine receptor CCR5 deficiency exacerbates cerulein-induced acute pancreatitis in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006; 291: G1089-99.
- MONTECUCCO F, STEFFENS S, BURGER F, DA COSTA A, BIANCHI G, BERTOLOTTO M, MACH F, DALLEGRI F, OTTONELLO L. Tumor necrosis factor- α (TNF- α) induces integrin CD11b/CD18 (Mac-1) up-regulation and migration to the CC chemokine CCL3 (MIP-1 α) on human neutrophils through defined signalling pathways. *Cellular Signalling* 2008; 20: 557–568
- NATHAN C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat Rev Immunol* 2006; 6:173-82.
- NG-CASHIN J, KUHNS JJ, BURKETT SE, POWDERLY JD, CRAVEN RR, VAN DEVENTER HW, KIRBY SL, SERODY JS. Host absence of CCR5 potentiates dendritic cell vaccination. *J Immunol*. 2003; 170:4201-8.
- OLSON TS & LEY K. Chemokines and chemokine receptors in leukocyte trafficking. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2002; 283: R7-28.
- OPPERMANN M. Chemokine receptor CCR5: insights into structure, function, and regulation. *Cell Signal*. 2004; 16: 1201-10.

- OZTURK E, DEMIRBILEK S, BEGEC Z, SURUCU M, FADILLIOGLU E, KIRIMLIOGLU H, ERSOY MO. Does leflunomide attenuate the sepsis-induced acute lung injury? *Pediatr Surg Int*. 2008; 24: 899-905.
- RAYNOR LL, SAUCERMAN JJ, AKINOLA MO, LAKE DE, MOORMAN JR, FAIRCHILD KD. Cytokine screening identifies NICU patients with Gram-negative bacteremia. *Pediatr Res* 2011; 70: 688-688.
- RIEDEMANN NC, GUO RF, WARD PA. The enigma of sepsis. *J Clin Invest* 2003; 112: 460-7.
- RIOS-SANTOS F, ALVES-FILHO JC, SOUTO FO, SPILLER F, FREITAS A, LOTUFO CM, SOARES MB, DOS SANTOS RR, TEIXEIRA MM, CUNHA FQ. Down-regulation of CXCR2 on neutrophils in severe sepsis is mediated by inducible nitric oxide synthase-derived nitric oxide. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007; 175: 490-7.
- SECHER T, VASSEUR V, POISSON DM, MITCHELL JA, CUNHA FQ, ALVES-FILHO JC, RYFFEL B. Crucial role of TNF receptors 1 and 2 in the control of polymicrobial sepsis. *J Immunol*. 2009; 182: 7855-64.
- SEGAL AW. How neutrophils kill microbes. *Annu Rev Immunol* 2005; 23: 197-223.
- SILVA E, PEDRO MDE A, SOGAYAR AC, MOHOVIC T, SILVA CL, JANISZEWSKI M, CAL RG, DE SOUSA EF, ABE TP, DE ANDRADE J, DE MATOS JD, REZENDE E, ASSUNÇÃO M, AVEZUM A, ROCHA PC, DE MATOS GF, BENTO AM, CORRÊA AD, VIEIRA PC, KNOBEL E. Brazilian Sepsis Epidemiological Study (BASES study). *Crit Care* 2004; 8: R251-60.
- SOGAYAR AM, MACHADO FR, REA-NETO A, DORNAS A, GRION CM, LOBO SM, TURA BR, SILVA CL, CAL RG, BEER I, MICHELS V, SAFI J, KAYATH M, SILVA E. A multicentre, prospective study to evaluate cost of septic patients in Brazilian intensive care units. *Pharmacoeconomics* 2008; 26: 425-234.
- SOLOMKIN JS, BASS RC, BJORNSEN HS, TINDAL CJ, BABCOCK GF. Alterations of neutrophil responses to tumor necrosis factor and interleukin-8 following human endotoxemia. *Infect. Immun*. 1994; 62: 943-947.
- SOUTO FO, ALVES-FILHO JC, TURATO WM, AUXILIADORA-MARTINS M, BASILE-FILHO A, CUNHA FQ. Essential role of CCR2 in neutrophil tissue infiltration and multiple organ dysfunction in sepsis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010; 183: 234-42.
- SPEYER CL, GAO H, RANCILIO NJ, NEFF TA, HUFFNAGLE GB, SARMA JV, WARD PA. Novel chemokine responsiveness and mobilization of neutrophils during sepsis. *Am J Pathol*. 2004; 165: 2187-96.
- SPILLER F, ORRICO MI, NASCIMENTO DC, CZAİKOSKI PG, SOUTO FO, ALVES-FILHO JC, FREITAS A, CARLOS D, MONTENEGRO MF, NETO AF, FERREIRA SH, ROSSI MA, HOTHERSALL JS, ASSREUY J, CUNHA FQ. Hydrogen sulfide improves neutrophil migration and survival in sepsis via K⁺ATP channel activation. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010; 182: 360-8.
- STEARNS-KUROSAWA DJ, OSUCHOWSKI MF, VALENTINE C, KUROSAWA S, REMICK DG. The Pathogenesis of Sepsis. *The Annual Review of Pathology* 2011; 6:19-48
- TAKAHASHI H, TASHIRO T, MIYAZAKI M, KOBAYASHI M, POLLARD RB, SUZUKI F. An essential role of macrophage inflammatory protein 1α/CCL3 on the expression of host's innate immunities against infectious complications. *J Leukoc Biol* 2002; 72: 1190-7.

TAVARES-MURTA BM, CUNHA FQ, FERREIRA SH. The intravenous administration of tumor necrosis factor alpha, interleukin 8 and macrophage-derived neutrophil chemotactic factor inhibits neutrophil migration by stimulating nitric oxide production. *Br J Pharmacol*. 1998; 124: 1369-74.

TAVARES-MURTA BM, ZAPAROLI M, FERREIRA RB, SILVA-VERGARA ML, OLIVEIRA CH, MURTA EF, FERREIRA SH, CUNHA FQ. Failure of neutrophil chemotactic function in septic patients. *Crit Care Med*. 2002; 30: 1056-1061.

VAN DER POLL T, VAN DEVENTER SJ. Cytokines and anticytokines in the pathogenesis of sepsis. *Infect Dis Clin North Am*. 1999; 13: 413-26, ix.

VERDRENGH M, TARKOWSKI A. Role of neutrophils in experimental septicemia and septic arthritis induced by *Staphylococcus aureus*. *Infection and Immunity* 1997; 65: 2517-2521.

VINCENT JL, SAKR Y, SPRUNG CL, RANIERI VM, REINHART K, GERLACH H, MORENO R, CARLET J, LE GALL JR, PAYEN D. Sepsis in european intensive care units: Results of the soap study. *Critical care medicine* 2006; 34: 344-353.

WALLEY KR, LUKACS NW, STANDIFORD TJ, STRIETER RM, KUNKEL SL. Balance of inflammatory cytokines related to severity and mortality of murine sepsis. *Infect Immun*. 1996; 64: 4733-8.

WANG CR, LIU MF. Regulation of CCR5 expression and MIP-1alpha production in CD4+ T cells from patients with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Immunol* 2003; 132: 371-8.

ZHANG F, WANG X, PAN L, WANG W, LI N, LI J. Glutamine attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung injury. *Nutrition* 2009; 25: 692-8.

ZHONG MX, KUZIEL WA, PAMER EG, SERBINA NV. Chemokine receptor 5 is dispensable for innate and adaptive immune responses to *Listeria monocytogenes* infection. *Infect Immun*. 2004; 72: 1057-64.