

Verônica Vargas Horewicz

**ENVOLVIMENTO DO RECEPTOR FPR2/ALX NAS
ALTERAÇÕES VASCULARES INDUZIDAS POR LPS E SEPSE**

Tese defendida no Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de Doutor em Biotecnologia e Biociências.

Orientador: Prof. Dr. Jamil Assreuy

Florianópolis
2015

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

Horewicz, Verônica Vargas

Envolvimento do receptor FPR2/ALX nas alterações vasculares induzidas por LPS e sepse / Verônica Vargas Horewicz ; orientador, Jamil Assreuy - Florianópolis, SC, 2015.

124 p.

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

Inclui referências

1. Biotecnologia e Biociências. 2. Sepse. 3. Hiporreatividade vascular. 4. FPR2/ALX. 5. WKYMVm. I. Assreuy, Jamil. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências. III. Título.

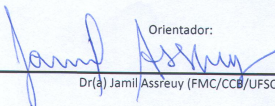
"Envolvimento do receptor FPR2/ALX nas alterações vasculares induzidas por LPS e sepsis"

Por

Verônica Vargas Horewicz

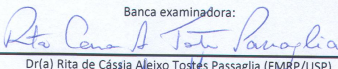
Tese julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (004/BTC/UFSC) do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências – UFSC, composta pelos doutores:

Orientador:

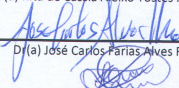


Dr(á) Jamil Assreuy (FMC/CCB/UFSC)

Banca examinadora:



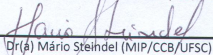
Dr(a) Rita de Cássia Aleixo Tostes Passaglia (FMRP/USP)



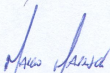
Dr(a) José Carlos Parias Alves Filho (FMRP/USP)



Dr(a) Thaís Cristine Marques Sincero (ACL/CCS/UFSC)



Dr(á) Mário Steindel (MIP/CCB/UFSC)



Prof(a). Dr(a). Marcelo Maraschin
Coordenador(a) do Programa de Pós Graduação em Biotecnologia e Biociências

Florianópolis, 12 fevereiro de 2015.

Dedico esta tese a minha mãe e ao meu pai (*in memoriam*), que sempre me incentivaram desde pequena a estudar e a seguir os meus sonhos, não importando as dificuldades da vida. Obrigada por sempre me guiarem e por acreditarem na minha capacidade.

Dedico também à minha querida Didi (Lígia Maria Vargas Maia), que por ironia do destino faleceu por sepse induzida por pneumonia quando eu estava desenvolvendo este estudo... sinto saudades.

E dedico este trabalho aos que me apoiaram e incentivaram a não desistir quando nem eu mesma acreditava mais em mim... vocês sabem quem são!

AGRADECIMENTOS

À Deus pela força para suportar todos os percalços do caminho.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Jamil Assreuy. Agradeço-o pela paciência e dedicação na transmissão de sua experiência e conhecimentos, e pelas oportunidades concedidas. Obrigada por ter ultrapassado o limite de mestre e ter se tornado companheiro.

À minha mãe Elaine e aos meus irmãos Vitor e Vinicius pelo amor, carinho, apoio, amizade e, principalmente, pelo aprendizado em família, que é a principal escola da vida. Mãe, obrigada por suportar sem reclamar o meu mau humor.

Aos meus queridos avós Moysés e Eva e às minhas cunhadas Debora e Vanessa, por todo incentivo e carinho dispensados em todos os momentos da vida.

À minha sobrinha e afilhada Heloísa por ser muito especial em minha vida.

À Amanda, que sempre esteve ali todas as vezes que as forças me faltaram, sempre com palavras de incentivo e carinho.

À Sandra Crestani (e ao Miguel!), pelo auxílio nas etapas cruciais deste trabalho, pelo enorme aprendizado e pelas inúmeras horas de trabalho suportadas com bom humor. Sandrinha, além de carregar o Miguel na barriga, você me carregou nas costas!

À Regina de Sordi pela parceria, orientação e pelo valioso e indispensável auxílio nas várias etapas deste processo.

À família NOLAB, que mais que colegas de trabalho, são amigos: Muryel, Patrícia, Clarissa, Karin, Ana, Edir, Guilherme e Dani. Meu muito obrigada a todos pelas inúmeras horas de trabalho, risos e brincadeiras.

À Adri Madeira, por toda ajuda no laboratório, pelos cafés da manhã e pela boa companhia sempre!

Aos amigos, Silvia Dal Bó, Nicole Menezes, Livia Yamashiro e Tatiany Faria, pelo apoio e parceria quando tudo começou.

A todos os colegas do departamento, pelo bom convívio durante as disciplinas e pelas conversas nos corredores sempre muito produtivas.

Aos funcionários do LAMEB I, principalmente à Bibiana e à Vanessa, pelo indispensável auxílio no uso dos equipamentos.

Aos funcionários do Biotério da Farmacologia pelo esforço e trabalho prestado.

Aos professores Dr. José Eduardo e Dra. Elizabeth Linder, por disponibilizar equipamentos e reagentes indispensáveis para a realização deste trabalho.

Aos professores Dra. Rita de Cássia Aleixo Tostes Passaglia, Dr. José Carlos Farias Alves Filho, Dr. Mário Steindel, Dra. Thaís Cristine Marques Sincero e Dr. Edmundo Grisard, por terem aceito o convite para avaliar este trabalho.

Aos professores do PPG em Biotecnologia e Biociências, pelos conhecimentos ministrados.

À CAPES, a UFSC e ao PPG em Biotecnologia e Biociências, pelo apoio científico e financeiro.

A todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para a minha formação.

Verônica: “Estou acostumada a trabalhar com células complexas, que apresentam antígenos e tal. Agora, vou trabalhar com uma célula que só contrai...”

Jamil: “E relaxa!”

Junho/2013

Esta tese de doutorado segue o formato proposto no regimento do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências da UFSC, sendo apresentada no seguinte formato:

1. Introdução;
2. Artigo original referente ao trabalho de pesquisa propriamente dito que está publicado em periódico científico de circulação internacional;
3. Discussão;
4. Conclusão.

RESUMO

O FPR2/ALX é um receptor acoplado à proteína G pertencente à família dos receptores de peptídeos formilados, conhecidos pela importância na defesa do hospedeiro e na inflamação. Essa família de receptores é um tanto quanto promíscua e já foram descritos aproximadamente 30 agonistas, tanto peptídicos quanto lipídicos. A ativação do FPR2/ALX pode resultar em potentes respostas pró ou anti-inflamatórias. Ele está presente principalmente em células mielóides mas também foi descrito em células não mielóides. O FPR2/ALX tem a sua expressão aumentada nos tecidos pulmonares de animais sépticos e a sua ativação promove um efeito terapêutico por controlar a inflamação exacerbada. Embora a expressão do FPR2/ALX tenha sido observada em células do músculo liso vascular, o seu papel na reatividade vascular em condições inflamatórias não foi avaliado. O objetivo do presente estudo foi investigar uma possível participação do FPR2/ALX nas alterações vasculares induzidas pela sepse. Os resultados demonstram que o tratamento com o agonista seletivo WKYMVm restaura a hiporreatividade ao vasoconstritor induzida pela pneumosepse e aumenta a sobrevivência dos animais em 40%. Os resultados *in vitro* mostram que a ativação do FPR2/ALX pelo WKYMVm diminui a produção de NO em células de músculo liso vascular e em aortas estimuladas com LPS, mas esse efeito não parece envolver a regulação da expressão da enzima óxido nítrico sintase-2 (NOS-2). Estes dados sugerem um importante papel do NO nos efeitos benéficos do WKYMVm observados nas alterações induzidas por LPS e sepse, entretanto, os mecanismos celulares e moleculares ainda precisam ser elucidados. Em conclusão, nossos dados sugerem que um receptor, primariamente descrito como mediador de respostas imunológicas, pode ter um papel relevante na disfunção vascular observada na sepse, sendo um possível alvo para novas intervenções terapêuticas.

Palavras-chave: Sepse. FPR2/ALX. WKYMVm. Hiporreatividade vascular.

ABSTRACT

FPR2/ALX is a G protein-coupled receptor belonging to the Formyl Peptide Receptor (FPR) family, known to be important in host defense and inflammation. FPR2/ALX is a promiscuous receptor, utilized by lipid and peptide ligands that trigger pro- or anti-inflammatory responses. It is primarily found in myeloid cells but it has also been described in non-myeloid cells. FPR2/ALX expression is increased in lung tissues of septic animals and its activation has a therapeutic effect by controlling exacerbated inflammation. Although FPR2/ALX expression was observed in vascular smooth muscle cells, its role in vascular reactivity in inflammatory conditions has not been studied. The aim of this study was to investigate the possible role of FPR2/ALX in vascular changes observed during LPS injury and sepsis. Our results showed that WKYMVm treatment recovered the hyporeactivity to vasoconstrictors induced by pneumosepsis and improved animal survival by 40%. *In vitro* studies demonstrated that FPR2/ALX activation decreases NO production in LPS-stimulated cells and aorta, but it does not regulate NOS-2 expression. Our data suggest an important role for NO in the WKYMVm beneficial effect observed in LPS injury and sepsis, although the molecular mechanisms still needs to be elucidated. In conclusion, our data suggest that FPR2/ALX receptor, primarily described as a mediator of immune responses, may have an important role in vascular dysfunction observed in sepsis and may be a possible target for new therapeutic interventions.

Keywords: Sepsis. FPR2/ALX. WKYMVm. Vascular hyporeactivity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Domínios de ligação dos agonistas do FPR2/ALX.....	38
Figura 2: Quantidade relativa de transcritos do Fpr2 nos tecidos de camundongo.....	40
Figura 3: Principais vias de sinalização ativadas pelo fMLF em neutrófilos.....	42
Figura 4: Estrutura química do WKYVMm-NH ₂	43
Figura 5: Mecanismos de sinalização intracelular elicitados pelo WKYVMm em fibroblastos humanos IMR-90.....	44
Figura suplementar 1: Análise da expressão do receptor FPR2/ALX em células do músculo liso vascular.....	111
Figura suplementar 2: Efeito do WKYVMm sobre as contrações induzidas pela fenilefrina em anéis de aorta com endotélio de camundongos.....	112
Figura suplementar 3: Curvas concentração-resposta para WKYVMm sobre as contrações induzidas pela fenilefrina em anéis de aorta sem endotélio de camundongos.....	113
Figura suplementar 4: Efeito do WKYVMm sobre a produção de nitrito induzida por LPS+IFN em células do músculo liso vascular.....	114
Figura suplementar 5: Efeito do antagonista WRW4 sobre a produção de nitrito induzida por LPS+IFN em células do músculo liso vascular....	115

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Diagnóstico e classificação clínica da sepse.....	28
Quadro 2: Critérios de diagnóstico de sepse.....	35

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1: Envolvimento do FPR2/ALX nas alterações vasculares induzidas por LPS e sepse.....	80
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AhR - Receptor de aril-hidrocarboneto
Akt - Proteína quinase B
AnxA1 - Anexina A1
CASP - Perfuração do colo ascendente através de um stent
CDC - Centro de controle de doenças
cGMP - Monofosfato cíclico de guanosina
CLP - Ligadura e perfuração do ceco
CMLV - Células do músculo liso vascular
DAG - Diacil glicerol
DAMP - Padrão molecular associado ao dano
EDRF - Fator de relaxamento derivado do endotélio
ERK - Quinase regulada por sinal extracelular
EUA - Estados Unidos da América
fMLF - N-formil-metionil-leucil-fenilalanina
fMMYALF - N-formil-Met-Met-Tyr-Ala-Leu-Phe
FPR - Receptor de peptídeos formilados
Fpr-rs - Fpr-sequência relacionada
FPR2/ALX - FPR2/Lipoxina derivada da Aspirina
GDP - Guanosina difosfato
GPCR - Receptor acoplado à proteína G
GTP - Guanosina trifosfato
i.p. - Intraperitoneal
i.t. - Intratraqueal
i.v. - Intravenoso
IKK - Complexo inibitório I κ B
IL - Interleucina
IP3 - 1,4,5-inositol trifosfato
IRAK - Quinase associada ao receptor de IL-1
IUPHAR - União Internacional de Farmacologia Básica e Clínica
JNK - c-Jun N-terminal quinase
LPS - Lipopolissacarídeo
LXA₄ - Lipoxina A₄
MAPK - Proteína quinase ativada por mitógeno
MLCK - Miosina de cadeia leve quinase
MMK-1 - Peptídeo sintético LESIFRSLFRVM
MyD88 - Proteína de diferenciação mielóide 88
NADPH - Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NF- κ B - Fator nuclear kappa B
NOS - Óxido nítrico sintase

PA - Pressão arterial
PAMP - Padrão molecular associado a patógenos
PBS - Tampão fosfato salina
PCR - Proteína C reativa
PI3K - Fosfatidilinositol-3-quinase
PIP3 - Fosfoinositol-tri-fosfato
PKC - Proteína quinase C
PKG - Proteína quinase G
PLC - Fosfolipase C
PLD - Fosfolipase D
PTX - Toxina Pertussis
qPCR - Reação em cadeia da polimerase em tempo real
Rac - Relacionado às cinases A e C
RvD1 - Resolvina D1
SAA - Proteína sérica amilóide A
sGC - Guanilato ciclase solúvel
SIRS - Síndrome da resposta inflamatória sistêmica
sTREM - Receptor de gatilho solúvel expresso em células mielóides
TLR - Receptor tipo Toll
TNF- α - Fator de necrose tumoral alfa
TRAF-6 - Fator-6 ativado por receptor de TNF
TSST - Toxina da síndrome do choque tóxico
UTI - Unidade de terapia intensiva
WKYMVm - Trp-Lys-Tyr-Met-Val-D-Met-NH₂
WRW4 - Trp-Arg-Trp-Trp-Trp-Trp-NH₂

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	27
1.1	SEPSE.....	27
1.1.1	Incidência e mortalidade.....	29
1.1.2	Etiologia.....	30
1.1.3	Patogênese.....	31
1.1.4	Disfunção cardiovascular.....	32
1.1.5	Diagnóstico.....	34
1.1.6	Quadro clínico.....	36
1.2	RECEPTORES DE PEPTÍDEOS FORMILADOS.....	36
1.2.1	Mecanismos de transdução de sinal nos FPRs.....	40
1.2.2	WKYMVm, o agonista seletivo do FPR2/ALX.....	42
1.2.3	FPR2/ALX e sepse.....	45
1.3	ÓXIDO NÍTRICO.....	46
1.3.1	Óxido nítrico e reatividade vascular.....	49
1.4	HIPÓTESE DE TRABALHO.....	50
1.5	OBJETIVOS.....	53
1.5.1	Objetivo geral.....	53
1.5.2	Objetivos específicos.....	53
2	ARTIGO ORIGINAL EM INGLÊS.....	55
3	DISCUSSÃO.....	71
4	CONCLUSÃO.....	83
	REFERÊNCIAS.....	85
	ANEXO.....	109

INTRODUÇÃO

1.1 SEPSE

Sepse, sépsis ou sepsia, é uma palavra de etimologia grega que significa putrefação. A primeira descrição de sepsse como um quadro grave encontrada na literatura foi de Hipócrates (460 a.C.): “Quando a febre é contínua e a superfície externa do corpo está fria, existe internamente uma sensação de calor e sede, a afecção é mortal” (CAIRUS, 2005).

A teoria de Ignaz Semmelweis, Louis Pasteur e outros sobre a associação microrganismo-doença trouxe o conceito de que sepsse era uma infecção sistêmica, um “envenenamento do sangue”. Mais tarde, mesmo com o advento de potentes antibióticos, muitos pacientes ainda morriam e um novo entendimento se estabeleceu, de que era a resposta do hospedeiro, e não o microrganismo, o maior responsável pela patogênese da sepsse (ANGUS e VAN DER POLL, 2013).

Sepsse atualmente é definida como uma síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS) associada a um processo infeccioso suspeito ou documentado, causado por bactérias, vírus ou fungos. Por ser uma síndrome muito complexa em sua apresentação clínica, a sepsse de dois pacientes nunca será idêntica (HOCHSTADT et al., 2011). Interessante também é o fato de que em estudos experimentais, apesar do grupo de animais ter as mesmas características (gênero, peso, idade, raça, ambiente) e sofrer a mesma agressão (por exemplo, lipopolissacarídeo 10 mg/kg intraperitoneal), alguns animais morrem enquanto outros sobrevivem.

Anteriormente, a ausência de claros critérios de definição e diagnóstico dificultava os estudos epidemiológicos e a avaliação sobre as terapêuticas implantadas e impossibilitava a extrapolação dos resultados para a prática clínica. Em 1992, a reunião de consenso da *American College of Chest Physicians* e da *Society of Critical Care Medicine* (ACCP/SCCM) estabeleceu os critérios de diagnóstico para sepsse, sepsse grave e choque séptico (BONE et al., 1992) (Quadro 1).

Quadro 1 - Diagnóstico e classificação clínica da sepse

Sepse SIRS + fonte de infecção
Sepse grave Disfunção orgânica, hipotensão, hipoperfusão. As manifestações de baixa perfusão podem incluir acidose láctica, oligúria, alteração da consciência, mas não estão limitadas a esses sinais
Choque séptico PA sistólica < 90 mmHg ou diminuição da PA sistólica > 40 mmHg Hipotensão arterial e alteração perfusional persistentes apesar da reposição volêmica adequada

Fonte: Adaptado de Bone e colaboradores (1992).

Os dados estatísticos mostram aumento da incidência de sepse devido ao envelhecimento da população (imunosenescência e comorbidades [REBER et al., 2012]), pacientes imunossuprimidos, cirurgias prolongadas de alto risco e surgimento de microrganismos resistentes (ANGUS et al., 2001; MARTIN et al., 2003; LAGU et al., 2012), mas provavelmente também pelo aprimoramento da nossa capacidade de diagnosticar e oferecer tratamento intensivo. Adhikari e colaboradores estimaram a prevalência da sepse como algo em torno de 19 milhões de casos por ano no mundo (ADHIKARI et al., 2010). Sepse grave acomete mais crianças e idosos, mais o gênero masculino e a raça negra (MAYR et al., 2010). Há cerca de 30 anos, a mortalidade do choque séptico era maior que 80%. Atualmente, com a monitorização e o suporte intensivos, o diagnóstico e tratamento precoces, são observadas mortalidades de 20-30% em vários trabalhos (KUMAR et al., 2011). Porém, esta não é a realidade dos países em desenvolvimento, cuja mortalidade é maior (SALES, 2006).

Apesar de inúmeros ensaios clínicos (COHEN, 2002; ANGUS, 2011; WILLIAMS, 2012; WENZEL e EDMOND, 2012) nenhuma nova intervenção terapêutica foi bem sucedida e o tratamento continua fundamentado em suporte hemodinâmico, antibioticoterapia e remoção do foco infeccioso quando possível. No entanto, um estudo necroscópico demonstrou falhas na identificação e resolução do foco infeccioso (TORGERSEN et al., 2009) e muitos pacientes desenvolvem infecção nosocomial durante a internação. Com o insucesso terapêutico, o paciente morre por choque ou falência de múltiplos órgãos. Vários mecanismos podem contribuir para a disfunção orgânica na sepse. Ela está associada a alterações de perfusão tecidual, especialmente em estágios precoces da doença, e a alterações no metabolismo celular. As diretrizes de tratamento do choque séptico têm enfatizado a importância

da correção das alterações de perfusão precocemente, o que demonstrou melhorar o prognóstico. No entanto, mesmo quando as medidas hemodinâmicas globais estão otimizadas, disfunções na microcirculação podem estar presentes e contribuir com as alterações perfusionais.

Dentre as disfunções orgânicas, a cardiovascular é uma das manifestações-chave pois apresenta papel crucial na fisiopatologia da sepse grave e choque séptico e contribui significativamente para o aumento da morbimortalidade dos pacientes na UTI. De forma geral, dois estágios cardiovasculares distintos são observados, a fase inicial (fase hiperdinâmica), que é caracterizada pela diminuição da resistência vascular periférica, resultado da perda do tônus vasomotor, e tem como consequência a perda do controle da pressão arterial e a perda da regulação da distribuição do débito cardíaco; e a fase tardia (fase hipodinâmica), na qual as alterações hemodinâmicas observadas levam ainda à disfunção microcirculatória com importantes consequências macro-hemodinâmicas, como o distúrbio no transporte de oxigênio e na utilização do mesmo pelos tecidos, e a disfunção endotelial com formação de edema e infiltração de células inflamatórias. A resposta pressórica de pacientes sépticos à administração exógena de catecolaminas e outros vasoconstritores está significativamente reduzida, caracterizando o que é chamado de hiporresponsividade a vasoconstritores (para revisão ver ASSREUY, 2006).

Mediante aos grandes avanços tecnológicos, tanto no campo experimental como clínico, muito foi elucidado. No entanto, estratégias terapêuticas precisam ser desenvolvidas visando alcançar o maior número de pacientes, mesmo em lugares menos favorecidos.

1.1.1 Incidência e mortalidade

Em 1990, foram estimados 415.000 casos de sepse por ano nos Estados Unidos (EUA) com cerca de 100.000 óbitos (CENTERS FOR DISEASE CONTROL, 1990). Estes números devem estar subestimados devido a metodologia empregada na época, mas o CDC já alertava para o crescimento dessas taxas. Angus e colaboradores publicaram em 2001 dados de 751.000 casos de sepse por ano resultando em aproximadamente 215.000 óbitos e um custo estimado de 16,7 bilhões de dólares nos EUA (ANGUS et al., 2001; ANGUS e WAX, 2001).

A partir de um levantamento de dados da literatura, o estudo *Global Burden of Disease*, conduzido pela Organização Mundial de Saúde e a Universidade de Harvard, mostrou incidências de 300 casos por 100.000 pessoas por ano nos EUA; 123/100.000/ano na França e

38/100.000/ano na Noruega. Não foram encontrados dados sobre os países em desenvolvimento entre 1980 e 2008. A pesquisa englobou oito estudos, incluindo um do Brasil (SILVA et al., 2004), que demonstraram grandes variações de incidências, mas com números em torno de 149-240/100.000/ano de sepse; 56-91/100.000/ano de sepse grave e 11/100.000/ano de choque séptico. As taxas de mortalidade foram de 30% para sepse, 50% para sepse grave e até 80% para choque séptico (JAWAD et al., 2012). De acordo com o National Vital Statistics Report (XU, 2010), sepse foi a décima causa de morte nos EUA em 2007 (em 1990, era a décima terceira [SHARMA, 2007]). O estudo também mostrou que as internações por sepse (seja como causa primária ou que a desenvolveram durante a hospitalização) aumentaram de 621.000 em 2000 para 1.141.000 em 2008. Pacientes sépticos têm estadias hospitalares mais prolongadas e mortalidades mais elevadas quando comparados a pacientes com outras enfermidades (por exemplo: pacientes com idade ≤ 65 anos, o tempo de internação foi maior que o dobro de outras enfermidades).

No Brasil, um estudo publicado em 2006, analisou dados de 75 unidades de terapia intensiva (UTI). Foram avaliados 65 hospitais de todas as regiões do país, mas com forte predomínio das regiões sul e sudeste, as mais desenvolvidas do país (73,8% dos hospitais e 85,8% dos pacientes do estudo). No período do estudo, 3.128 pacientes foram admitidos em UTI, sendo que 521 (16,7%) apresentaram sepse. A mortalidade nos subgrupos sepse, sepse grave e choque séptico foi de 16,7%; 34,4% e 65,3%, respectivamente (SALES, 2006).

Além da elevada mortalidade intra-hospitalar, vários estudos têm demonstrado risco aumentado de morte nos meses ou anos que se seguem a alta do paciente. Também ocorre diminuição da qualidade de vida, enfraquecimento físico, déficit cognitivo e alteração do humor (ANGUS e CARLET, 2003).

1.1.2 Etiologia

A infecção pode ter sua origem na comunidade ou ser de origem nosocomial (isto é, quando ocorre durante a hospitalização, não estando presente no momento da admissão hospitalar), sendo esta última relacionada com uma maior taxa de mortalidade (ALBERTI et al., 2002). A pneumonia é a principal infecção encontrada em ambos os casos (infecção nosocomial ou comunitária) tanto no Brasil (SILVA et al., 2004) quanto no mundo (ANGUS e WAX, 2001; ALBERTI et al., 2002; MAYR et al., 2014).

Os principais patógenos responsáveis pelas infecções são as bactérias (tanto Gram-positivas quanto Gram-negativas), seguidos pelos fungos. Nos casos das pneumonias nosocomiais, as bactérias Gram-negativas predominam, enquanto que nos casos das pneumonias adquiridas na comunidade, as Gram-positivas são as principais causadoras (ALBERTI et al., 2002; MAYR et al., 2014). Os principais microrganismos responsáveis pela sepse Gram-negativa são as Enterobactérias (como *Escherichia coli* e espécies de *Klebsiella*), sendo que infecções por *Klebsiella pneumoniae* são as principais responsáveis pelas pneumonias nosocomiais (ALBERTI et al., 2002; TSIOTOU et al., 2005).

Além das pneumonias, outras causas frequentes de sepse são infecções abdominais, urinárias, cutâneas e sanguíneas. Estas infecções correspondem a aproximadamente 85% de todos os casos relatados de sepse, sendo que as pneumonias são responsáveis por mais de 50% dos casos (ANGUS e WAX, 2001; ALBERTI et al., 2002; MAYR et al., 2014).

1.1.3 Patogênese

As bactérias Gram-positivas não têm endotoxinas, mas apresentam na sua parede celular peptidoglicanos e ácido lipoteicoico que podem ser reconhecidos por receptores de superfície das células imunológicas e são pró-inflamatórios. Entretanto, as exotoxinas, como a toxina da síndrome do choque tóxico (TSST-1, do inglês, *Toxic shock syndrome toxin*) do *Staphylococcus aureus*, são os principais fatores patogênicos (CHRISTAKI e GIAMARELLOS-BOURBOULIS, 2014).

No caso das bactérias Gram-negativas, o lipopolissacarídeo (LPS ou endotoxina) é o principal fator etiológico. A parede externa destas bactérias é formada de dupla camada lipídica e peptidoglicanos adjacente à membrana citoplasmática. A molécula de LPS está presente na membrana externa e o lipídeo A, seu principal constituinte, funciona como uma âncora na parede celular e é responsável pela atividade biológica do LPS (CHRISTAKI e GIAMARELLOS-BOURBOULIS, 2014).

O LPS é um padrão molecular associado ao patógeno (PAMP, do inglês, *Pathogen-associated molecular patterns*) que é reconhecido pelas células fagocitárias através dos receptores tipo *Toll* (TLR-4) complexados à proteína ligadora de LPS e CD14. Após a ativação destes receptores ocorre o recrutamento de proteínas citoplasmáticas, tais como a proteína adaptadora MyD88 e a quinase associada ao receptor de IL-1

(IRAK, do inglês, *Interleukin-1 receptor-associated kinase*). O recrutamento destas proteínas causa auto-fosforilação das mesmas e consequentemente ocorre a ativação do TRAF-6 (do inglês, *TNF-receptor activated factor-6*). Este, por sua vez, causa a ativação de várias proteínas, tais como p38, JNK e IκK α/β, cujas ações convergem para ativação do fator nuclear kappa B (NF-κB, do inglês, *Nuclear factor kappa B*) (SHERWOOD, 2004). O NF-κB regula a transcrição de mais de 150 genes, particularmente os relacionados à atividade pró-inflamatória, como o fator de necrose tumoral-alfa (TNF-α, do inglês, *Tumor necrosis factor-alpha*), interleucina-6 (IL-6), IL-8, ciclooxigenase 2 e NOS-2 (do inglês, *Nitric oxide synthase-2*). A ativação do NF-κB tem sido reconhecida como um marcador de mau prognóstico em sepse (FINK, 2004).

O reconhecimento do LPS pelo hospedeiro deflagra a produção de mediadores inflamatórios e anti-inflamatórios. A gravidade da resposta é definida pela resistência do hospedeiro e patogenicidade do microrganismo. A patogenicidade do microrganismo depende do tipo, número e sítio de invasão. A imunocompetência do hospedeiro inclui fatores como idade, gênero, predisposição genética, estado nutricional, comorbidades, medicamentos, abuso de drogas e/ou álcool (HOTCHKISS e KARL, 2003).

Durante muito tempo acreditou-se que o quadro séptico era consequência de uma resposta inflamatória descontrolada. A detecção de níveis elevados de citocinas como o TNF-α e a IL-1β no paciente séptico levou ao conceito de “tempestade de citocinas”. Atualmente, há evidências de que as respostas pró e anti-inflamatórias ocorrem concomitantemente. Dos vários estudos (MUNOZ et al., 1991; ERTEL et al., 1995; VAN DISSEL et al., 1998; WEIGHARDT et al., 2000; RIGATO e SALOMAO, 2003; SINISTRO et al., 2008) com dosagens de citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias pode-se resumir: alguns pacientes sépticos rapidamente produzem citocinas pró e anti-inflamatórias, enquanto outros têm predominância de citocinas anti-inflamatórias ou produção globalmente deprimida (HOTCHKISS et al., 2013).

1.1.4 Disfunção cardiovascular

A presença da disfunção cardiovascular na sepse está associada a um aumento significativo no índice de mortalidade, que neste caso é de 70-90% quando comparado ao índice de mortalidade de pacientes

sépticos sem alterações nesse sistema, que é de aproximadamente 20% (PARRILLO et al., 1990).

Durante as fases iniciais da sepse as alterações circulatórias estão relacionadas principalmente com depleção do volume intravascular que resulta no enchimento insuficiente (pré-carga) do coração, observando-se um aumento do débito cardíaco, associado a elevação da frequência cardíaca, e redução da resistência vascular periférica devido à dilatação sistêmica dos vasos de resistência, estágio conhecido como fase hiperdinâmica do choque séptico. Com a evolução do choque séptico, instala-se um estágio conhecido como fase hipodinâmica, caracterizada pela diminuição do desempenho cardíaco, com redução do débito cardíaco e hipotensão associada à refratariedade a vasoconstritores (ALDERTON et al., 2001; CLOWES et al., 1966). Na tentativa de aumentar o aporte de oxigênio aos tecidos e assim diminuir a produção de ácido láctico e o conseqüente dano celular, umas das estratégias adotadas na clínica é a infusão de volume com o intuito de aumentar a pré-carga (BRUNNELL e PARRILLO, 1996; PARKER, 1998).

Através de medições diretas da contratilidade cardíaca, pesquisadores mostraram uma redução na fração de ejeção do ventrículo esquerdo, redução na resistência vascular sistêmica e taquicardia compensatória como características da disfunção cardíaca induzida pela sepse (DELLINGER, 2003). Simultaneamente ocorre a vasodepressão, que é afetada pela combinação de inúmeros fatores (ABRAHAM e SINGER, 2007), dentre eles a produção excessiva de óxido nítrico, ativação dos canais de potássio e alterações nos níveis de hormônios, como o cortisol e a vasopressina. Além disso, a combinação da administração de TNF- α e IL-1 β pode causar depressão miocárdica em concentrações 50 a 100 vezes inferiores àquelas utilizadas quando as mesmas substâncias são administradas individualmente, aproximando-se das concentrações séricas obtidas nos portadores de choque séptico, sugerindo uma ação sinérgica no desencadeamento da depressão miocárdica secundária à sepse (KUMAR et al., 1996). Zhou e colaboradores (1998) demonstraram ainda que em pacientes sobreviventes a contratilidade e a estrutura cardíaca não estão alteradas de forma significativa mesmo na fase tardia (hipodinâmica) da sepse, o que sugere que a disfunção cardíaca está relacionada principalmente com a fase inicial do choque séptico nos pacientes sobreviventes.

Além de alterações cardiovasculares como a queda gradual na pressão sanguínea, o choque séptico é associado a uma falta de resposta aos vasoconstritores e uma hiper-reatividade aos vasodilatadores (PARRILLO, 1993). Com o desenvolvimento da resposta inflamatória,

há uma vasodilatação periférica acompanhada do aumento na permeabilidade vascular, gerando diminuição do volume intravascular. Com a evolução do processo inflamatório, inicia-se a fase dos efeitos colaterais gerados pela resposta do organismo, como lesões celulares, fechamento do esfíncter pré-capilar, shunt arteriovenoso, vasodilatação, formação de microtrombos leucocitários, agregação plaquetária juntamente com coagulação intravascular disseminada e ativação do sistema retículo endotelial levando a gravíssimas alterações metabólicas (MARIK e VARON, 1998).

1.1.5 Diagnóstico

O diagnóstico da sepse baseia-se em critérios clínicos e laboratoriais. Assim, ainda hoje é difícil diagnosticá-la precocemente com alta sensibilidade e especificidade. Substâncias produzidas em resposta à infecção, os biomarcadores, vêm sendo utilizadas como instrumentos diagnósticos. Diversos biomarcadores estão sendo avaliados como a proteína C reativa (PCR), a procalcitonina, o receptor de gatilho solúvel expresso em células mielóides (sTREM-1, do inglês, *soluble triggering receptor expressed on myeloid cells-1*); mas até o momento, nenhum marcador revelou-se confiável e com bom valor preditivo. Outros estudos analisaram dosagens de três marcadores ou mais simultaneamente com melhores resultados (ex. procalcitonina e sTREM-1 séricos e expressão de CD64 nos neutrófilos) (GIBOT et al., 2012). Também há pesquisas para biomarcadores de disfunções orgânicas, acompanhamento da terapêutica e prognóstico, porém, sem sucesso estabelecido até o momento (SINGER, 2013).

Os critérios de diagnóstico de sepse foram revistos (DELLINGER et al., 2012) na *International Sepsis Definitions Conference* (LEVY et al., 2003) e atualmente encontram-se assim estabelecidos como descrito no Quadro 2.

Quadro 2 - Critérios de diagnóstico de sepse

1. Sepse: infecção suspeita ou documentada e alguns dos sinais a seguir:

Variáveis gerais

Temperatura corpórea $> 38.3\text{ }^{\circ}\text{C}$ ou $< 36.0\text{ }^{\circ}\text{C}$

Frequência cardíaca > 90 batimentos por minuto

Frequência respiratória > 20 incursões por minuto ou PCO_2 arterial < 32 mmHg ou necessidade de ventilação mecânica

Alteração do nível de consciência

Edema significativo ou balanço positivo (> 20 ml/kg em + de 24 h)

Hiperglicemia (glicemia > 140 mg/dl na ausência de diabetes mellitus)

Variáveis inflamatórias

Leucócitos $> 12.000/\text{mm}^3$ ou $< 4000/\text{mm}^3$ ou formas imaturas $> 10\%$

Proteína C Reativa acima de dois dp acima do valor normal

Procalcitonina plasmática acima de dois dp acima do valor normal

Variáveis hemodinâmicas

Hipotensão arterial (sistólica < 90 mmHg, média < 70 mmHg, ou queda da sistólica maior que 40 mmHg em adultos ou menos que dois dp abaixo da pressão normal para idade)

Variáveis de disfunção orgânica

Hipoxemia ($\text{PaO}_2/\text{FIO}_2 < 300$)

Oligúria aguda (débito urinário $< 0,5$ ml/kg/h por pelo menos duas horas a despeito de expansão volêmica)

Elevação da creatinina $> 0,5$ mg/dl

Alterações de coagulação (*international normalized ratio*, INR $> 1,5$ ou TTPA > 60 s)

Íleo

Trombocitopenia ($< 100.000/\text{mm}^3$)

Hiperbilirrubinemia (bilirrubina total > 4 mg/dl)

Variáveis de perfusão tecidual

Hiperlactatemia (> 1 mmol/l)

Fluxo capilar diminuído

2. Sepse grave: sinais de hipoperfusão tecidual ou disfunção orgânica induzida pela sepse

Hipotensão

Aumento do lactato

Diminuição do débito urinário

$\text{PaO}_2/\text{FIO}_2 < 250$ na ausência de pneumonia ou < 200 na presença de pneumonia

Creatinina $> 2,0$ mg/dl

Bilirrubina > 2 mg/dl

Plaquetas $< 100.000/\text{mm}^3$

Coagulopatia (INR $> 1,5$)

3. Choque séptico: hipotensão induzida pela sepse persistente, a despeito da expansão volêmica

Fonte: Dellinger e colaboradores (2012).

1.1.6 Quadro clínico

A manifestação clínica da sepse pode ser variável mas geralmente se apresenta como um quadro rapidamente evolutivo e exuberante (febre, leucocitose, choque, insuficiência respiratória). Todavia, em pacientes idosos, diabéticos e/ou dialíticos pode não manifestar nenhum sinal óbvio, e apresentar apenas alteração da glicemia e diminuição do nível de consciência. As disfunções orgânicas na sepse acometem mais comumente os sistemas respiratório, cardiovascular, nervoso central e renal. Outras manifestações frequentes incluem íleo paralítico, alterações da coagulação e do controle glicêmico, etc. Nos quadros graves desenvolve-se hipotensão resultante da diminuição do tônus vascular, do aumento da permeabilidade e da cardiomiopatia, levando a redução da fração de ejeção, do volume sistólico, da pressão arterial sistêmica e prejuízo da perfusão tecidual. A hipoperfusão é agravada pelas alterações na microcirculação. A persistência deste quadro leva a lesão celular e liberação de padrões moleculares associados ao dano (DAMP), como proteínas mitocondriais, adenosina e ácido úrico. Assim como os PAMPs, os DAMPs são pró-inflamatórios e criam um ciclo vicioso (RUDIGER e SINGER, 2013).

1.2 RECEPTORES DE PEPTÍDEOS FORMILADOS

O acúmulo de leucócitos nos locais de infecção é dependente da presença de fatores quimiotáticos provenientes, em parte, de bactérias (HARRIS, 1954). Considerando que os procariotos iniciam a síntese protéica com N-formil-metionina, Schiffmann e colaboradores (1975b) sintetizaram quimicamente e testaram pequenos peptídeos que iniciavam com N-formil-metionina (CHO-Met). Vários peptídeos apresentaram atividades quimiotáticas para neutrófilos, principalmente os peptídeos contendo N-formil-metionil-leucina e N-formil-metionil-fenilalanina (SCHIFFMANN et al., 1975a). Estudos subsequentes resultaram na identificação do N-formil-metionil-leucil-fenilalanina (fMet-Leu-Phe ou fMLF) como o agonista mais potente dentre 24 peptídeos testados (SHOWELL et al., 1976). Além disso, um domínio de ligação de alta afinidade para o fMLF foi encontrado na superfície de neutrófilos, o qual foi definido bioquimicamente como receptor de peptídeos formilados (FPR, do inglês, *Formylpeptide Receptor*) (SHOWELL et al., 1976). Estudos conduzidos na década de 80 identificaram o FPR como um receptor acoplado à proteína G (GPCR), especialmente Gi (GIERSCHIK et al., 1989; LAD et al., 1985).

A família dos genes FPR humanos possui três membros identificados, *FPR1*, *FPR2* e *FPR3*, os quais codificam três receptores distintos (MIGEOTTE et al., 2006; RABIET et al., 2007; YE et al., 2009). Dentre os três receptores, FPR1 e FPR2/ALX (também conhecido como FPRL-1) apresentam alta similaridade (69%) em suas seqüências primárias de aminoácidos. Eles também compartilham vários agonistas, incluindo o hexapeptídeo WKYVMm (Trp-Lys-Tyr-Met-Val-D-Met-NH₂) e moléculas não peptídicas como o composto 43 (LE et al., 1999; FORSMAN et al., 2012).

Peptídeos N-formilados derivados de bactérias ou mitocôndrias são os principais quimioatraentes do FPR1, induzindo atividades fagocitárias, quimiotaxia, mobilização de cálcio, degranulação e produção de ânions superóxido (LE et al., 2002). O tripeptídeo fMLF derivado de *Escherichia coli* é o menor agonista de alta afinidade para o FPR1. Além da ligação a peptídeos formilados bacterianos, FPR1 reconhece peptídeos mitocondriais que contém fMet na porção N-terminal (CARP, 1982). Essa função é crítica para a resposta de fagócitos ao dano tecidual agudo (MCDONALD et al., 2010; ZHANG et al., 2010), o qual leva a fagocitose de restos celulares e início do reparo tecidual.

Para o FPR2/ALX, outros agonistas derivados de bactérias ou peptídeos formilados derivados de mitocôndrias, são mais potentes que o fMLF (RABIET et al., 2005). Assim como o FPR1, o FPR2/ALX também está envolvido na resposta do organismo à infecção, porém apresenta importante papel na via anti-inflamatória. A sua expressão é induzida tanto por estímulos pró-inflamatórios (TNF- α) quanto anti-inflamatórios (glicocorticóides) (SAWMYNADEN et al., 2006; DUFTON et al., 2010). Modelagem computadorizada combinada a mutagênese dirigida, mostrou que as regiões de interação com ligantes do FPR2/ALX são diferentes do FPR1 (HE et al., 2014). Os diferentes domínios de ligação poderiam explicar porque o FPR2/ALX é capaz de interagir com uma variedade de ligantes de diferentes estruturas, incluindo peptídeos derivados de vírus, anexina A1, proteína sérica amilóide A, catelicidina LL-37, peptídeos sintéticos como o WKYVMm e MMK-1, e pequenas moléculas incluindo Quin-C1 e Composto 43 (revisado em YE et al., 2009) (Figura 1).

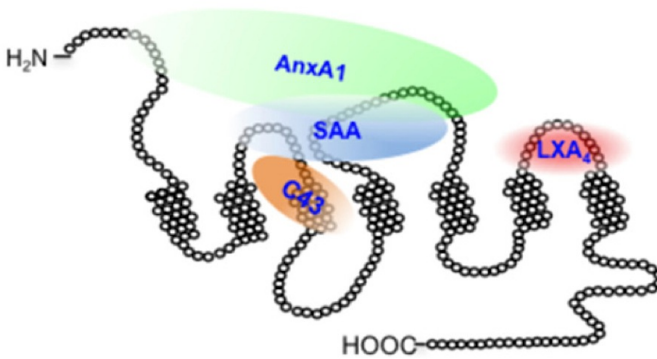


Figura 1: Domínios de ligação dos agonistas do FPR2/ALX. Anexina A1 (AnxA1) utiliza a região N terminal e/ou a segunda alça extracelular para induzir a ativação do receptor. Proteína sérica amilóide A (SAA) interage com as alças extracelulares I e II, enquanto a pequena molécula do composto 43 (C43) penetra na primeira alça extracelular e interage com regiões transmembrana para ativar o FPR2/ALX. O domínio de ligação da lipoxina A₄ (LXA₄) também está demonstrado. Fonte: Bena e colaboradores (2012).

Uma importante linha de pesquisa está focada na interação com mediadores lipídicos que incluem a lipoxina A₄ (FIORE et al., 1994) e a resolvina D1 (RvD1) (KRISHNAMOORTHY et al., 2012). Foi relatado que a LXA₄, na faixa de concentração de pico a nanomolar, é capaz de ativar o FPR2/ALX e gerar ações anti-inflamatórias (revisado em CHIANG et al., 2006). Tanto os mediadores lipídicos quanto a anexina A1 podem interagir com homo- ou heterodímeros do FPR2/ALX para induzir efeitos anti-inflamatórios (COORAY et al., 2013). Entretanto, alguns trabalhos demonstraram que a ação da LXA₄ não é mediada pelo FPR2/ALX (FORSMAN e DAHLGREN, 2009; HANSON et al., 2013; PLANAGUMÁ et al., 2013).

O FPR3 (antes designado como FPRL-2) não é expresso em neutrófilos, porém é encontrado em monócitos, macrófagos e células dendríticas. Diferente dos demais receptores, FPR3 responde fracamente a formil peptídeos exceto ao fMMYALF (N-formyl-Met-Met-Tyr-Ala-Leu-Phe) (RABIET et al., 2005), e possui um único ligante endógeno identificado, o peptídeo F2L (MIGEOTTE et al., 2005). Além disso, o FPR3 apresenta-se constitutivamente internalizado (RABIET et al., 2011), e sua função fisiológica permanece desconhecida.

A família dos genes *Fpr* murinos é mais complexa e contém, pelo menos, oito genes: *Fpr1*, *Fpr2*, *Fpr-rs1*, *Fpr-rs3*, *Fpr-rs4*, *Fpr-rs5*, *Fpr-rs6*, *Fpr-rs7* e *Fpr-rs8* (GAO et al., 1998; YE et al., 2009; TIFFANY et al., 2011). Os primeiros três genes codificam receptores (mFpr1, mFpr2 e mFpr-rs1) que são encontrados predominantemente em leucócitos (GAO e MURPHY, 1993; GAO et al., 1999; HARTT et al., 1999; SOUTHGATE et al., 2008).

Neutrófilos *Fpr1 knockout* apresentam suscetibilidade a infecção por *Listeria* sp., sugerindo uma importante função desse receptor na defesa contra esse microrganismo (GAO et al., 1999). mFpr1 responde fortemente a peptídeos N-formilados derivados de *Listeria monocytogenes* (fMIVTLF), *Staphylococcus aureus* (fMIFL) e mitocôndria (fMMYALF), enquanto apresenta baixa afinidade de ligação ao fMLF derivado de *Escherichia coli* (HE et al., 2012). Esses mesmos peptídeos são muito menos eficazes para o mFpr2, que responde melhor ao peptídeo sintético WKYMVm, ao agonista sintético Quin-C1 e ao Composto 43. A ausência do *Fpr2* murino compromete a imunidade celular contra a infecção por *L. monocytogenes* (LIU et al., 2012). O mFpr2 está envolvido na homeostasia, inflamação e tumorigênese de células epiteliais do cólon (CHEN et al., 2013). Adicionalmente, mFpr1 e mFpr2 são expressos em níveis similares na superfície celular (HE et al., 2012). Contrário à esses receptores, mFpr-rs1 responde fracamente a todos os peptídeos citados (HE et al., 2012), mas serve como receptor para o F2L (GAO et al., 2007; SOUTHGATE et al., 2008) e apresenta um padrão de distribuição intracelular (HE et al., 2012). Essas observações sugerem que o mFpr1 é o ortólogo do FPR1 humano, com algumas propriedades farmacológicas do FPR2/ALX, enquanto o mFpr2 apresenta menor afinidade aos peptídeos formilados. O mFpr2 tem 76 e 63% de identidade com o FPR2/ALX e FPR3 humanos, respectivamente (YE et al., 2009; HARTT et al., 1999). A distribuição intracelular do mFpr-rs1 sugere uma correlação evolucionária com o FPR3 humano (HE et al., 2012). A distribuição tecidual do *Fpr2* em camundongos foi quantificada utilizando-se a técnica de qPCR por Regard e colaboradores (2008) (Figura 2). Embora diferentes, utilizamos nesse trabalho a nomenclatura dos receptores humanos preconizada pela IUPHAR, já que é a mais conhecida e bem descrita (YE et al., 2009).

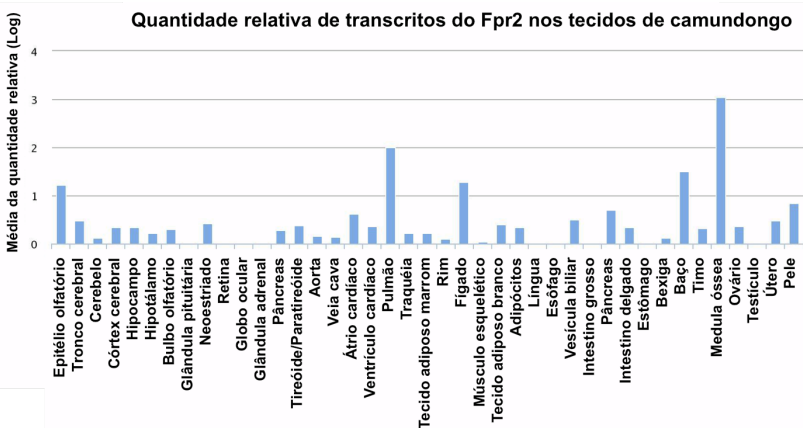


Figura 2: Quantidade relativa de transcritos do *Fpr2* nos tecidos de camundongo. Adaptado de Regard e colaboradores (2008).

A ativação do FPR2/ALX pode resultar em potentes respostas pró ou anti-inflamatórias. Ele está presente principalmente em células fagocitárias mas também foi descrito em células epiteliais, endoteliais, células da microglia, de glândulas salivares, córneas, baço e pulmão (LEVY et al., 2002; MIGEOTTE, 2006; BONNANS et al., 2007; NELSON et al., 2014). A ligação dos diferentes agonistas ao receptor ocorre com distinta afinidade e em diferentes locais de interação, facilitando a ativação de vias de sinalização distintas dependendo do tipo celular (BAE et al., 2003). Assim, os efeitos intracelulares após a ativação desses receptores dependem do tipo e da concentração do ligante, do tipo de ligação, e dependendo das circunstâncias, podem resultar em efeitos inibitórios ou estimulatórios (MIGEOTTE et al., 2006).

1.2.1 Mecanismos de transdução de sinal nos FPRs

A estrutura dos FPRs é constituída de sete segmentos transmembrana em alfa hélice que se ligam à proteína G (PROSSNITZ e YE, 1997), família Gi, que estimulam as subunidades sensíveis à toxina Pertussis (PTX). A proteína G é formada por três subunidades, sendo elas α , β e γ e, em repouso, as subunidades estão ligadas ($G\alpha\beta\gamma$). O complexo $G\alpha\beta\gamma$ possui afinidade por guanosina difosfato (GDP) e após a ligação do peptídeo ao receptor, o GDP é substituído por GTP e o complexo é dissociado liberando as subunidades que interagem com

outras proteínas efetoras (FERRETTI et al., 2001; ZEN e LIU, 2008). A ativação da via e geração de segundos mensageiros é crucial para ações efetoras dos neutrófilos na resposta inflamatória como quimiotaxia, aderência, fagocitose, geração de espécies reativas de oxigênio e secreção de enzimas lisossomais e granulares (SELVATICI et al., 2006).

A interação entre fMLF e seu receptor (FPR1) localizado na superfície dos neutrófilos induz a modificação da proteína G iniciando o processo de transdução de sinal. A Figura 3 mostra as principais vias de sinalização ativadas pelo fMLF que resulta na ativação da NADPH oxidase em neutrófilos. Com a ativação da proteína $G_{\alpha i}$, a liberação da subunidade $G_{\beta\gamma}$ ativa PI3K resultando na produção de PIP3 e seus produtos de degradação. A ativação de p-Rex1 mediada por $G_{\beta\gamma}$ e PIP3 é um evento-chave para a conversão da Rac-GDP em Rac-GTP, a qual transloca para a membrana e se associa à $gp91^{phox}$. A subunidade $G_{\beta\gamma}$ também é responsável pela ativação da fosfolipase C isoforma β ($PLC\beta$), levando à formação de segundos mensageiros como o diacil glicerol (DAG) e o 1,4,5-inositol trifosfato (IP3). O DAG, por sua vez, ativa a PKC. As isoformas de PKC, MAPK (p38, ERK) e Akt são conhecidas por catalizarem a fosforilação de $p47^{phox}$ em neutrófilos estimulados com fMLF, promovendo a translocação de membrana de fatores citosólicos. O domínio PX da $p47^{phox}$ também facilita sua associação com a membrana. A formação de um complexo de NADPH oxidase na membrana é importante para a conversão do oxigênio molecular em superóxido. Uma via de sinalização intracelular que envolve a fosfolipase D (PLD) também foi descrita por contribuir para a geração de superóxido induzida por fMLF (para revisão ver YE et al., 2009).

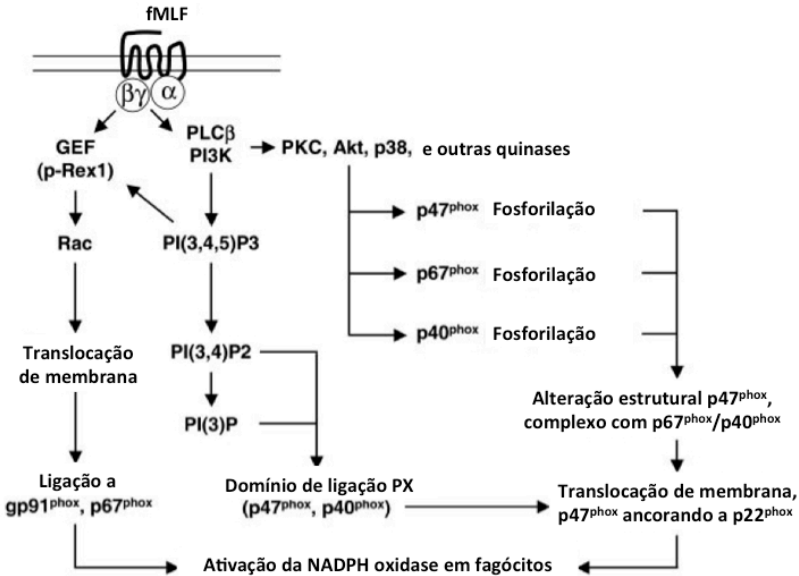


Figura 3: Principais vias de sinalização ativadas pelo fMLF em neutrófilos. Adaptado de Ye e colaboradores (2009).

1.2.2 WKYMVm, o agonista seletivo do FPR2/ALX

O peptídeo WKYMVm foi a primeira molécula proposta como agonista FPR2/ALX seletivo. Ele foi selecionado a partir de uma biblioteca de peptídeos sintéticos e contém uma D-metionina na posição 6 que aumenta sua atividade biológica (BAEK et al., 1996; BAE et al., 1999) (Figura 4). O WKYMVm, também conhecido como peptídeo W, interage com o FPR1, apesar de não apresentar similaridade na sequência de aminoácidos com o fMLF nem grupamento formil. Foi demonstrado que o WKYMVm é capaz de deslocar o [3H]-fMLF ligado ao FPR1, sugerindo que esses dois peptídeos ocupem o mesmo domínio de ligação ou que ocorra sobreposição (HE et al., 2000; LE et al., 1999). WKYMVm liga-se eficientemente ao FPR2/ALX e com muito menos eficiência ao FPR1 e FPR3 (LE et al., 1999; BAE et al., 1999a, DAHLGREN et al., 2000; CHRISTOPHE et al., 2001; KANG et al., 2005), ativando funções em leucócitos, incluindo quimiotaxia, mobilização do receptor de complemento-3, produção de citocinas e ativação da NADPH oxidase, que resulta em estresse oxidativo (LE et al., 1999; BAE et al., 1999a, KANG et al., 2005). WKYMVm ativa

neutrófilos via FPR1 apenas quando a sinalização via FPR2/ALX está bloqueada, indicando troca de receptores (*switch*) (KARLSSON et al., 2006).

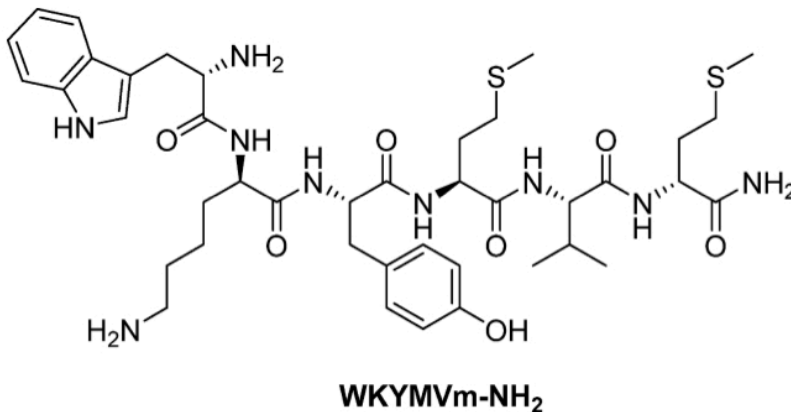


Figura 4: WKYMVm-NH₂, frequentemente mencionado como WKYMVm, ou simplesmente como peptídeo W. Fonte: Ye e colaboradores (2009).

Em neutrófilos, WKYMVm promove aumento da concentração de cálcio intracelular, ativação da NADPH oxidase, produção de ácido araquidônico mediada por fosfolipase A2 e aumento da produção de leucotrieno B4, atuando seletivamente no FPR2/ALX (CHRISTOPHE et al., 2001; LEE et al., 2006). Em monócitos, a ligação do WKYMVm ao FPR2/ALX ativa quimiotaxia associada a fosforilação de várias proteínas celulares, incluindo as proteínas quinase reguladas por sinais extracelulares (ERK, do inglês, *extracellular-signal-regulated kinases*), proteína quinase B e RhoA (do inglês, *Ras homolog gene family member A*) (BAE et al., 1999a), e estimula geração de superóxido dependente de NADPH oxidase através da ativação de proteína quinase C e fosfolipase D (BAE et al., 1999b).

Células da linhagem IMR-90 (fibroblastos pulmonares de origem humana) também expressam FPR2/ALX. A exposição ao WKYMVm induz ativação de ERK, translocação de p47^{phox} e geração de superóxido dependente de NADPH, e esses efeitos são em grande parte prevenidos pela pré-incubação com toxina Pertussis (IACCIO et al., 2007) (Figura 5).

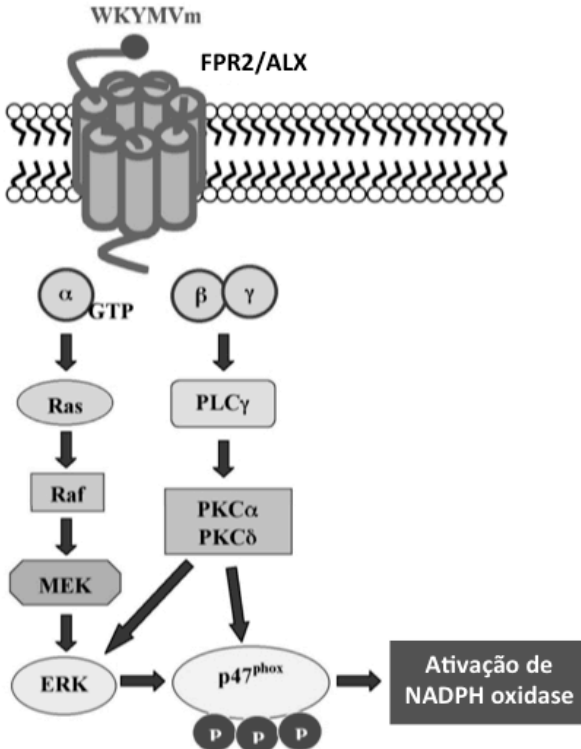


Figura 5: Mecanismos de sinalização intracelular elicitados pelo WKYMVm em fibroblastos humanos IMR-90. Adaptado de Cattaneo e colaboradores (2013).

A ativação do FPR2/ALX pelo WKYMVm em células de astrocitoma humano resulta em influxo de Ca^{2+} e em fosforilação da quinase inibitória- κB ($\text{I}\kappa\text{K}$), a qual é prevenida pelo pré-tratamento com PTX e requer ERK, fosfatidilinositol-3-quinase e ativação de tirosina quinase. Interessantemente, a depleção do colesterol da membrana plasmática inibe a fosforilação da $\text{I}\kappa\text{K}$ estimulada pelo FPR2/ALX, denotando uma importante função da integridade das balsas lipídicas na sinalização do $\text{I}\kappa\text{K}$ via FPR2/ALX (KAM et al., 2007; KWAN et al., 2008).

Na colite ulcerativa experimental, os efeitos terapêuticos do WKYMVm foram observados através da diminuição da permeabilidade epitelial e da modulação do perfil de citocinas pró-inflamatórias (IL-12, IL-23 e $\text{TGF-}\beta$) (KIM et al., 2013). A importância do FPR2/ALX na

homeostasia, inflamação e no processo de reparo epitelial do cólon foi demonstrada em animais FPR2/ALX deficientes (CHEN et al., 2013).

1.2.3 FPR2/ALX e sepse

Existem poucos trabalhos mostrando a importância do FPR2/ALX na sepse. A maioria das evidências experimentais consiste dos efeitos protetores dos agonistas FPR2/ALX endógenos (por exemplo, LXA₄ e AnxA1) na sepse experimental.

Utilizando um modelo de sepse induzida por pneumonia, nosso grupo de pesquisa demonstrou que o FPR2/ALX tem a sua expressão aumentada no foco da infecção, e que o tratamento com LXA₄ em momentos tardios da sepse reduz a mortalidade através da diminuição da resposta inflamatória exacerbada (SORDI et al., 2013a). Outro estudo também relatou efeitos protetores da LXA₄ em um modelo de peritonite induzida por ligadura e perfuração do ceco (CLP) (WALKER et al., 2011). No modelo de sepse induzida por *E. coli*, a combinação de antibióticos com a 15-epi-LXA₄ (epímero da LXA₄) apresentou um efeito sinérgico no controle da sepse, reduzindo a produção de citocinas inflamatórias, diminuindo o recrutamento de neutrófilos para o sítio da infecção, favorecendo a *clearance* bacteriano e aumentando a sobrevivência (UEDA et al., 2014). De forma muito elegante, Gobbetti e colaboradores (2014) mostraram o papel crucial do FPR2/ALX na sepse, utilizando animais *Fpr2* deficientes no modelo de CLP. Na ausência do *Fpr2*, os animais sépticos apresentaram uma exacerbação da severidade da doença, incluindo hipotermia e disfunção cardíaca. Esse cenário foi acompanhado de elevados níveis de citocinas (TNF- α , CXCL1, CCL2) e reduzido recrutamento de monócitos para o peritônio. Embora as ações da LXA₄ possam ser mediadas pelo receptor aril-hidrocarboneto (AhR) (SCHALDACH et al., 1999), o FPR2/ALX é o principal receptor que medeia os efeitos da LXA₄ *in vivo* (DUFTON e PERRETTI, 2010). Ainda na classe dos agonistas lipídicos, foi demonstrado que a RvD2 (SPITE et al., 2009) e a RvD1 (CHEN et al., 2014) melhoram o desfecho da sepse.

Em humanos, um estudo de coorte retrospectivo sobre o uso de aspirina em pacientes com SIRS e sepse mostrou uma melhora na sobrevivência devido a 15-epi-LXA₄ (EISEN et al., 2012).

Agonistas e antagonistas peptídicos do FPR2/ALX têm sido investigados como candidatos terapêuticos para doenças inflamatórias como a sepse, asma e artrite reumatóide. Em um estudo utilizando o modelo de sepse polimicrobiana, a administração do peptídeo

WKYMVm protegeu contra a morte por aumentar a atividade bactericida, por diminuir a inflamação de órgãos vitais e por induzir apoptose de células do sistema imune. Esses efeitos causados pelo WKYMVm foram relacionados ao aumento da produção de citocinas dos tipos I e 17, e à inibição da produção das citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-1 β e IL-6. Os efeitos terapêuticos anti-inflamatórios e bactericidas do WKYMVm foram bloqueados pelo WRW4 (antagonista FPR2/ALX seletivo; Trp-Arg-Trp-Trp-Trp-Trp-NH₂), demonstrando o papel-chave do FPR2/ALX nesse processo (KIM et al., 2010).

Estes trabalhos sugerem uma importante função desse receptor na sepse no que concerne aos seus efeitos no aspecto inflamatório. Todavia, um dos aspectos cruciais para a mortalidade na sepse é a disfunção cardiovascular. Percebendo esta lacuna, foi levantado o que se sabe sobre o FPR2/ALX e o sistema cardiovascular. Existem pouquíssimas evidências da participação do FPR2/ALX na função de vasos sanguíneos. Foi demonstrado que a LXA₄ tem um efeito direto na regulação do tônus vascular e é capaz de promover redução da pressão sanguínea de maneira dependente de endotélio, pela liberação de NO (VON DER WEID et al., 2004). Além disso, a ativação do FPR2/ALX pelo seu agonista seletivo, o peptídeo WKYMVm, induz relaxamento dependente de endotélio em veia omental humana (BERKESTEDT et al., 2008). Muito importante de ser percebido, estes estudos foram realizados na ausência de estímulo ou resposta inflamatória.

1.3 ÓXIDO NÍTRICO

Em 1980, Furchgott e Zawadzki demonstraram que a integridade do endotélio vascular era necessária para que o relaxamento vascular induzido pela acetilcolina ocorresse. Estudos subsequentes revelaram que a vasodilatação induzida pela acetilcolina e outros agentes vasodilatadores como a bradicinina, histamina e a 5-hidroxitriptamina era decorrente da liberação de uma substância efêmera que inicialmente ficou conhecida como fator de relaxamento derivado do endotélio (EDRF, do inglês, *Endothelium-derived relaxing factor*) (para revisão ver MONCADA e HIGGS, 2006). Em 1987, foi demonstrado por Palmer e colaboradores que esse EDRF era um radical livre, o óxido nítrico. A partir daí, começou-se a investigar a participação do NO como molécula sinalizadora em diversos tecidos.

O óxido nítrico é um gás inorgânico que apresenta um elétron desemparelhado, portanto, é um radical livre. Na temperatura e pressão ambiente é um gás incolor, com solubilidade máxima em água de

aproximadamente 2 mM e apresentando solubilidade de 6 a 8 vezes maior em solventes apolares (FUKUTO et al., 2000). Por essa razão, o NO tende a se concentrar em membranas lipídicas e domínios hidrofóbicos de proteínas em sistemas biológicos. Ele age como mediador biológico, regula o tônus vascular e é um importante agente envolvido na resposta imune do hospedeiro (AKTAN, 2004).

O NO é sintetizado pelas enzimas óxido nítrico sintases (NOS) através da conversão da L-arginina e do oxigênio molecular em NO e L-citrulina. Genes separados codificam para NOS neuronal (NOS-1) e para NOS endotelial (NOS-3), bem como para NOS induzida/ Ca^{2+} independente (NOS-2). Apesar das três isoformas catalisarem a mesma reação, elas diferem na regulação, amplitude e duração da produção de NO, além da distribuição celular e tecidual. A NOS-3 é expressa por células endoteliais, miócitos cardíacos, leucócitos, plaquetas, fibroblastos, entre outras. A NOS-1 foi inicialmente purificada de células nervosas e hoje sabe-se que também é expressa em células epiteliais e endoteliais, miócitos esqueléticos, neutrófilos e mastócitos (FÖRSTERMANN et al., 1998). A NOS-2 é expressa em uma ampla variedade de tecidos e células mediante estimulação. Leucócitos, células endoteliais e epiteliais, queratinócitos, fibroblastos, osteócitos, plaquetas e neurônios, expressam a NOS-2 após estimulação por LPS ou citocinas. Estes agentes interagem com receptores que promovem eventos sinalizadores intracelulares, com consequente ativação de fatores de transcrição, como NF- κ B e AP-1 (do inglês, *Activation Protein-1*) para a expressão de NOS-2.

As enzimas NOS-1 e NOS-3 são denominadas enzimas constitutivas, ou seja, estão presentes em condições fisiológicas. Essa classe de isoformas é dependente de cálcio/calmodulina e libera NO em pequenas quantidades (na faixa de nanomolar) e por curtos períodos de tempo (segundos a minutos), em resposta à ativação de receptores ou por estímulos físicos. A NOS-2 por sua vez, é induzida por citocinas ou combinação destas com componentes bacterianos tais como o LPS. Essa enzima requer concentração nanomolar de cálcio (100 nM, concentração equivalente ao nível basal intracelular) para o seu funcionamento e por isso é classificada como sendo independente de cálcio. A NOS-2 produz e libera grandes quantidades de NO (na ordem de micromolar), durante longos períodos. Os efeitos do NO produzido por essa isoforma geralmente estão associados aos efeitos citotóxicos e às ações que promovem efeitos patológicos.

A regulação da atividade das NO sintases está relacionada a diferentes mecanismos pós-traducionais, incluindo dimerização da

proteína, fosforilação de sítios da proteína, ligações de cofatores, além da biodisponibilidade de O₂ e da L-arginina (FLEMING e BUSSE, 1999; AKTAN, 2004).

A produção endógena de NO é um importante fator no controle do tônus vascular (MONCADA et al., 1991). Além disso, o NO desempenha um importante papel em vários processos fisiológicos e fisiopatológicos como neurotransmissão, controle da pressão arterial, inibição da agregação plaquetária e respostas imunológicas em diferentes células e tecidos (REES et al., 1989; MONCADA e HIGGS, 1993; WHITTLE, 1995).

Os efeitos do NO podem ser categorizados como efeitos diretos e indiretos (WINK e MITCHELL, 1998). Os efeitos diretos do NO envolvem a interação direta deste radical livre com outros ligantes, como complexos metálicos, sendo o maior exemplo o grupamento heme. Esta reação geralmente requer baixas concentrações de NO e sugere-se que seja responsável pelos efeitos fisiológicos deste composto. Efeitos indiretos, decorrem da produção de compostos intermediários, geralmente derivados da interação de altas concentrações de NO com oxigênio e superóxido. Os efeitos indiretos são consequência do estresse nitrosativo e estresse oxidativo causados por estes compostos intermediários, sendo considerados os responsáveis pelos efeitos patológicos do NO (MIRANDA et al., 2000; WINK et al., 2000).

Dessa forma, dependendo da concentração e do local de produção do NO, efeitos paradoxais podem ocorrer. Por exemplo, o NO liga-se diretamente ao grupo heme da guanilato ciclase ativando esta enzima. Através de um processo similar o NO pode se ligar ao citocromo P450 e quando em alta concentração, como ocorre na sepse, inibe as enzimas (WINK et al., 1993). O NO pode também competir de maneira reversível com o oxigênio pelo sítio de ligação da citocromo c oxidase durante a respiração celular possivelmente controlando a enzima, no entanto, altas concentrações de NO combinadas com alta concentração de superóxido podem gerar espécies reativas do oxigênio que estão implicadas na toxicidade mitocondrial e na morte celular (CLEETER et al., 1994; MONCADA e ERUSALIMSKY, 2002).

Existe um número substancial de evidências indicando que o NO é um importante efector na sepse e no choque séptico (FLEMING et al., 1991; FEIHL et al., 2001). As primeiras evidências de que o NO teria um envolvimento na fisiopatologia da sepse vieram com a observação de níveis elevados de nitrato e nitrito em pacientes sépticos (OCHOA et al., 1991; EVANS et al., 1993). Vários sintomas dessa condição são atenuados com o uso de inibidores das NOS, o que evidencia a

relevância do NO derivado da NOS-2 no choque séptico. Há trabalhos mostrando que os inibidores de NOS normalizam a queda da pressão arterial (KILBOURN et al., 1990), aumentam a sobrevivência (WU et al., 1995) e atenuam a falência de múltiplos órgãos na sepse experimental em ratos (WU et al., 1996). O papel do NO derivado da NOS-2 na sepse foi reforçado ainda pela demonstração de que camundongos knockout para o gene da NOS-2 respondem melhor a vasoconstritores e apresentam menor mortalidade em modelos relevantes de sepse (para revisão ver KILBOURN, 1997). Há, portanto, uma grande quantidade de dados implicando o NO como um mediador chave na disfunção cardiovascular durante a sepse e choque séptico (para revisão ver FERNANDES e ASSREUY, 2008).

Levando-se em consideração os já bem conhecidos efeitos do NO na pressão arterial e na reatividade vascular na sepse, o uso de inibidores da NOS-2 para o tratamento do choque séptico parecia ser uma opção correta e fadada ao sucesso (AVONTUUR et al., 1998). De posse do conhecimento reunido ao longo dos anos, foi possível antecipar que a inibição da NOS-2 iria bloquear a capacidade do hospedeiro em combater a infecção subjacente, já que o NO é uma das principais armas empregadas pelas células de defesa (NATHAN e SHILOH, 2000). Outro importante problema em lidar com a inibição da NOS-2 na sepse e no choque séptico é que todos os inibidores das NOS testados até agora no ambiente clínico não são suficientemente seletivos para esta isoforma. Esta foi precisamente a razão porque um estudo de Fase III com um inibidor de NOS em sepse humana teve que ser interrompido antes do término, já que a mortalidade aumentou no grupo de pacientes que receberam o inibidor (LOPEZ et al., 2004).

1.3.1 Óxido nítrico e reatividade vascular

O tônus vascular e, portanto, a pressão sanguínea, é determinada principalmente pela contratilidade das células do músculo liso vascular na parede dos vasos, as quais por sua vez, são reguladas pela sua concentração intracelular de cálcio. A concentração de cálcio pode ser regulada por alterações no potencial de repouso da membrana, induzindo a abertura de canais de cálcio voltagem-dependente e influxo de cálcio extracelular da célula muscular lisa ou por ativação de receptores específicos da membrana celular através de ligantes tais como catecolaminas, angiotensina II e endotelina I (OGUT et al., 2003). O cálcio se liga à calmodulina, formando um complexo capaz de ativar a miosina de cadeia leve quinase (MLCK, do inglês, *Myosin Light Chain*

Kinase), a enzima responsável pela fosforilação das cadeias leves de miosina (cadeias regulatórias). Assim, quando a cadeia regulatória é fosforilada, as cabeças de miosina são capazes de se ligar repetitivamente aos filamentos de actina, promovendo a contração (HOROWITZ et al., 1996).

Por outro lado, o relaxamento ocorre em consequência da diminuição do cálcio intracelular, reduzindo a fosforilação da cadeia leve de miosina (MLC) pela miosina fosfatase. Diversos vasodilatadores agem sobre os níveis de adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (AMPC) e de guanosina 3',5'-monofosfato cíclico (GMPc), os quais ativam respectivamente a proteína quinase A (PKA) e a proteína quinase G (PKG). A PKA e a PKG fosforilam e inativam a MLCK, favorecendo a perda do tônus muscular. Além dos estímulos químicos, existe ainda um importante estímulo físico, o shear stress, ou estresse de cisalhamento, que corresponde à força que o fluxo sanguíneo exerce nas células endoteliais e que gera a síntese e liberação de mediadores relaxantes vasculares (MATLUNG et al., 2009). O endotélio relaxa a musculatura lisa vascular por meio de três mediadores principais: o NO (HUTCHINSON et al., 1987; IGNARRO et al., 1987; PALMER et al., 1987; FURCHGOTT, 1993), a prostaciclina (MONCADA et al., 1976) e o fator hiperpolarizante derivado do endotélio (FELETOU & VANHOUTTE, 1988).

O NO encontra-se entre os mediadores locais liberados no ambiente onde a célula do músculo liso está inserida, sendo considerado um importante regulador fisiológico do relaxamento do músculo liso vascular e não vascular.

No caso do músculo liso vascular, o relaxamento induzido por NO ocorre basicamente por dois mecanismos distintos: a) o NO pode abrir canais de potássio no músculo liso vascular, o que reduz o potencial de membrana, hiperpolariza a célula e fecha os canais de cálcio, assim reduzindo o cálcio intracelular e levando à vasodilatação; b) o NO pode ativar a guanilato ciclase solúvel (sGC), aumentando a produção de monofosfato cíclico de guanosina (cGMP) na célula e ativando a proteína quinase G (LUCAS et al., 2000). A PKG por sua vez gera relaxamento por reduzir a concentração de cálcio intracelular, ou por defosforilar a cadeia leve da miosina, o que pode ocorrer por ativação de fosfatases ou pela manutenção da MLCK em uma forma fosforilada que não é passível de ativação pelo complexo cálcio-calmodulina (BEAVO e BRUNTON, 2002).

Os mecanismos clássicos pelos quais o NO produz relaxamento vascular já foram, de certo modo, bem descritos durante a sepse. A

ativação excessiva da via NO-sGC-cGMP foi demonstrada pelo aumento da expressão da sGC e consequente produção de cGMP, principalmente nas fases tardias da sepse. A inibição da sGC melhorou a resposta a agentes vasoconstritores (FERNANDES et al., 2006; FERNANDES et al., 2009). Foi demonstrado que o cGMP produzido via NO derivado da NOS-2, inibe a via Rho-A/Rho-quinase, prejudicando a fosforilação da miosina fosfatase e consequentemente reduzindo a contratilidade vascular (SILVA-SANTOS et al., 2009).

Devido a correlação entre a sepse e a hiporreatividade a vasoconstritores, a comunidade científica têm investigado exaustivamente os mecanismos envolvidos neste evento vascular, principalmente através da utilização de modelos experimentais com LPS. Assim, a hiporreatividade a vasoconstritores tem sido observada em vasos expostos ao LPS e em vasos obtidos de animais endotoxêmicos (JULOU-SCHAEFFER et al., 1990; HO et al., 1996). Similarmente, a administração de LPS em ratos anestesiados causa significativa redução da resposta vasoconstritora e, consequente queda da pressão arterial (SZABO et al., 1993). Outros estudos mostram que o LPS reduz a resposta contrátil à noradrenalina (JULOU-SCHAEFFER et al., 1990), ao U46619, ao cloreto de potássio (UENO e LEE, 1993), à fenilefrina (HO et al., 1996), entre outros agonistas. Outrossim, na sepse avaliada através do modelo de CLP, estão presentes a hiporreatividade a agentes constritores (fenilefrina, serotonina e altas concentrações de K^+) e a hiper-reatividade a agentes vasodilatadores (acetilcolina e trinitrato de glicerila) em artéria mesentérica (CHEN et al., 1994). Vários trabalhos demonstraram que esta hiporreatividade a vasoconstritores mediada pelo LPS é decorrente da expressão de NOS-2 e da acentuada produção de NO (SZABO et al., 1993). A artéria mesentérica superior, renal, hepática e coronária são alguns exemplos de diferentes segmentos vasculares, nos quais a expressão da NOS-2 e as modificações da reatividade estão associadas ao LPS e ao NO (PIEPOT et al., 2002). Por outro lado, a hiporreatividade deflagrada pelo LPS e, concomitante expressão de NOS-2, também estão presentes no leito venoso (VAYSETTES-COURCHAY et al., 2003). No entanto, durante o choque séptico os vasos pertencentes a microcirculação (arteríolas, vênulas e capilares) são os mais afetados (HINSHAW, 1996).

Em estudo do decurso temporal, a hiporreatividade às catecolaminas causada pelo LPS revelou duas fases distintas: a fase inicial (até uma hora após o LPS) e a fase tardia (pelo menos 5 horas após o LPS). Em ambas as fases existe a participação do NO, sendo que na fase inicial o NO é liberado pelo endotélio e na fase tardia o NO é

produzido em grande quantidade no músculo liso, resultante da expressão da NOS-2 (PAYA et al., 1995).

O papel do endotélio na manutenção das funções cardiovasculares basais fisiológicas tem sido muito bem investigado desde a publicação seminal de Furchgott em 1980. Entretanto, em situação anormais, como a sepse, células do músculo liso vascular passam a contribuir para o estado de hipotensão arterial observada neste quadro. Em 1992, Geng e colaboradores demonstraram que células de cultura primária de músculo liso vascular respondiam à estimulação com interferon-gama (IFN- γ) e TNF- α produzindo concentrações significativas de NO, evidenciando que estas células além de serem alvo do NO produzido pelas células endoteliais, são também fontes geradoras de NO.

O efeito restaurador da capacidade contrátil dos vasos em consequência da inibição da NOS pode ser visto mesmo em vasos que tiveram o endotélio removido, indicando que a administração de endotoxina pode induzir alta expressão de NOS-2 em células do músculo liso vascular, com prejuízo da resposta contrátil (MCKENNA, 1986; JULOU-SCHAEFFER et al., 1990). Nesse sentido, Zhang e colaboradores (1999) sugeriram que a camada adventícia, composta de células do músculo liso e fibroblastos, em adição ao endotélio, é uma fonte potencial de NOS-2.

1.4 HIPÓTESE DE TRABALHO

Dados prévios do nosso laboratório mostraram que o FPR2/ALX tem a sua expressão aumentada nos tecidos pulmonares de animais sépticos e a sua ativação resulta em um efeito terapêutico devido ao controle da inflamação exacerbada. A disfunção cardiovascular é um importante componente para a morbidade e mortalidade na sepse, tanto quanto a resposta inflamatória. Embora a expressão do FPR2/ALX tenha sido observada em células do músculo liso vascular, o seu papel na reatividade vascular em condições inflamatórias não foi avaliado. Nesse contexto, a hipótese do presente trabalho é a de que a ativação do receptor FPR2/ALX previne a hiporreatividade a vasoconstritores induzida pela sepse.

1.5 OBJETIVOS

1.5.1 Objetivo geral

Avaliar o envolvimento do receptor FPR2/ALX nas alterações vasculares induzidas por LPS e sepse.

1.5.2 Objetivos específicos

a) Avaliação da expressão do receptor FPR2/ALX em células do músculo liso vascular (células da linhagem A7r5 e aortas torácicas de camundongos);

b) Avaliação do efeito da ativação e/ou bloqueio do receptor FPR2/ALX sobre a expressão da enzima NOS-2 em células do músculo liso vascular;

c) Avaliação do efeito da ativação e/ou bloqueio do receptor FPR2/ALX sobre a produção de NO em células do músculo liso vascular;

d) Avaliação do efeito da ativação e/ou bloqueio do receptor FPR2/ALX na hiporreatividade a fenilefrina causada por LPS em anéis de aorta de camundongos;

e) Avaliação do efeito da ativação do receptor FPR2/ALX na hiporreatividade a fenilefrina causada pela sepse no modelo de sepse induzida por pneumonia;

f) Avaliação do efeito da ativação do receptor FPR2/ALX na sobrevida dos animais com sepse induzida por pneumonia.

2 ARTIGO ORIGINAL EM INGLÊS



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

European Journal of Pharmacology

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

Cardiovascular pharmacology

FPR2/ALX activation reverses LPS-induced vascular hyporeactivity in aorta and increases survival in a pneumosepsis model

Verônica Vargas Horewicz^a, Sandra Crestani^b, Regina de Sordi^{b,1}, Edir Rezende^b, Jamil Assreuy^{b,*}^a Department of Microbiology, Immunology and Parasitology, Universidade Federal de Santa Catarina, SC, Brazil^b Department of Pharmacology, Universidade Federal de Santa Catarina, SC, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 29 August 2014

Received in revised form

21 November 2014

Accepted 24 November 2014

Available online 2 December 2014

Keywords:

FPR2/ALX

WKYMVm

LPS

Pneumosepsis

Vascular dysfunction

Chemical compounds studied in this article:

WKYMVm-NH₂ (PubChem CID: 57340528)

WRW4 (PubChem CID: 49768328)

ABSTRACT

The formylpeptide receptor 2 (FPR2/ALX) is a very promiscuous receptor, utilized by lipid and protein ligands that trigger pro- or anti-inflammatory responses. FPR2/ALX expression is increased in lung tissues of septic animals and its activation has a beneficial therapeutic effect by controlling exacerbated inflammation. Although FPR2/ALX expression was observed in vascular smooth muscle cells, its role in vascular reactivity in inflammatory conditions has not been studied. In this study, we report that LPS increases FPR2/ALX expression in vascular smooth muscle cells (A7r5 cells) and aorta tissue, and that the selective agonist WKYMVm reverses LPS-induced vascular hyporeactivity in mouse aorta rings. Mice bearing pneumosepsis by *Klebsiella pneumoniae* and treated with WKYMVm recovered the reactivity to vasoconstrictors and the survival improved by 40%. As for the mechanisms involved, FPR2/ALX activation decreases NO production in LPS-stimulated cells and aorta, but it does not seem involve the regulation of NOS-2 expression. The molecular mechanism by which the peptide inhibits NO production still needs to be elucidated, but our data suggests an important role for NO in the WKYMVm beneficial effect observed in LPS injury and sepsis. In conclusion, our data suggest, for the first time, that a receptor, primarily described as a mediator of immune responses, may have an important role in the vascular dysfunctions observed in sepsis and may be a possible target for new therapeutic interventions.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Sepsis often progresses to septic shock, which is the result of a hemodynamic derangement that occurs in the presence of infectious agents and inflammatory mediators in the bloodstream (Hollenberg et al., 2004). Although many patients die in the early stages of the disease, in a large number of cases, these hemodynamic changes gradually progress to a hypodynamic state, a late stage of shock characterized by low peripheral vascular resistance and hyporeactivity to vasoconstrictors. In these cases, the patients often die due to hypotension refractory to pharmacological treatment, multiple organ failure, and/or myocardial dysfunction (Parrillo, 1993).

The formylpeptide receptor 2 (FPR2/ALX) belongs to the G protein-coupled receptors family. Its activation can result in powerful pro- or anti-inflammatory responses. FPR2/ALX is an highly versatile receptor that can interact with structurally different

agonists, including small proteins, peptides, and synthetic molecules such as serum amyloid A protein, lipid mediator lipoxin A₄, and Quin-C1 compound (Chiang et al., 2006; He et al., 2003; Nanamori et al., 2004). The binding of different molecules to the receptor occurs with different affinities and at different binding sites, which leads to the activation of distinctive signaling pathways (Bae et al., 2003). Recently, our group demonstrated that FPR2/ALX expression was increased in the lungs and in the cells of bronchoalveolar lavage of septic animals and that lipoxin A₄ treatment reduced the mortality by decreasing the excessive inflammatory response (Sordi et al., 2013a). These data suggest an important role for FPR2/ALX in sepsis, although no major cardiovascular parameter was evaluated.

There is very little evidence of FPR2/ALX involvement in blood vessel function. It was demonstrated that lipoxin A₄ has a direct effect on vascular tone regulation and promotes the lowering of blood pressure by releasing nitric oxide (NO) in an endothelium-dependent manner (von der Weid et al., 2004). Furthermore, the activation of FPR2/ALX by its selective peptide agonist, WKYMVm, induces endothelium-dependent relaxation in the human omental vein (Berkestedt et al., 2008). Nevertheless, these studies were performed in the absence of an inflammatory stimulus and the

* Corresponding author. Tel.: +55 48 3721 9491x216; fax: +55 48 3337 5479.

E-mail address: jamil.assreuy@ufsc.br (J. Assreuy).¹ Present address: Centre for Translational Medicine and Therapeutics, Queen Mary University of London, William Harvey Research Institute, Barts and The London, London, UK.

role of vascular FPR2/ALX in conditions like sepsis has not been investigated.

Thus, the aim of this study was to investigate the possible involvement of FPR2/ALX in the vascular changes observed during lipopolysaccharide injury and sepsis.

2. Materials and methods

2.1. Materials

The following materials were used in this study: lipopolysaccharide (LPS) from *Escherichia coli* (serotype 0111:B4), penicillin-streptomycin, 1400W and phenylephrine chloride were purchased from Sigma Chemical, Co. (St Louis, MO). Interferon-gamma (IFN- γ) was purchased from Chemicon (Danvers, MA), Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) from Gibco-BRL (Grand Island, NY), fetal bovine serum (FBS) from Hyclone (Logan, UT) and ketamine from Parke-Davis (São Paulo, SP, Brazil), WKYMVm-NH₂ and WRW4 were purchased from American Peptide Company, Inc. (Sunnyvale, CA, USA). All compounds were dissolved in sterile PBS except WRW4, which was prepared as a concentrated stock solution in dimethylsulfoxide.

2.2. Animals

All procedures used in this report have been approved by Universidade Federal de Santa Catarina Institutional Committee for Animal Use in Research and are in accordance to the Brazilian Government Guidelines for Animal Use in Research (CONCEA). We used male Swiss mice (weighing 45–50 g) provided by the University stock colony. Animals were kept under standard laboratory conditions, with temperature ($23 \pm 2^\circ\text{C}$), light-controlled room (12-h light/dark cycle), and free access to water and food.

2.3. A7r5 cell culture

Rat vascular smooth muscle cell (VSMC) line A7r5 (ATCC[®] CRL-1444) purchased from Rio de Janeiro Cell Bank was cultured in DMEM containing 10% FBS and 1% antibiotics in a 5% CO₂ incubator at 37 °C. The routine sub-culturing procedure involved removing the cells by using buffered trypsin and plating them at a density of 35,000 cells/cm². Viability was assessed after each experiment by using trypan blue exclusion.

2.4. Measurement of nitrite

A7r5 cells were plated onto 96-well plate (4×10^4 cells/well). After that, cells were stimulated with LPS (1 $\mu\text{g/ml}$)/IFN- γ (200 U/ml) and WKYMVm (1 μM) was added to the culture medium 4 or 12 h after stimulus. Non-stimulated cells were used as control. Following 48 h of cell culture, 100 μl of the culture supernatant was mixed with an equal volume of Griess reagent (0.1% naphthylethylenediamine, 1% sulfanilamide, and 2.5% phosphoric acid) for nitrite measurement. Absorbance was measured at 540 nm by using a calibration curve with sodium nitrite standards.

2.5. Measurement of NO in aorta rings

Mice aortic rings were isolated and incubated for 10 h at 37 °C in a sterile atmosphere containing 5% CO₂ in DMEM containing 2% FBS and antibiotics (1%) in the absence or presence of LPS (10 $\mu\text{g/ml}$). To measure intracellular nitric oxide (NO) production, the membrane-permeable fluorescent indicator 4-amino-5-methylamino-2', 7'-difluorofluorescein diacetate (DAF-FM) was used. Briefly, aortic rings were loaded with 5 μM DAF-FM for 30 min at 37 °C. Following

washing, incubation with WKYMVm (10 μM) or 1400W (10 μM) was performed for 30 min and the fluorescence was measured every 5 min for 60 min at an excitation wavelength of 495 nm and an emission wavelength of 515 nm using a plate reader (Microplate reader Infinite M200 PRO, Tecan Group Ltd., Männedorf, Switzerland).

2.6. Western blotting of FPR2/ALX and NO synthase 2 (NOS-2)

Aortic tissues were quickly frozen in liquid nitrogen, homogenized in ice-cold lysis buffer (50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 5 mM EDTA, 50 mM NaF, 5% glycerol, 1% Triton X-100, 0.2 mM Na₂VO₄, 40 mM beta-glycerophosphate containing 10 $\mu\text{g/ml}$ each of aprotinin, leupeptin, soy bean trypsin inhibitor, and 1 mM PMSF), centrifuged at 10,000g and the supernatant collected. A7r5 cells lysates were prepared with 300 μl of the same lysis buffer. The BCA protein assay kit was used to determine protein concentrations. Protein samples (50 $\mu\text{g/well}$) were subjected to denaturing gel electrophoresis (SDS/PAGE, 8% gel) and run in the Mini-PROTEAN[®] Tetra cell apparatus connected to a PowerPac[™] HC power supply (both from Bio-Rad, CA, USA). After electrophoresis, proteins were electro-transferred to nitrocellulose membranes (Hybond; Amersham Biosciences, NJ). Membranes were blocked for 1 h at room temperature with 5% non-fat dry milk (prepared in TBS-T buffer, pH 7.4; concentration in mmol/L: 20 Tris-HCl, 137 NaCl; and 0.1% Tween 20), and subjected to incubation (overnight, at 4 °C) with primary antibodies against NOS-2 (1:1000, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), anti-FPR2 (1:500, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) or actin (1:25,000, Sigma-Aldrich). Following washing, membranes were incubated with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies (1:5000, Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA) for 1 h at room temperature. The membranes were exposed to HRP substrate (Thermo Fisher Scientific Inc, Rockford, IL, USA) and immune complexes were visualized by chemiluminescence using Chemidoc MP System (Bio-Rad Laboratories). Bands were quantified by densitometry using the software from the manufacturer.

2.7. Mouse aorta ring preparation

Animals were killed by cervical dislocation, and the thoracic aorta was immediately removed and placed in a recipient containing oxygenated Krebs solution at 37 °C. After removal of fat and connective tissue, the aorta was cut into rings (3–4 mm in length), which were transferred to organ baths (5 ml capacity) containing modified Krebs–Ringer solution (pH 7.4; composition in mM: 118 NaCl; 4.7 KCl; 2.5 CaCl₂; 1.1 MgSO₄; 0.9 KH₂PO₄; 25 NaHCO₃; 0.03 EDTA; and 11 D-glucose), warmed at 37 °C, and constantly bubbled with a carbogenic mixture (95% O₂/5% CO₂). Endothelium was removed from rings by gently rubbing the intimal surface. Lack of an acetylcholine-induced relaxation was taken as evidence that endothelial cells had been removed. Each ring was submitted to a resting load of 0.5 g. A stabilization period of 60 min with changes of Krebs solution every 15 min was observed before the start of the experiment. The isometric tension was recorded using digital polygraphs coupled to a computer running the software LabChart v. 7.1 (both from AD Instruments, Castle Hill, Australia).

2.8. Blood pressure measurement

Under anesthesia with ketamine and xylazine (100 and 15 mg/kg, respectively, supplemented at 45–60 min intervals), heparinized PE-10 polyethylene catheters were inserted into the caudal vein for drug injections and into the right carotid artery for recording of mean arterial pressure (MAP). To prevent clotting, a bolus dose of heparin (30 IU) was injected immediately after vein cannulation. Animals were allowed to breathe spontaneously via a tracheal cannula. Body

temperature was monitored by a rectal thermometer and maintained at $37 \pm 1^\circ\text{C}$ by means of a heating table. At the end of the experiment, animals were sacrificed with anesthesia overdose. Blood pressure data were recorded with a catheter pressure transducer (Mikro-Tip®, Millar Instruments, Inc., Houston, TX, USA) coupled to a Powerlab 8/30 (AD Instruments Pty Ltd., Castle Hill, Australia). Results were expressed as mean \pm S.E.M. of the peak changes in MAP (as mmHg) relative to baseline, and recorded following administration of a given compound.

2.9. Bacterial inoculum and pneumosepsis induction

The bacterium used was *Klebsiella pneumoniae* – ATCC® 700603 (American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA). Pneumosepsis was induced as previously described (Sordi et al., 2013b). Briefly, bacteria were made pathogenic by 10 passages in C57-B16 mice. Before each experiment, individual aliquots were washed twice with sterile Dulbecco's PBS (in mM: 137 NaCl, 2.7 KCl, 1.5 KH_2PO_4 , and 8.1 NaH_2PO_4 ; pH 7.4), suspended in Brain Heart Infusion broth, and incubated for 18 h at 37°C . The broth was then centrifuged and the resultant pellet was washed twice with sterile PBS. Bacterial concentration was determined by measuring the absorbance at 600 nm and comparing it to values of a standard curve. Mice were anesthetized with tribromoethanol and ketamine (375/25 mg/kg, i.p.) and placed in supine position. Under aseptic conditions, a 5-mm vertical incision was made in the frontal neck, the trachea was identified, and 0.05 ml of either sterile PBS (sham-inoculated) or bacterial suspension (pneumosepsis) was injected into the trachea. Based on previous experiments, the number of viable bacteria inoculated was 10^9 colony-forming unit (CFU) (Sordi et al., 2013b). The skin was closed with surgical suture. Animals received 30 ml/kg of sterile warm PBS subcutaneously. Until recovery from anesthesia, animals were maintained at 37°C in their cages, after which they were housed in a temperature- and light controlled room, as described above.

2.10. Experimental design

To perform Western blot analyses, A7r5 cells were plated onto 60 mm Petri dish (10^6 cells/dish). A7r5 cells were stimulated with LPS (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)/IFN- γ (200 U/ml) for 24 h and FPR2/ALX expression was analyzed. Non-stimulated cells were used as control. To evaluate FPR2/ALX and NOS-2 expression in aortas, they were exposed or not (vehicle) to LPS (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) in the presence or absence of WKYMVm (10 μM) for 10 h and the proteins expression was analyzed. For vascular reactivity studies, an in vitro experimental protocol in thoracic aortas that mimics the hyporesponsiveness to vasoconstrictors observed in vivo was used (da Silva-Santos et al., 2002). Each endothelium-denuded aorta ring was incubated with LPS (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 10 h, without washing, to induce NOS-2 expression. Control groups were incubated with dexamethasone (0.1 μM) to inhibit NOS-2 expression caused by LPS contamination in the Krebs buffer (Rees et al., 1990). At the end of the incubation period, the preparations were washed several times and a dose-response curve to phenylephrine was obtained. To assess a WKYMVm effect, the peptide (10 μM) was added together with LPS and left for 10 h in contact with the rings or it was added 30 min before obtaining phenylephrine dose-response curve. In another series, WRW4 (20 μM) was added 30 min before WKYMVm. For survival experiments, WKYMVm (4 mg/kg) or vehicle (PBS) was injected (s.c.) in mice 2, 14, 26, and 38 h after *K. pneumoniae* injection and survival rate was observed every 24 h for 6 days. For blood pressure measurement, mice were sham-inoculated or submitted to pneumosepsis as described above. 2 and 14 h after surgery, WKYMVm (4 mg/kg) or vehicle (PBS) was injected (s.c.), 24 h after pneumosepsis induction, basal MAP

and changes induced by a randomized dose-response to phenylephrine (10 and 30 nmol/kg) were obtained. Each dose of the vasoconstrictor was given only when the pressor effect of the preceding one had fully subsided.

2.11. Statistical analysis

Data are expressed as mean \pm S.E.M. of n animals (n value is indicated in figure legends). The Student t test was used for comparison between two groups and one- or two-way analysis of variance (ANOVA) for multiple comparisons with the appropriate post-hoc test as indicated in the figure legends. Differences in survival were determined with log rank test. A P value of less than 0.05 was considered significant. Graphs were drawn and statistical analyses were performed using GraphPad Prism version 6.0c for Mac software (San Diego, CA, USA).

3. Results

3.1. LPS increase FPR2/ALX expression in vascular smooth muscle cells

FPR2/ALX expression was detected in A7r5 cells (Fig. 1) as well as in mouse thoracic aortas (Fig. 2), and LPS exposure increased its expression in both. WKYMVm treatment substantially reduced LPS-induced increase in FPR2/ALX expression in mouse aorta (Fig. 2).

3.2. WKYMVm reverses LPS-induced hyporeactivity to phenylephrine through FPR2/ALX activation

Since FPR2/ALX expression in aortas and its modulation by LPS were confirmed, we investigated the WKYMVm effect on LPS-mediated hyporeactivity in mouse thoracic aorta rings (Fig. 3). As

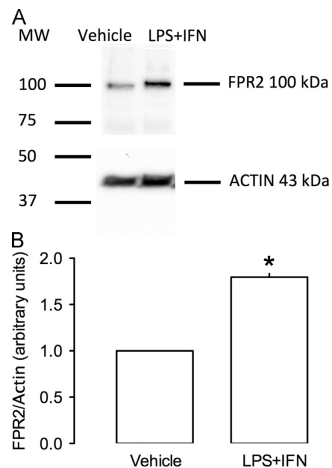


Fig. 1. Effect of LPS on FPR2/ALX expression in vascular smooth muscle cells. A7r5 cells were exposed or not (vehicle) to LPS (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) and IFN- γ (200 U/ml) for 24 h and FPR2/ALX expression was analyzed. Panel A: FPR2/ALX representative immunoelectrophoresis. Panel B: densitometry. Bars represent the mean \pm S.E.M., $n=3$. * $P < 0.05$ compared to vehicle (Student t test).

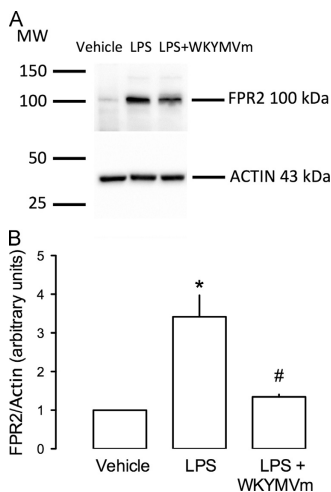


Fig. 2. Effect of LPS on FPR2/ALX expression in mouse thoracic aortas. Mouse aorta rings were exposed or not (vehicle) to LPS (10 μ g/ml) in the presence or absence of WQYMVm (10 μ M) for 10 h and FPR2/ALX expression was analyzed. Panel A: FPR2/ALX representative immunoelectrophoresis. Panel B: densitometry. Bars represent the mean \pm S.E.M., $n=4$. * $P < 0.05$ compared to vehicle; # $P < 0.05$ compared to LPS (one-way ANOVA followed by Bonferroni post-hoc test).

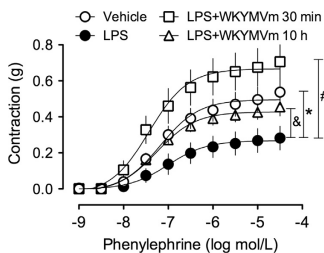


Fig. 3. Effect of WQYMVm on contractions induced by phenylephrine in mouse aorta rings without endothelium. The rings were exposed or not (vehicle; circles) to LPS (10 μ g/ml; filled circles) for 10 h. WQYMVm (10 μ M) was added to organ baths 10 h (triangles) or 30 min (squares) before the evaluation of vessel reactivity to phenylephrine. Each point represents the mean \pm S.E.M., $n=5$. * $P < 0.05$ compared to vehicle; # $P < 0.05$ compared to LPS (two-way ANOVA followed by Bonferroni post-hoc test).

expected, after 10 h of exposure, LPS markedly depressed aorta responsiveness to phenylephrine. When WQYMVm was added to aorta rings concomitantly with LPS and left for the whole incubation time (10 h), the response was significantly different to that with LPS alone. Interestingly, when WQYMVm was added only 30 min before phenylephrine addition, albeit the vasoconstrictor effect was higher than in vehicle-incubated rings, WQYMVm did not change the basal tonus or the responsiveness of control (that is, not exposed to LPS) preparations to phenylephrine (data not shown).

To investigate whether the effect of WQYMVm in recovering the ability of aorta rings to contract would be mediated by FPR2/

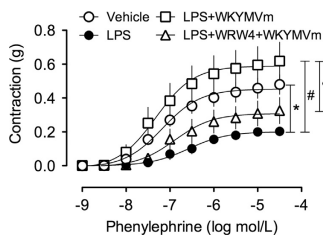


Fig. 4. Effect of WRW4 on contractions induced by phenylephrine in mouse aorta rings without endothelium. The rings were exposed or not (vehicle; circles) to LPS (10 μ g/ml; filled circles) for 10 h. WRW4 (20 μ M; triangles) was added to the organ baths 30 min before the evaluation of reactivity to phenylephrine. Each point represents the mean \pm S.E.M., $n=4-5$. * $P < 0.05$ compared to vehicle; # $P < 0.05$ compared to LPS and & $P < 0.05$ compared to LPS+WQYMVm group (two-way ANOVA followed by Bonferroni post-hoc test).

ALX, rings were pre-treated with WRW4, a FPR2/ALX selective antagonist. As can be seen in Fig. 4, the protective effect of WQYMVm towards the hyporeactivity to phenylephrine was lost in the presence of WRW4. This result indicates that FPR2/ALX activation is required for the protective effect of WQYMVm. WRW4 alone or its vehicle (DMSO) did not change the responsiveness of control preparations to phenylephrine (data not shown).

3.3. WQYMVm restores pneumosepsis-induced hyporeactivity to phenylephrine

The baseline values for MAP of sham (control group) and pneumosepsis bearing animals 24 h after surgery are presented in Fig. 5. Animals inoculated with *K. pneumonia* developed a significant hypotension when compared with sham group (Fig. 5A). The sepsis-induced hypotension was not affected by WQYMVm treatment. Injection of increasing amounts of phenylephrine in septic mice has shown that these animals developed an inability to respond adequately to this stimulus when compared with sham animals (black bars in Fig. 5B). When administered to mice 2 and 14 h after pneumosepsis induction, WQYMVm restored the responsiveness to phenylephrine (stripped bars in Fig. 5B). WQYMVm did not affect phenylephrine response in sham animals (data not shown).

3.4. WQYMVm inhibits LPS-induced NO production in mouse aorta

Rings of thoracic aorta were exposed to LPS and the production of NO was evaluated using a fluorescent probe that detects NO concentrations in the nanomolar range. LPS increased DAF fluorescence and the treatment with WQYMVm completely blocked NO production. For comparison, a selective inhibitor of NOS-2, 1400W, yielded the same result (Fig. 6). WQYMVm alone did not change NO synthesis compared to vehicle group (data not shown).

3.5. WQYMVm treatment decreases NO production in A7r5 cells

Cell activation with LPS/IFN- γ induced the production of large amounts of nitrite, the stable metabolite of NO. When WQYMVm treatment was performed early (4 h) after cell activation with LPS/IFN- γ , a decrease in nitrite accumulation was observed (Fig. 7A). In sharp contrast, when WQYMVm was added late (12 h), no change in nitrite production was observed (Fig. 7B).

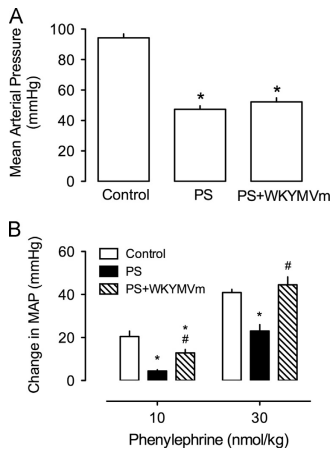


Fig. 5. Effect of WKYMVm on cardiovascular dysfunction in mice inoculated with *K. pneumoniae*. Mice received 10^9 CFU of *K. pneumoniae* intratracheally (PS) and WKYMVm (4 mg/kg) or vehicle (PBS) were injected subcutaneously 2 and 14 h after bacterial inoculation. 24 h after inoculation, mean arterial pressure (Panel A) and phenylephrine response (10 and 30 nmol/kg; i.v.; Panel B) were evaluated. Treated and non-treated sham-operated animals were evaluated at 24 h and because there was no difference among them, they are presented as one group (control). Each bar represents the mean \pm S.E.M., $n=3-5$ per group. * $P < 0.05$ compared to control group and # $P < 0.05$ compared to PS (one-way ANOVA followed by Bonferroni post-hoc test).

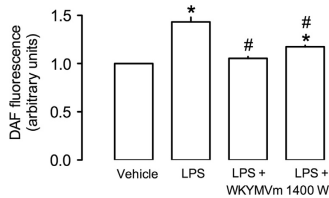


Fig. 6. Effect of WKYMVm on LPS-induced NO production in mouse aorta rings without endothelium. The aorta was exposed or not (vehicle) to LPS (10 μ g/ml) for 10 h. WKYMVm (10 μ M) was added 30 min before NO detection by using DAF-FM DA probe. 1400W (10 μ M) was added 15 min before NO detection. Each bar represents the mean \pm S.E.M., $n=3$. * $P < 0.05$ compared to vehicle; # $P < 0.05$ compared to LPS (one-way ANOVA followed by Bonferroni post-hoc test).

3.6. WKYMVm does not alter NOS-2 expression in mouse aortas

Western blot and densitometry analysis showed that NOS-2 protein levels were barely detectable in control aortas, but increased 10 h after LPS exposure (Fig. 8). Aortas rings incubated with LPS in the presence or absence of WKYMVm expressed NOS-2 in the same levels as tissue incubated with LPS only.

3.7. WKYMVm reduces mortality in animals bearing pneumosepsis

Sepsis-induced pneumonia was performed in mice and their survival was monitored for up to 6 days (Fig. 9). Mortality by pneumosepsis was 60% within 96 h but the treatment with WKYMVm dramatically increased the survival. In sham groups (vehicle and WKYMVm) the survival was 100% (data not shown).

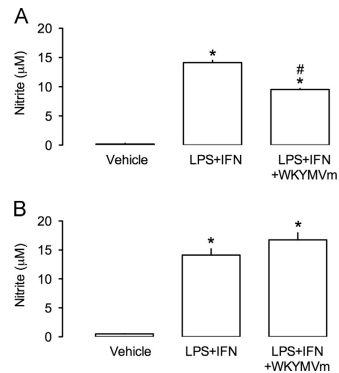


Fig. 7. Effect of WKYMVm on LPS-induced nitrite production in vascular smooth muscle cells. A775 cells were exposed or not (vehicle) to LPS (1 μ g/ml) and IFN- γ (200 U/ml) for 48 h. WKYMVm (1 μ M) was added to cells 4 h (Panel A) or 12 h (Panel B) after LPS/IFN. Nitrite in the supernatant was detected using the Griess reagent. The bars represent the mean \pm S.E.M., $n=3$. * $P < 0.05$ compared to vehicle and # $P < 0.05$ compared to LPS (one-way ANOVA followed by Bonferroni post-hoc test).

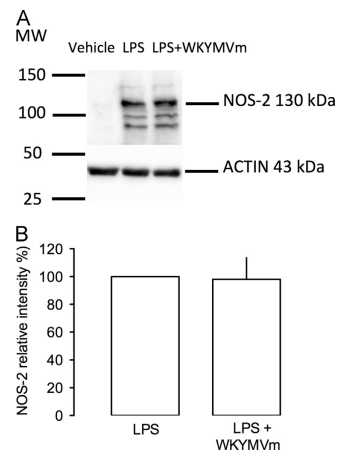


Fig. 8. Effect of WKYMVm on LPS-induced NOS-2 expression in mouse aortas. The aorta was exposed or not (vehicle) to LPS (10 μ g/ml) in the presence or absence of WKYMVm (10 μ M) for 10 h and NOS-2 expression was investigated. Panel A: NOS-2 representative immunoelectrophoresis. Panel B: relative density of NOS-2. Band intensities were quantified by densitometry and are indicated as a percentage change relative to that of the LPS-stimulated group (100%). Bar represent the mean \pm S.E.M., $n=4$.

4. Discussion

The main findings of the present work are as follows: i) LPS increased FPR2/ALX expression in vascular smooth muscle cells but the simultaneous presence of the agonist peptide WKYMVm reduced this LPS effect; ii) WKYMVm reversed the vascular hyporeactivity to

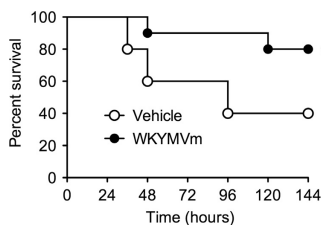


Fig. 9. Treatment with WKYMVm increases survival in an experimental model of pneumosepsis. WKYMVm (4 mg/kg; filled circles) or vehicle (open circles) was injected subcutaneously 2, 14, 26, and 38 h after *K. pneumoniae* intratracheal inoculation (10^9 CFU/mouse) and survival rate was recorded every 24 h. Statistical analysis was performed using log-rank test. * $P < 0.05$, $n = 10$ per group.

phenylephrine in vitro and in vivo; iii) WKYMVm reduced LPS-induced NO production; and iv) animals bearing pneumosepsis and treated with WKYMVm survived substantially more.

Besides its expression in immune cells such as macrophages and neutrophils, FPR2/ALX receptors have been found in epithelial cells, endothelial cells, microglia, salivary glands, cornea, spleen, lung and vascular smooth muscle (Bonnans et al., 2007; Chiang et al., 2006; Levy et al., 2002; Migotte et al., 2006; Nelson et al., 2014; Wilson et al., 2008). In the present report it is shown that FPR2/ALX receptor is constitutively expressed in VSMC and that LPS increased its expression in both the cell line A7r5 and mouse aorta. So far, LPS has been shown to increase FPR2/ALX expression in microglia (Cui et al., 2002) and in microvascular endothelial cells (Mou et al., 2012).

An interesting finding that suggests that FPR2/ALX is biologically active in mouse aorta (and presumably in the rest of the vasculature as well) was the blocking effect caused by the agonist peptide WKYMVm on LPS-induced FPR2/ALX expression. FPR2/ALX is a G protein-coupled receptor and as such, following interaction with agonists, undergoes internalization mediated by clathrin and dynamin-dependent endocytosis, after which it is slowly recycled (Ernst et al., 2004; Huet et al., 2007).

Sepsis is known to induce a profound vascular dysfunction (reviewed in Assreuy (2006)). Previous results from our laboratory showed that there was a substantial increase in lipoxin A_4 levels (a FPR2/ALX agonist) during sepsis (Sordi et al., 2013a) and that pneumosepsis induced hypotension and hyporeactivity to vasoconstrictors (Sordi et al., 2013b). Therefore, having confirmed the presence of FPR2/ALX expression in VSMC and in mouse aorta and its modulation by LPS, we proceeded with functional tests to evaluate the role of FPR2/ALX in the vascular reactivity. Our data show that indeed LPS induced a substantial hyporeactivity to phenylephrine and that the simultaneous presence of WKYMVm during the 10-h incubation partially blocked the LPS effect. Surprisingly, WKYMVm added 30 min before the assay to obtain phenylephrine dose–response curves (and thus 10 h after stimulation with LPS), not only reversed the hyporeactivity to vasoconstrictor but improved phenylephrine contraction. We do not have a clear explanation for these findings but it is possible that the observed decrease in FPR2/ALX receptor expression in the continuous presence of its agonist may be caused by receptor internalization, following its binding to the agonist. If this holds true, it may be that FPR2/ALX seems to be one important component in LPS-induced vascular dysfunction. However, the very potent effect of WKYMVm on reversing LPS-induced hyporeactivity to phenylephrine when added immediately before the contraction experiments suggests that FPR2/ALX is acting in more than one way to counteract LPS-induced hyporeactivity. This set of results suggests

that i) FPR2/ALX is indeed relevant to vascular dysfunction and ii) FPR2/ALX stimulation with agonist can acutely reverse the hyporeactivity to phenylephrine. That the WKYMVm beneficial effect on LPS-induced hyporeactivity was indeed a receptor-mediated event was confirmed by showing that WRW4, a peptide antagonist to FPR2/ALX, fully restored the LPS-induced loss in phenylephrine response. Thus so far, our data show that FPR2/ALX is constitutively expressed in vascular cells and tissue, that LPS increases its expression, that its stimulation with agonist reduces LPS-induced hyporeactivity to phenylephrine and that FPR2/ALX antagonist block this beneficial effect.

Some studies demonstrate that FPR2/ALX activation promotes endothelium-dependent relaxation (Berkestedt et al., 2008; Lefer et al., 1988; von der Weid et al., 2004). Some relevant points may help explain this difference concerning our findings. First, we evaluated the vascular reactivity to vasoconstrictor in endothelium-denuded mouse aortic rings since endothelial cells express FPR2/ALX (Kocuzulla et al., 2003) and we were interested in studying the receptor in the smooth muscle layer. Second, von der Weid et al. (2004) study was conducted using a lipid agonist, lipoxin A_4 , whereas in the present work a peptide agonist was used and it is well known that peptide and lipid agonists have distinct effects on FPR2/ALX (reviewed in Cattaneo et al. (2013)). Lastly and mostly important, in the present report the effect of FPR2/ALX activation on vascular reactivity was evaluated in an inflammatory context.

One important observation was that the protective cardiovascular effect of FPR2/ALX was evident in the whole animal. Although WKYMVm did not change the hypotension of late sepsis, it had a profound impact on the hyporesponsiveness to the vasoconstrictor. Hypotension and hyporesponsiveness to vasoconstrictors are markers of vascular dysfunction in sepsis and septic shock (O'Brien et al., 2007; Fernandes and Assreuy, 2008) and hypotension associated with vascular hyporeactivity is a significant and independent prognostic factor of mortality (Bernardin et al., 1996). Therefore, the protective role of a classical inflammatory receptor in the vascular dysfunction of sepsis may open new avenues for the discovery of alternatives to deal with this important aspect of the disease.

It is very well described and accepted that NO is a crucial element in the cardiovascular dysfunction seen in animals injected with LPS or subjected to sepsis models (reviewed in Fernandes and Assreuy (2008)). Based on the results obtained in the present report, the next logical step was to examine the effect of WKYMVm on NOS-2 expression and NO production. FPR2/ALX activation with the agonist peptide early after A7r5 cell line stimulation (4 h after LPS) reduced nitrite accumulation in culture medium whereas its late addition (12 h after LPS) was without effect. This finding could indicate that FPR2/ALX stimulation was interfering with an early signal for NOS-2 expression. However, WKYMVm failed to block LPS-induced NOS-2 expression in aorta rings. Notwithstanding the fact that FPR2/ALX activation does not inhibit NOS-2 expression, it seems that the enzyme activity is affected. In aorta rings, FPR2/ALX activation reduced NO production, assessed by DAF fluorescence. The inhibitory effect on NOS-2 activity (and presumably on NO production) would explain the “higher than control” phenylephrine contraction seen in Figs. 3 and 4, reminiscent of this effect seen with NOS inhibitors (see for example, Adeagbo and Triggle (1993)). WKYMVm binds to FPR2/ALX with high affinity and triggers several signal transduction pathways (reviewed in Cattaneo et al. (2013)). It remains to be studied by which mechanisms FPR2/ALX activation is interfering with NOS-2 activity.

Cardiovascular dysfunction is an important component to morbidity and mortality in sepsis, as well as the inflammatory response (reviewed in Angus and van der Poll (2013)). The importance of FPR2/ALX in the outcome of sepsis is clearly seen in our last figure. The activation of the receptor has a profound

impact in the mortality in a model of sepsis. Although part of the protective effect may be ascribed to the anti-inflammatory effects consequent to FPR2/ALX stimulation (Kim et al., 2010), the present results provide evidence that the protective role of FPR2/ALX activation in sepsis can be expanded to the cardiovascular system as well. FPR2/ALX activation substantially reduced that vascular dysfunction and improved the survival of animals bearing pneumosepsis. It is conceivable that the linking between the beneficial effect of FPR2/ALX stimulation in both the inflammatory and cardiovascular derangements of sepsis shall be the interference with NOS-2 activity. Although the molecular mechanism by which WKYMVM stimulation of FPR2/ALX inhibits NO production still needs to be elucidated, our data suggest an important role for NO in the WKYMVM beneficial effect observed in LPS injury and pneumosepsis.

5. Conclusion

In conclusion, our data suggest that a receptor primarily described as a mediator of immune responses may have an important role in the vascular dysfunction observed in sepsis and may be a possible target for new therapeutic interventions.

Acknowledgments

This work was funded by Grants from CNPq, Brazil (Grant 474295/2012-5), FAPESC, Brazil (Grant 2014TR1698), and CAPES, Brazil (Grant 110/2007). The skillful technical assistance of Mrs. Adriane Madeira is gratefully acknowledged. We also thank the technicians of Multiuser Laboratory of Biology Studies (LAMEB-UFSC), especially Ms. Bibiana Sgorla de Almeida and Ms. Vanessa Silva da Silva.

References

Adeagbo, A.S., Triggle, C.R., 1993. Interactions of nitric oxide synthase inhibitors and dexamethasone with alpha-adrenoceptor-mediated responses in rat aorta. *Br. J. Pharmacol.* 109, 495–501.

Angus, D.C., van der Poll, T., 2013. Severe sepsis and septic shock. *N. Engl. J. Med.* 369 (9), 840–851. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMr1208623>.

Assreuy, J., 2006. Nitric oxide and cardiovascular dysfunction in sepsis. *Endocr. Metab. Immune Disord. Drug Targets* 6 (2), 165–173.

Bae, Y.S., Yi, H.J., Lee, H.Y., Jo, E.J., Kim, J.L., Lee, T.G., Ye, R.D., Kwak, J.Y., Ryu, S.H., 2003. Differential activation of formyl peptide receptor-like 1 by peptide ligands. *J. Immunol.* 171 (12), 6807–6813.

Berkestedt, I., Nelson, A., Bodellson, M., 2008. Endogenous antimicrobial peptide LL-37 induces human vasodilatation. *Br. J. Anaesth.* 100 (6), 803–809. <http://dx.doi.org/10.1093/bja/aen74>.

Bernardin, G., Pradier, C., Tigger, F., Deloffre, P., Mattei, M., 1996. Blood pressure and arterial lactate level are early indicators of short-term survival in human septic shock. *Intensive Care Med.* 22 (1), 17–25.

Bonnans, C., Gras, D., Chavis, C., Mainprize, B., Vachier, L., Godard, P., Chanez, P., 2007. Synthesis and anti-inflammatory effect of lipoxins in human airway epithelial cells. *Biomed. Pharmacother.* 61 (5), 261–267.

Cattaneo, F., Parisi, M., Ammendola, R., 2013. Distinct signaling cascades elicited by different formyl peptide receptor 2 (FPR2) agonists. *Int. J. Mol. Sci.* 14 (4), 7193–7230. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms14047193>.

Chiang, N., Serhan, C.N., Dahle, S.E., Drazen, J.M., Hay, D.W., Rovati, G.E., Shimizu, T., Yokomizo, T., Brink, C., 2006. The lipoxin receptor ALX: potent ligand-specific and stereoselective actions in vivo. *Pharmacol. Rev.* 58, 463–487.

Cui, Y., Le, Y., Gong, W., Proost, P., Van Damme, J., Murphy, W.J., Wang, J.M., 2002. Bacterial lipopolysaccharide selectively up-regulates the function of the chemotactic peptide receptor formyl peptide receptor 2 in murine microglial cells. *J. Immunol.* 168, 434–442.

da Silva-Santos, J.E., Terluk, M.R., Assreuy, J., 2002. Differential involvement of guanylate cyclase and potassium channels in nitric oxide-induced hyporesponsiveness to phenylephrine in endotoxemic rats. *Shock* 17 (1), 70–76.

Ernst, S., Lange, C., Wilbers, A., Goebeler, V., Gerke, V., Rescher, U., 2004. An annexin 1-N-terminal peptide activates leukocytes by triggering different members of the formyl peptide receptor family. *J. Immunol.* 172, 7669–7676.

Fernandes, D., Assreuy, J., 2008. Nitric oxide and vascular reactivity in sepsis. *Shock* 30 (Suppl 1), S10–S13. <http://dx.doi.org/10.1097/SHK.0b013e3181818518>.

He, R., Sang, H., Ye, R.D., 2003. Serum amyloid A induces IL-8 secretion through a G protein-coupled receptor. *FPLR1/LXA4R*. *Blood* 101, 1572–1581.

Hollenberg, S.M., Ahrens, T.S., Annane, D., Astiz, M.E., Chalfin, D.B., Dasta, J.F., Heard, S.O., Martin, C., Napolitano, L.M., Susla, G.M., Totaro, R., Vincent, J.L., Zanotti-Cavazzoni, S., 2004. Practice parameters for hemodynamic support of sepsis in adult patients: 2004 update. *Crit. Care Med.* 32 (9), 1928–1948.

Huet, E., Boulay, F., Barral, S., Rabiet, M.J., 2007. The role of beta-arrestins in the formyl peptide receptor-like 1 internalization and signaling. *Cell. Signal.* 19, 1939–1948.

Kim, S.D., Kim, Y.K., Lee, H.Y., Kim, Y.S., Jeon, S.G., Baek, S.H., Song, D.K., Ryu, S.H., Bae, Y.S., 2010. The agonists of formyl peptide receptors prevent development of severe sepsis after microbial infection. *J. Immunol.* 185 (7), 4302–4310. <http://dx.doi.org/10.1049/jimm.2010.1001310>.

Kocuzula, R., von Degenfeld, G., Kupatt, C., Krötz, F., Zahler, S., Gloe, T., Issbrücker, K., Unterberger, P., Zaiou, M., Leberher, C., et al., 2003. An angiogenic role for the human peptide antibiotic LL-37/hCAP-18. *J. Clin. Invest.* 111 (11), 1665–1672.

Lefler, A.M., Stahl, G.L., Lefler, D.J., Brezinski, M.E., Nicolau, K.C., Veale, C.A., Abe, Y., Smith, J.B., 1988. Lipoxins A4 and B4: comparison of eicosanoids having bronchoconstrictor and vasodilator actions but lacking platelet aggregatory activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 8340–8344.

Ley, B.D., De Sanctis, G.T., Devchand, P.R., Kim, E., Ackerman, K., Schmidt, B.A., Szczeklik, W., Drazen, J.M., Serhan, C.N., 2002. Multi-pronged inhibition of airway hyperresponsiveness and inflammation by lipoxin A4. *Nat. Med.* 8 (9), 1018–1023.

Migeotte, I., Communi, D., Parmentier, M., 2006. Formyl peptide receptors: a promiscuous subfamily of G protein-coupled receptors controlling immune responses. *Cytokine Growth Factor Rev.* 17 (6), 501–519.

Mou, H., Li, Z., Kong, Y., Deng, B., Qian, L., Wang, J.M., Le, Y., 2012. Proinflammatory stimulants promote the expression of a promiscuous G protein-coupled receptor, mFPR2, in microvascular endothelial cells. *Inflammation* 35 (2), 656–664. <http://dx.doi.org/10.1007/s10753-011-9358-9>.

Nanamori, M., Cheng, X.Y., Mei, J.H., Sang, H.R., Xuan, Y.X., Zhou, C.H., et al., 2004. A novel nonpeptide ligand for formyl peptide receptor-like 1. *Mol. Pharmacol.* 66, 1213–1222.

Nelson, J.W., Leigh, N.J., Mella, R.E., McCall, A.D., Aguirre, A., Baker, O.J., 2014. ALX/FPR2 receptor for RvD1 is expressed and functional in salivary glands. *Int. J. Ophthalmol.* 7 (2), 187–193. <http://dx.doi.org/10.1155/ajppcl.00284.2013>.

O'Brien Jr., J.M., Ali, N.A., Abereeg, S.K., Abraham, E., 2007. Sepsis. *Am. J. Med.* 120, 1012–1022.

Parrillo, J.E., 1993. Pathogenetic mechanisms of septic shock. *Engl. J. Med.* 328, 1471–1477.

Rees, D.D., Celtek, S., Palmer, R.M., Moncada, S., 1990. Dexamethasone prevents the induction by endotoxin of a nitric oxide synthase and the associated effects on vascular tone: an insight into endotoxin shock. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 173, 541–547.

Sordi, R., Menezes-de-Lima Jr., O., Horewicz, V., Scheschowitsch, K., Santos, L.F., Assreuy, J., 2013a. Dual role of lipoxin A4 in pneumosepsis pathogenesis. *Int. Immunopharmacol.* 17 (2), 283–292. <http://dx.doi.org/10.1016/j.intimp.2013.06.010>.

Sordi, R., Menezes-de-Lima, O., Della-Justina, A.M., Rezende, E., Assreuy, J., 2013b. Pneumonia-induced sepsis in mice: temporal study of inflammatory and cardiovascular parameters. *Int. J. Exp. Pathol.* 94 (2), 144–155. <http://dx.doi.org/10.1111/ijep.12016>.

von der Weid, P.Y., Hollenberg, M.D., Fiorucci, S., Wallace, J.L., 2004. Aspirin-triggered, cyclooxygenase-2-dependent lipoxin synthesis modulates vascular tone. *Circulation* 110 (10), 1320–1325.

Wilson, P.G., Thompson, J.C., Webb, N.R., de Beer, F.C., King, V.L., Tancock, L.R., 2008. Serum amyloid A, but not C-reactive protein, stimulates vascular proteoglycan synthesis in a pro-atherogenic manner. *Am. J. Pathol.* 173, 1902–1910. <http://dx.doi.org/10.2353/ajpath.2008.080201>.

3 DISCUSSÃO

Devido aos estudos clássicos que demonstraram que o grupamento N-formil presente em bactérias e mitocôndrias é, em grande parte, responsável pela quimiotaxia de fagócitos (HARRIS, 1954), a imensa maioria dos estudos científicos sobre a família de receptores FPR abordam a sua atividade modulatória sobre o tráfego leucocitário para os sítios de infecção ou dano tecidual. Entretanto, nos últimos 15 anos, dados de vários grupos de pesquisa indicam que esses receptores possam operar em outros sistemas além do imunológico. Além de serem expressos em células do sistema imune como macrófagos e neutrófilos, os receptores FPR2/ALX já foram descritos em células epiteliais, endoteliais (BONNANS et al., 2007), células da microglia (CHIANG et al., 2006;), de glândulas salivares (NELSON et al., 2014), córneas, baço (MIGEOTTE et al., 2006), músculo liso vascular (WILSON et al., 2008) e pulmão (LEVY et al., 2002), sugerindo que esse receptor possa ter funções mais complexas do que as atualmente reconhecidas. Sendo assim, a proposta do nosso estudo foi justamente investigar outras possíveis funções do receptor FPR2/ALX, tendo como foco a seps e suas alterações vasculares.

Começamos nosso estudo verificando a expressão do receptor FPR2/ALX nas células do músculo liso vascular (CMLV) de aortas. Encontramos o receptor expresso constitutivamente tanto nas células da linhagem A7r5 (células do músculo liso de aorta de ratos), quanto na aorta torácica de camundongos. Observamos também, que o estímulo com LPS aumenta significativamente a expressão do receptor nesse tipo celular. Foi demonstrado que a expressão do FPR2/ALX pode ser aumentada pelo LPS na microglia (CUI et al., 2002) e em células do endotélio microvascular (MOU et al., 2012). O LPS induz a expressão do FPR2/ALX através das vias de sinalização mediadas, principalmente, por JNK e NF- κ B (MOU et al., 2012). Nossos resultados sugerem que este mecanismo é válido também para as CMLV, embora não tenhamos estudado se a via de aumento da expressão do FPR2/ALX induzida pelo LPS é idêntica à das células endoteliais ou da microglia.

De maneira interessante, as células de cultura primária da microglia apresentam altos níveis de expressão do FPR2/ALX, entretanto, o estímulo com LPS é necessário para que o receptor se torne funcionalmente ativo em resposta aos agonistas (CUI et al., 2002). O LPS parece regular a função do FPR2/ALX de duas maneiras: promovendo a transcrição do gene e síntese da proteína, ou seja, aumentando a expressão do receptor e, como segundo mecanismo,

sensibilizando os receptores de expressão constitutiva (CUI et al., 2002). É possível que a sensibilização de receptores constitutivos também seja válida para as CMLV porque, como será discutido adiante, nenhum dos ensaios realizados (seja na dosagem de nitrito ou na reatividade vascular) mostrou resposta mediada pelo FPR2/ALX na ausência do LPS. No entanto, mais estudos serão necessários para comprovar esta possibilidade.

Em contrapartida, a ativação do FPR2/ALX também parece regular o efeito do LPS. O aumento da expressão do FPR2/ALX induzido pelo LPS foi reduzido pelo tratamento com o peptídeo WKYMVm, um agonista seletivo do FPR2/ALX. Este dado é importante porque mostra que o receptor está biologicamente ativo nas células do músculo liso vascular e, mais ainda, que curiosamente o processo de aumento da expressão do FPR2/ALX induzido pelo LPS parece envolver a atividade do FPR2/ALX constitutivo. Foi demonstrado que o WKYMVm inibe a maturação induzida por LPS de células dendríticas derivadas de monócitos humanos, presumivelmente por uma interferência nas vias de sinalização ativadas pelo TLR-4 (KANG et al., 2005). Considerando que as CMLV expressam TLR-4 funcional (HEO et al., 2008), é possível que a ativação do FPR2/ALX constitutivo regule negativamente a expressão do FPR2/ALX induzida pela ativação do TLR-4.

Uma outra explicação e talvez a mais plausível para a redução da expressão do FPR2/ALX causada pelo WKYMVm, está relacionada ao mecanismo clássico da ativação de receptores acoplados à proteína G. O FPR2/ALX é um GPCR, portanto, após a interação com agonistas, sofre internalização mediada por clatrina e endocitose dependente de dinamina, e é reciclado (ERNST et al., 2004; HUET et al., 2007). Em um estudo que mostrou a dinâmica do processo de tráfego intracelular do FPR2/ALX após estimulação com a LXA₄, foi observado que, em 5 minutos, o receptor sofre completa internalização e, 120 minutos após a ativação, a expressão do receptor na membrana celular retorna aos seus níveis basais (MADERNA et al., 2010). Não sabemos o tempo de turnover do FPR2/ALX nas CMLV e, principalmente, após o estímulo com o agonista peptídico WKYMVm, mas se a argumentação acima for válida, fica mais fácil entender o efeito da redução da expressão do receptor. A presença do agonista exógeno levaria à um aumento do processo de reciclagem do receptor, efetivamente diminuindo a densidade de receptores na membrana celular. Infelizmente, não pudemos analisar a eventual variação da densidade de receptores na membrana e sua internalização devido ao fato dos anticorpos

disponíveis só reconhecerem uma região interna do receptor, necessitando de permeabilização das células (Figura suplementar 1).

Confirmada a expressão do FPR2/ALX na A7r5 e na aorta, bem como a sua modulação pelo LPS, partimos para os ensaios funcionais de reatividade vascular. Para tanto, utilizamos um protocolo experimental *in vitro* em aortas torácicas que reproduz a hiporresponsividade a vasoconstritores observada *in vivo* (SILVA-SANTOS et al., 2002). Conforme o esperado, a exposição dos anéis de aorta ao LPS causou hiporreatividade à fenilefrina. Surpreendentemente, o tratamento dos anéis de aorta com o WKYMVm reverteu a hiporreatividade ao vasoconstritor causada pelo LPS. No primeiro momento, justificar este efeito com a hipótese de que a ativação do FPR2/ALX pudesse estar regulando negativamente a ação do LPS, nos pareceu muito certo. Sabemos que um dos mecanismos pelo qual o LPS induz a hiporreatividade vascular envolve a ativação do fator de transcrição NF- κ B e consequente aumento na expressão da NOS-2. Entretanto, a expressão da NOS-2 não foi alterada pela incubação da aorta com o WKYMVm, como será discutido adiante. Por outro lado, a possibilidade do LPS estar sensibilizando o FPR2/ALX nas CMLV e tornando o receptor mais sensível à ação do peptídeo, continua sendo uma explicação razoável. Essa condição poderia explicar por quê o tratamento com o WKYMVm 30 minutos antes da curva de contração com fenilefrina parece ser mais eficiente do que a incubação do peptídeo concomitantemente ao LPS. Entretanto, uma reestimulação com o peptídeo deveria ter sido feita na aorta que foi incubada com o LPS e o WKYMVm por 10 horas para responder essa questão.

A incubação das aortas com o peptídeo antagonista WRW4, considerado o mais seletivo para o FPR2/ALX (STENFELDT et al., 2007; YE et al., 2009), previamente ao tratamento com o WKYMVm, bloqueou o efeito original do agonista, o de reverter a hiporreatividade causada pelo LPS. Esse resultado confirma e estende os achados da literatura de que o efeito do WKYMVm é mediado pelo FPR2/ALX.

Diferente dos nossos resultados, alguns estudos mostraram que a ativação do FPR2/ALX é capaz de promover relaxamento dependente de endotélio, tendo um importante papel na modulação do tônus vascular (LEFER et al., 1988; VON DER WEID et al., 2004; BERKESTEDT et al., 2008). Entretanto, existem pontos relevantes que podem explicar as discrepâncias em relação ao nosso estudo e que merecem uma discussão mais aprofundada.

Em primeiro lugar, nós avaliamos a reatividade ao vasoconstritor em anéis de aortas sem endotélio, visto que as células endoteliais

também expressam o FPR2/ALX (KOCZULLA et al., 2003), e nosso interesse foi estudar o receptor na camada de músculo liso. Ademais, sabe-se que o endotélio acelera a hiporreatividade vascular induzida pelo LPS (JULOU-SCHAEFFER et al., 1990, NAKAKI et al., 1992; FLEMING et al., 1993), porém, anéis desnudos de endotélio também apresentam hiporreatividade após exposição ao LPS, tendo como principal mecanismo a produção de NO (CENA et al., 2008). Além da camada endotelial, a aorta é formada pela camada de células de músculo liso (túnica média) e por uma camada de tecido conjuntivo (túnica adventícia) (TILKI et al., 2009). Entretanto, não encontramos relatos na literatura sobre a expressão de FPR2/ALX em fibroblastos da túnica adventícia de aortas, dessa forma, não podemos descartar essa possibilidade, uma vez que fibroblastos pulmonares expressam FPR2/ALX e respondem ao estímulo com LXA₄ (WU et al., 2006), AnxA1 (JIA et al., 2013) e WKYMVm (IACCIO et al., 2007).

O segundo ponto importante está relacionado ao agonista estudado. Von der weid e colaboradores (2004) conduziram o estudo utilizando o agonista lipídico, LXA₄, enquanto nós avaliamos o agonista peptídico WKYMVm. Com base no mesmo protocolo experimental desse estudo, avaliamos o efeito do WKYMVm em anéis de aorta com endotélio pré-contraídos com fenilefrina. O estímulo com acetilcolina induziu um significativo relaxamento, contudo, o relaxamento não foi observado quando o WKYMVm foi aplicado aos anéis (Figura suplementar 2). Vários estudos demonstraram que agonistas peptídicos e lipídicos podem ter efeitos distintos na ativação do FPR2/ALX (revisado em CATTANEO et al., 2013). Outrossim, a LXA₄ não é um agonista seletivo do FPR2/ALX, podendo exercer seus efeitos através da ligação ao receptor de aril-hidrocarboneto (MACHADO et al., 2006).

Outro ponto relevante concerne ao fato de que muitas das ações dos agonistas são dependentes da concentração. Berkestdt e colaboradores (2008) induziram relaxamento em segmentos de veia omental humana usando o WKYMVm na faixa nanomolar de concentração. Eles também testaram a reatividade vascular de segmentos arteriais, entretanto, falharam em demonstrar a ativação do FPR2/ALX e justificaram com uma possível falta de expressão do receptor na artéria omental humana. No presente estudo, o efeito benéfico do WKYMVm na hiporreatividade vascular foi alcançado utilizando-se o peptídeo na faixa micromolar de concentração (Figura suplementar 3). Estudos *in vitro* com concentrações do peptídeo variando de 0,1 a 10 µM mostraram distintas eficácias na ativação do

receptor (LE et al., 1999; CHRISTOPHE et al., 2001; BAE et al., 2003; HE et al., 2013).

Por último e mais pertinente, é necessário salientar que o efeito da ativação do FPR2/ALX na reatividade vascular foi avaliado em um contexto inflamatório. É de extrema importância que essas diferenças sejam lembradas e levadas em consideração tanto para o desenho experimental quanto para a interpretação dos resultados.

Já é conhecido de longa data que o NO está diretamente relacionado com a hipotensão e hiporreatividade aos agentes vasoativos durante a sepse e choque séptico (MONCADA et al., 1991; ASSREUY, 2006; FERNANDES e ASSREUY, 2008) e a diminuição dos níveis de NO está associada com a melhora clínica de animais sépticos (KILBOURN et al., 1990; SZABO et al., 1993; FERNANDES et al., 2006; SORDI et al., 2011). O NO encontra-se entre os mediadores locais liberados no ambiente onde a célula do músculo liso está inserida, sendo considerado um importante regulador fisiológico do relaxamento do músculo liso vascular e não-vascular. Adicionalmente, foi demonstrado que as CMLV não apenas respondem ao NO como também são capazes de produzi-lo (BUSSE et al., 1990; SCHINI et al., 1991). A partir dos dados obtidos nos ensaios funcionais de reatividade vascular *in vitro*, nosso próximo passo foi avaliar o efeito do WKYMVm na produção de NO.

A expressão da NOS-2 pode ser induzida em vários tipos celulares e por uma variedade de estímulos inflamatórios. De acordo com a revisão escrita por Ginnan e colaboradores (2008), a enzima NOS-2 de células do músculo liso de ratos necessita da ocupação de pelo menos 60% da sua região promotora para obter a máxima ativação da enzima, como ocorre em resposta ao conjunto de estímulos: LPS, IFN- γ , TNF- α e IL-1 β (também chamado de Cytomix). No presente trabalho, utilizamos as células da linhagem A7r5 e pelo fato destas células não serem ativadas apenas com LPS, utilizamos a combinação de LPS (1 μ g/mL) e IFN- γ (200 U/mL) que se mostrou eficaz na ativação dessas células (SCHESCHOWITSCH, 2011). Resultados prévios do nosso laboratório mostraram que nas células A7r5 a translocação do NF- κ B aumenta rapidamente após a estimulação com LPS/IFN e retorna aos níveis basais 4 horas após a ativação (SCHESCHOWITSCH, 2011). Sendo assim, optamos por realizar o tratamento com o peptídeo nos tempos de 4 h e 12 h após o estímulo com o LPS/IFN para descartar a possibilidade do WKYMVm interferir na ativação do NF- κ B. Vários trabalhos relataram a indução de NF- κ B após a ativação do FPR2/ALX com diferentes agonistas (revisado em

CATTANEO et al., 2013). A concentração do peptídeo foi determinada com uma curva de concentração-resposta (Figura suplementar 4). A ativação do FPR2/ALX com o WKYMVm (1 μ M), poucas horas após o estímulo das células A7r5 (4 h pós LPS), reduziu o acúmulo de nitrito no sobrenadante da cultura, enquanto a adição tardia (12 h pós LPS) não apresentou efeito. Adicionalmente, o efeito do WKYMVm sobre a produção de NO nas células A7r5 estimuladas com LPS/IFN foi bloqueado pela pré-incubação com o antagonista WRW4, confirmando os dados obtidos nos ensaios funcionais de reatividade de que a ação do WKYMVm é mediada pelo FPR2/ALX (Figura suplementar 5). Intrigantemente, como poderia o WKYMVm reverter a hiporreatividade à fenilefrina nos anéis de aorta após 10 horas de estímulo com LPS, sem interferir na produção de NO? Considerando que a reação de Griess é um método indireto de detecção de NO, na qual quantidade de nitrito, que representa um produto final estável do NO, é mensurada no meio de cultura, optamos por avaliar a produção de NO intracelular na aorta utilizando uma sonda específica, o DAF-FM. Dessa forma, as aortas foram estimuladas *in vitro* com LPS por 10 horas e então tratadas com WKYMVm. Conforme o esperado, a ativação do FPR2/ALX causou redução na quantidade de NO que foi detectada através da fluorescência da sonda DAF. Esse resultado sugeriu a possibilidade de uma interferência da ativação do FPR2/ALX na indução da expressão da NOS-2. Assim, avaliamos a expressão da NOS-2 em aortas estimuladas com LPS e WKYMVm juntos. Ao contrário do que prevíamos, o WKYMVm falhou em bloquear a expressão da NOS-2 induzida por LPS na aorta. Um trabalho publicado em 1999 no *British Journal of Pharmacology* (MINGHETTI et al., 1999) mostrou uma diminuição da expressão da NOS-2 e da produção de NO em cultura de células da microglia estimuladas com LPS após o estímulo com o peptídeo Ac2-26, que também é um agonista FPR2/ALX. Entretanto, a concentração do Ac2-26 utilizada nos ensaios foi 10 vezes maior do que a utilizada em nossos experimentos. Como mencionado na Introdução do presente trabalho, a ativação dos receptores FPR depende do tipo e da concentração de ligante, do tipo de ligação, e dependendo das circunstâncias, pode resultar em efeitos inibitórios ou estimulatórios (MIGEOTTE et al., 2006).

Uma das propriedades mais descritas do WKYMVm é a sua capacidade de induzir a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), como o ânion superóxido (O_2^-) (revisado por CATTANEO et al., 2013). Embora não tenhamos avaliado o efeito da ativação do FPR2/ALX na produção de EROs, a redução do NO pode ter ocorrido

devido a formação de peroxinitrito (ONOO^-) (formado pela reação do NO com ânion superóxido quando quantidades estequiométricas destas espécies são geradas). O ONOO^- é uma molécula com potente ação oxidante e nitrante, indutora da peroxidação lipídica, hidroxilação e oxidação de proteínas (PACHER et al., 2007; SZABÓ et al., 2007; LIAUDET et al., 2009). Alguns trabalhos relataram a capacidade do ONOO^- em prejudicar a contratilidade vascular (OKAMOTO et al., 2001; TAKAKURA et al., 2002; CENA et al., 2010), entretanto, os nossos dados mostram que o tratamento com WKYVM tem um efeito protetor na função do vaso. Se a formação de ONOO^- está sendo induzida pelo tratamento com o WKYVM, a sua quantidade não está sendo suficiente para prejudicar a reatividade das aortas mas, ao mesmo tempo, pode estar refletindo na quantidade de NO que está sendo encontrada. Um ensaio utilizando sondas fluorescentes específicas para essas espécies reativas de oxigênio e nitrogênio poderia ajudar a responder à essas questões.

Por uma outra perspectiva, poderíamos sugerir que a ativação do FPR2/ALX está diminuindo a atividade da enzima NOS-2 fazendo-a produzir menos NO. A atividade das NOS é regulada por mecanismos diversos. A fosforilação do resíduo de serina (Ser1179) da NOS-3 pela proteína Akt resulta no aumento da produção de NO, enquanto a fosforilação da Ser847 da NOS-1 por proteínas quinases dependentes de calmodulina diminui a atividade desta enzima. O próprio NO, quando produzido em quantidades elevadas, atua inibindo sua produção, mecanismo conhecido por retroalimentação negativa (ASSREUY et al., 1993). A interação com outras proteínas também exerce regulação da atividade das NOS. A atividade das enzimas constitutivas pode ser aumentada pela interação com proteínas de choque térmico 90 (hsp90), que atua como um modulador alostérico. No sistema nervoso central, a interação da NOS-2 com a proteína calirina parece impedir a dimerização da NOS-2, resultando em uma ação neuroprotetora durante a inflamação. A interação da NOS-1 com a proteína inibidora de NOS (PIN) e a interação da NOS-3 com resíduos de glicina miristoilados e de cisteína palmitoilados na membrana plasmática, também regulam a atividade destas enzimas (ALDERTON et al., 2001). Nossos resultados não permitem afirmar qual ou quais poderiam ser os mecanismos deflagradores da diminuição da atividade da NOS-2 observada após o tratamento com o WKYVM mas, tendo em vista os relatos da capacidade desse peptídeo em induzir a fosforilação de diversas proteínas intracelulares (revisado por CATTANEO et al., 2013), não podemos descartar esta possibilidade. Ensaios mais específicos que

avaliem a atividade da enzima como, por exemplo, pelo método da L-citrulina, além de outros estudos incluindo dimerização da proteína, fosforilação de sítios da proteína, ligações de cofatores, além da biodisponibilidade de O₂ e da L-arginina na presença de diferentes agonistas do FPR2/ALX, podem contribuir para elucidar se a ativação deste receptor está interferindo com a atividade da NOS-2 e quais são os mecanismos envolvidos.

O NO é um dos mais importantes mediadores da sepse e está envolvido em praticamente todas as respostas do hospedeiro frente à infecção, como inflamação, disfunção cardiovascular, aumento da permeabilidade vascular, migração e ativação de leucócitos, além de ter ação microbicida (MONCADA et al., 1991; BENJAMIM et al., 2000; ASSREUY, 2006; FERNANDES e ASSREUY, 2008). Não resta dúvida que a produção excessiva de NO durante a sepse contribui para a disfunção vascular, que é considerada uma das principais alterações hemodinâmicas que ocorrem durante a sepse, e manifesta-se na incapacidade dos vasos responderem a estímulos vasoconstritores e vasodilatadores. A hiporreatividade vascular é progressiva, e pacientes sépticos necessitam normalmente da infusão de grandes doses de agentes vasopressores para manutenção de níveis pressóricos adequados (LEONE e MARTIN, 2008).

Neste contexto, e com base nos achados dos experimentos *in vitro*, avaliamos o efeito cardiovascular (componente vascular, mais precisamente) da ativação do FPR2/ALX nos animais sépticos. Após a indução da sepse, os animais receberam duas doses do WKYVM antes da avaliação da pressão arterial. Os tempos de administração foram baseados em dados da literatura (KIM et al., 2010), considerando que esse peptídeo apresenta meia-vida curta quando administrado *in vivo* (PARK et al., 2014). Embora o WKYVM não tenha alterado a hipotensão tardia da sepse, ele foi capaz de reverter uma parcela da hiporreatividade à fenilefrina que ocorre na sepse. Este resultado é inédito e muito importante porque sugere fortemente que a ativação do FPR2/ALX com o peptídeo agonista WKYVM confere um efeito cardiovascular protetor na sepse. A presença da disfunção cardiovascular na sepse está associada a um aumento significativo no índice de mortalidade, que neste caso é de 70-90% quando comparado ao índice de mortalidade de pacientes sépticos sem alterações nesse sistema, que é de aproximadamente 20% (PARRILLO et al., 1990).

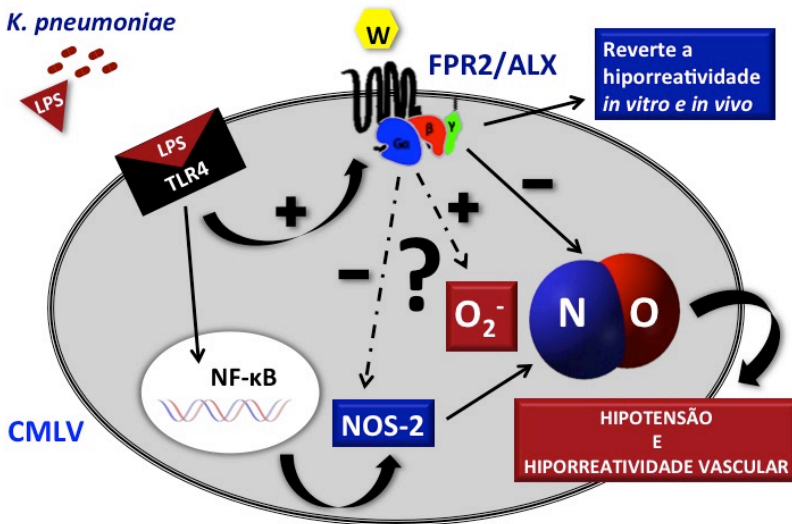
O possível efeito cardiovascular protetor da ativação do FPR2/ALX com o peptídeo WKYVM foi ainda mais evidente quando avaliamos a sobrevivência dos animais sépticos tratados. No presente

estudo, demonstramos que o tratamento com o WKYMVm reduziu drasticamente a taxa de mortalidade dos animais com pneumosepse (aumentou a sobrevivência em 40%). Um estudo anterior demonstrou que a administração do WKYMVm induz atividade terapêutica efetiva contra a sepse polimicrobiana, reduzindo a mortalidade a 30% através de mecanismos como o aumento da atividade bactericida (pela produção de espécies reativas de oxigênio) e controle da inflamação exacerbada (aumento da produção das citocinas IFN- γ , IL-12, IL-17 e TGF- β e inibição das citocinas TNF- α e IL-1 β) (KIM et al., 2010). Diferentes estudos no modelo de CLP mostraram que o tratamento dos animais com LXA₄ (WALKER et al., 2011), RvD1 (CHEN et al., 2014) ou RvD2 (SPITE et al., 2009), que são agonistas endógenos do FPR2/ALX, também conferem proteção na sepse por reduzir a inflamação. O papel crucial do FPR2/ALX em funções essenciais da resposta imune na sepse polimicrobiana foi demonstrado em animais FPR2/ALX deficientes (GOBBETTI et al., 2014). Um estudo prévio do nosso laboratório mostrou que a ativação do FPR2/ALX com LXA₄ em momentos tardios da sepse induzida por pneumonia, apresenta efeitos benéficos devido à diminuição da resposta inflamatória excessiva (SORDI et al., 2013a).

Sendo o FPR2/ALX um membro da família de receptores de peptídeos formilados, conhecidos pela importância na defesa do hospedeiro e na inflamação, é razoável que a maioria dos estudos avalie o efeito da sua ativação no componente inflamatório da sepse. A originalidade do presente trabalho está na demonstração de que a ativação do FPR2/ALX com o peptídeo WKYMVm na sepse apresenta um importante efeito protetor no componente vascular, crucial para a gravidade do quadro, tendo em mente que a disfunção cardiovascular é determinante do prognóstico na sepse. Apenas um trabalho na literatura mostrou que o controle da resposta imune alcançado com a ativação do FPR2/ALX na sepse foi acompanhado de uma significativa atenuação do dano na contratilidade miocárdica sistólica. Os autores sugeriram que este efeito poderia ser consequência indireta da redução da inflamação ou uma ação protetora direta no miocárdio, preservando sua função contrátil. Foi relatado também um aumento da expressão de RNA mensageiro dos receptores Fpr1 e Fpr2 no coração, porém esse achado não foi explorado (GOBBETTI et al., 2014). Essa informação reforça a nossa hipótese de que o FPR2/ALX está envolvido nas alterações cardiovasculares observadas na sepse.

O esquema 1 ilustra os principais achados do presente trabalho e aponta alguns possíveis desdobramentos. Uma limitação neste trabalho é que não exploramos os mecanismos pelos quais o WKYMVm exerce

seus efeitos protetores vasculares na sepse. Entretanto, os resultados aqui relatados podem contribuir para a compreensão acerca de como a modulação do FPR2/ALX pode influenciar as alterações na fisiologia cardiovascular durante a sepse e de que forma tais eventos também contribuem para a melhora da disfunção vascular e consequentemente da sobrevivência. Esses achados podem contribuir para o desenvolvimento de terapias inovadoras na sepse, ou até mesmo para a implementação de estratégias que visem interromper a sequência de eventos que levam à hiporresponsividade e morte durante esse processo inflamatório generalizado.



Esquema 1. Envolvimento do FPR2/ALX nas alterações vasculares induzidas por LPS e sepse. As células do músculo liso vascular (CMLV) também respondem à estímulos inflamatórios como o LPS que está presente na parede de bactérias Gram negativas como a *K. pneumoniae*. O reconhecimento do LPS por receptores como o TLR-4 induz a translocação nuclear do NF-κB e consequente expressão de NOS-2 e produção de grandes quantidades de NO que são responsáveis, em parte, pela hipotensão e hiporreatividade vascular observada na sepse. A ativação do receptor FPR2/ALX com o peptídeo agonista WKYMVm (W) diminui as quantidades de NO e reverte a hiporreatividade à fenilefrina *in vitro* e *in vivo*, entretanto, os mecanismos moleculares envolvidos ainda precisam ser elucidados. Há relatos na literatura de que a ativação do FPR2/ALX com diferentes agonistas induz a produção de ânion superóxido (O₂⁻). Embora não tenhamos avaliado o efeito da ativação do FPR2/ALX sobre

a produção de espécies reativas de oxigênio, a redução do NO pode ter ocorrido devido a interação com o ânion superóxido. Por outra perspectiva, poderíamos sugerir que a ativação do FPR2/ALX está diminuindo a atividade da NOS-2, fazendo ela produzir menos NO e, dessa forma, refletindo na menor quantidade de NO que foi encontrada em nossos experimentos. Assim, podemos sugerir alguns desdobramentos deste trabalho: 1) avaliar o efeito da ativação e/ou bloqueio do receptor na produção de espécies reativas de oxigênio; 2) avaliar o efeito da ativação do FPR2/ALX na atividade da enzima NOS-2; 3) avaliar alguns efeitos pró- e anti-inflamatórios da estimulação e/ou bloqueio do FPR2/ALX para verificação de congruência temporal com os efeitos (cardio)vasculares e 4) avaliar a função cardíaca no modelo de sepse induzida por pneumonia e os efeitos decorrentes da estimulação e/ou bloqueio do FPR2/ALX.

4 CONCLUSÃO

A principal contribuição do nosso trabalho é a demonstração de que o peptídeo WKYMVm, agonista seletivo do receptor FPR2/ALX, reverte a hiporreatividade vascular a fenilefrina tanto *in vitro* (causada pelo LPS) quanto *in vivo* (causada pela pneumosepse) e que os animais sépticos tratados com esse peptídeo sobrevivem substancialmente mais. Os resultados *in vitro* mostram que a ativação do FPR2/ALX pelo WKYMVm diminui a produção de NO em células de músculo liso vascular e em aortas estimuladas com LPS, mas esse efeito não parece envolver a regulação da expressão da enzima óxido nítrico sintase-2. Dessa forma, mais estudos são necessários para elucidar os mecanismos moleculares pelos quais a via WKYMVm-FPR2/ALX exerce seus efeitos benéficos na sepse.

Assim, nossos dados sugerem que um receptor, primariamente descrito como mediador de respostas imunológicas, pode ter um papel relevante na disfunção vascular observada na sepse, sendo um possível alvo para novas intervenções terapêuticas.

REFERÊNCIAS

ABRAHAM, E.; SINGER, M. Mechanisms of sepsis-induced organ dysfunction. **Crit. Care Med.** 35: p. 2408-16. 2007.

ADHIKARI, N.K. et al. Critical care and the global burden of critical illness in adults. **Lancet.** 376(9749): p. 1339-46. 2010.

AKTAN, F. iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation. **Life Sci.** 25; 75(6): p. 639-53. 2004.

ALBERTI, C. et al. Epidemiology of sepsis and infection in ICU patients from an international multicentre cohort study. **Int. Care Med.** 28(2): p. 108-21. 2002.

ALDERTON, W.K.; COOPER, C.E.; KNOWLES, R.G. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. **Biochem. J.** 357: p. 593-615. 2001.

ANGUS, D.C. et al. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care sepsis. **Crit. Care Med.** 29: 1303-1310. 2001.

ANGUS, D.C.; CARLET, J. Surviving intensive care: a report from the 2002 Brussels Roundtable. **Intensive Care Med.** 29(3): p. 368-77. 2003.

ANGUS, D.C.; WAX, R.S. Epidemiology of sepsis: an update. **Crit. Care Med.** 29(7 Suppl): p. S109-16. 2001.

ANGUS, D.C.; VAN DER POLL, T. Severe sepsis and septic shock. **N. Engl. J. Med.** 369(9): p. 840-51. 2013

ANGUS, D.C. et al. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. **Crit. Care Med.** 29(7): p. 1303-10. 2001.

ANGUS, D.C. The search for effective therapy for sepsis: back to the drawing board? **JAMA.** 306(23): p. 2614-5. 2011.

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

ASSREUY, J. et al. Feedback inhibition of nitric oxide synthase activity by nitric oxide. **Br. J. Pharmacol.**108: p. 833-837. 1993.

AVONTUUR, J.A. et al. Prolonged inhibition of nitric oxide synthesis in severe septic shock: a clinical study. **Crit. Care Med.** 26: p. 660-667, 1998.

BAE, Y.S. et al. Trp-Lys-Tyr-Met-Val-D-Met stimulates superoxide generation and killing of *Staphylococcus aureus* via phospholipase D activation in human monocytes. **J. Leukoc. Biol.** 65: p. 241–248. 1999a.

BAE, Y.S. et al. Trp-Lys-Tyr-Met-Val-D-Met is a chemoattractant for human phagocytic cells. **J. Leukoc. Biol.** 66: p. 915–922. 1999b.

BAE, Y.S. et al. Differential activation of formyl peptide receptor-like 1 by peptide ligands. **J. Immunol.** 171(12): p. 6807-13. 2003.

BAEK, S.H. et al. Identification of the peptides that stimulate the phosphoinositide, hydrolysis in lymphocyte cell lines from peptide libraries. **J. Biol. Chem.** 271: p. 8170–8175. 1996.

BEAVO, J.A.; BRUNTON, L.L. Cyclic nucleotide research- still expanding after half a century. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.** 3(9): p. 710-8. 2002.

BEISHUIZEN, A.; VERMES, I.; HAANEN, C. Endogenous mediators in sepsis and septic shock. **Adv. Clin. Chem.** 33: p. 55-131. 1998.

BENA, S. et al. Annexin A1 interaction with the FPR2/ALX receptor: identification of distinct domains and downstream associated signaling. **J. Biol. Chem.** 287(29): p. 24690-7. 2012.

BENJAMIM, C.F.; FERREIRA, S.H.; CUNHA, F.Q. Role of nitric oxide in failure of neutrophil migration in sepsis. **J. Infect. Dis.** 182: p. 214-223. 2000.

BERKESTEDT, I.; NELSON, A.; BODELSSON, M. Endogenous antimicrobial peptide LL-37 induces human vasodilatation. **Br. J. Anaesth.** 100(6): p. 803-9. 2008.

BONE, R.C. et al. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. **Chest.** 101(6): p. 1644-55. 1992.

BONE, R.C.; SIBBALD, W.J.; SPRUNG, C.L. The ACCP-SCCM consensus conference on sepsis and organ failure. **Chest.** 101(6): p. 1481-3. 1992.

BONNANS, C. et al. Synthesis and anti-inflammatory effect of lipoxins in human airway epithelial cells. **Biomed. Pharmacother.** 61(5): p. 261-7. 2007.

BRUNNELL, E.; PARRILLO, J.E. Cardiac dysfunction during septic shock. **Clin. Chest Med.** 17: p. 237-48. 1996.

BUSSE, R.; MULSCH, A. Induction of nitric oxide synthase by cytokines in vascular smooth muscle cells. **FEBS Lett.** 275: p. 87-90. 1990.

CAIRUS, H.R.J. Textos Hipocráticos: o doente, o médico e a doença. **História e Saúde.** (1): p. 252. 2005.

CARP, H. Mitochondrial N-formylmethionyl proteins as chemoattractants for neutrophils. **J. Exp. Med.** 155 (1): 264-75. 1982.

CATTANEO, F.; PARISI, M.; AMMENDOLA, R. Distinct signaling cascades elicited by different formyl peptide receptor 2 (FPR2) agonists. **Int. J. Mol. Sci.** 14(4): p. 7193-230. 2013.

CAUWELS, A. Nitric oxide in shock. **Kidney Int.** 72(5): p. 557-565. 2007.

CENA, J. et al. Endothelial dependence of matrix metalloproteinase-mediated vascular hyporeactivity caused by lipopolysaccharide. **Eur. J. Pharmacol.** 582(1-3):116-22. 2008.

CENA, J. et al. Inhibition of matrix metalloproteinase activity *in vivo* protects against vascular hyporeactivity in endotoxemia. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.** 298: H45-51, 2010.

CHEN, F. et al. Resolvin D1 improves survival in experimental sepsis through reducing bacterial load and preventing excessive activation of inflammatory response. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.** 33(3): p. 457-64. 2014.

CHEN, K. et al. Formylpeptide receptor-2 contributes to colonic epithelial homeostasis, inflammation, and tumorigenesis. **J. Clin. Invest.** 123: p. 1694–1704. 2013.

CHEN, K. et al. A critical role for the G protein-coupled receptor mFPR2 in airway inflammation and immune responses. **J. Immunol.** 184 (7), p. 3331-5. 2010.

CHEN, S.J.; WU, C.C.; YEN M.H. Alterations of *ex vivo* vascular reactivity in intraperitoneal sepsis. **J. Cardiovasc. Pharmacol.** 24: p. 786-793. 1994.

CHIANG, N. et al. The lipoxin receptor ALX: potent ligand-specific and stereoselective actions *in vivo*. **Pharmacol. Rev.** 58 (3): p. 463-87. 2006.

CHRISTAKI, E.; GIAMARELLOS-BOURBOULIS, E.J. The complex pathogenesis of bacteremia: from antimicrobial clearance mechanisms to the genetic background of the host. **Virulence.** 5 (1): p. 57-65. 2014.

CHRISTOPHE, T. et al. The synthetic peptide Trp-Lys-Tyr-Met-Val-Met-NH₂ specifically activates neutrophils through FPRL1/lipoxin A4 receptors and is an agonist for the orphan monocyte-expressed chemoattractant receptor FPRL2. **J Biol Chem.** 276(24): p. 21585-93. 2001.

CLEETER, M.W. et al. Reversible inhibition of cytochrome c oxidase, the terminal enzyme of the mitochondrial respiratory chain, by nitric oxide. Implications for neurodegenerative diseases. **FEBS Lett.** 345 (1): p. 50-54. 1994.

CLOWES, G.H.A.; VUCINIC, M.; WEIDNER, M.G. Clinical review: Myocardial depression in sepsis and septic shock. **Ann Surg.** 163: p. 844-866. 1966.

COHEN, J. The immunopathogenesis of sepsis. **Nature.** 420(6917): p. 885-91. 2002.

COORAY, S.N. et al. Ligand-specific conformational change of the G-protein-coupled receptor ALX/FPR2 determines proresolving functional responses. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 110(45):18232-7. 2013.

CUI, Y. et al. Bacterial lipopolysaccharide selectively up-regulates the function of the chemotactic peptide receptor formyl peptide receptor 2 in murine microglial cells. **J. Immunol.** 168: p. 434-42. 2002.

DAHLGREN, C. et al. The synthetic chemoattractant Trp-Lys-Tyr-Met-Val-DMet activates neutrophils preferentially through the lipoxin A(4) receptor. **Blood.** 95: p. 1810–1818. 2000.

DAVIES, M.G.; HAGEN, P.O. Systemic inflammatory response syndrome. **Br. Surg.** 27: p. 920-935. 1997.

DELLINGER, R.P. Cardiovascular management of septic shock. **Crit. Care Med.** 31: p. 946–55. 2003.

DELLINGER, R.P., et al., Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: **Crit. Care Med.** 41(2): p. 580-637. 2012.

DUFTON, N. et al. Anti-inflammatory role of the murine formyl-peptide receptor 2: ligand-specific effects on leukocyte responses and experimental inflammation. **J Immunol.** 184(5): p. 2611-9. 2010.

EISEN, D.P.; REID, D.; MCBRYDE, E.S. Acetyl salicylic acid usage and mortality in critically ill patients with the systemic inflammatory response syndrome and sepsis. **Crit. Care Med.** 40: p. 1761–1767. 2012.

ERNST, S. et al. Agonist-induced trafficking of the low-affinity formyl peptide receptor FPRL1. **Cell Mol. Life Sci.** 61(13): p. 1684-92. 2004.

ERTEL, W. et al. Downregulation of proinflammatory cytokine release in whole blood from septic patients. **Blood**. 85(5): p. 1341-7. 1995.

EVANS, T. et al. Evidence of increased nitric oxide production in patients with the sepsis syndrome. **Circ. Shock**. 41: p. 77-81. 1993.

FEIHL, F.; WAEBER, B.; LIAUDET, L. Is nitric oxide overproduction the target of choice for the management of septic shock? **Pharmacol. Ther.** 91: p. 179-213. 2001.

FELETOU, M.; VANHOUTTE, P. M. Endothelium-dependent hyperpolarization of canine coronary smooth muscle. **Br. J. Pharmacol.** 93(3): p. 515-524. 1988.

FERNANDES, D.; ASSREUY, J. Nitric oxide and vascular reactivity in sepsis. **Shock**. Suppl 1:10-3; 2008.

FERNANDES, D. et al. Nitric oxide-dependent reduction in soluble guanylate cyclase functionality accounts for early lipopolysaccharide-induced changes in vascular reactivity. **Mol. Pharmacol.** 69: p. 983-990. 2006.

FERNANDES, D. et al. Late, but not early, inhibition of soluble guanylate cyclase decreases mortality in a rat sepsis model. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 328: p. 991-999, 2009.

FERRETTI, M.E. et al. Modulation of neutrophil phospholipase C activity and cyclic AMP levels by fMLP-OMe analogues. **Cell Signal**. 13 (4): p. 233-40. 2001.

FINK, M.P. Research advances in cell biology relevant to critical illness. **Curr. Opin. Crit. Care**. 10: p. 279-291. 2004.

FIORE, S. et al. Identification of a human cDNA encoding a functional high affinity lipoxin A4 receptor. **J. Exp. Med.** 180: p. 253-260. 1994.

FLEMING, I. BUSSE, R. Signal transduction of eNOS activation. **Cardiovasc. Res.** 43(3): p. 532-41. 1999.

FLEMING, I.; GRAY, G.A.; STOCLET, J.C. Influence of endothelium on induction of the L-arginine-nitric oxide pathway in rat aortas. **Am. J. Physiol.** 264: p. 1200–1207. 1993.

FORSMAN, H. et al. Receptor-dependent and -independent immunomodulatory effects of phenol-soluble modulin peptides from *Staphylococcus aureus* on human neutrophils are abrogated through peptide inactivation by reactive oxygen species. **Infect. Immun.** 80; p. 1987–1995. 2012.

FORSMAN, H.; DAHLGREN, C. Lipoxin A(4) metabolites/analogues from two commercial sources have no effects on TNF-alpha-mediated priming or activation through the neutrophil formyl peptide receptors. **Scand. J. Immunol.** 70 (4): p. 396-402. 2009.

FÖRSTERMANN, U.; BOISSEL, J.P.; KLEINERT, H. Expressional control of the 'constitutive' isoforms of nitric oxide synthase (NOS I and NOS III). **FASEB J.** 12(10):773-90. 1998.

FROM THE CENTERS FOR DISEASE CONTROL. Increase in National Hospital Discharge Survey rates for septicemia-United States, 1979-1987. **Jama.** 263(7): p. 937-8. 1990.

FUKUTO, J.M.; CHO, J.Y.; SWITZER, C.H. The Chemical Properties of Nitric Oxide and Related Nitrogen Oxides. In: Ignarro, L. J., (Ed.). **Nitric Oxide Biology and Pathobiology.** p. 23-40. 2000.

FURCHGOTT, R. F. Introduction to EDRF research. **J. Cardiovasc. Pharmacol.** 22(7): S1-2. 1993.

FURCHGOTT, R.F.; ZAWADZKI, J.V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature.** 288: p. 373-376. 1980.

GAO, J.L.; MURPHY, P.M. Species and subtype variants of the N-formyl peptide chemotactic receptor reveal multiple important functional domains. **J. Biol. Chem.** 268: p. 25395–25401. 1993.

GAO, J.L. et al. Differential expansion of the N-formylpeptide receptor gene cluster in human and mouse. **Genomics.** 51: p. 270–276. 1998.

GAO, J.L. et al. F2L, a peptide derived from heme-binding protein, chemoattracts mouse neutrophils by specifically activating Fpr2, the low-affinity N-formylpeptide receptor. **J. Immunol.** 178:1450–1456. 2007.

GAO, J.L.; LEE, E.J.; MURPHY, P.M. Impaired antibacterial host defense in mice lacking the N-formylpeptide receptor. **J. Exp. Med.** 189: p. 657–662. 1999.

GENG, Y.; HANSSON, G.K.; HOLME, E. Interferon-gamma and tumor necrosis factor synergise to induce nitric oxide production and inhibit mitochondrial respiration in vascular smooth muscle cells. **Circulation Res.** 71: p. 1268-1276. 1992.

GIBOT, S. et al. Combination biomarkers to diagnose sepsis in the critically ill patient. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.** 186(1): p. 65-71. 2012.

GIERSCHIK, P.; SIDIROPOULOS, D.; JAKOBS, K.H. Two distinct Gi-proteins mediate formyl peptide receptor signal transduction in human leukemia (HL-60) cells. **J. Biol. Chem.** 264: p. 21470–21473. 1989.

GINNAN, R. et al. Regulation of smooth muscle by inducible nitric oxide synthase and NADPH oxidase in vascular proliferative diseases. **Free Rad. Biol. Med.** 44: p. 1232–1245. 2008.

GOBBETTI, T. et al. Nonredundant protective properties of FPR2/ALX in polymicrobial murine sepsis. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.** 111(52): p. 18685-90. 2014.

HANSON, J. et al. Heterologously expressed formyl peptide receptor 2 (FPR2/ALX) does not respond to lipoxin A4. **Biochem. Pharmacol.** 85 (12): p. 1795-802. 2013.

HARRIS, H. Role of chemotaxis in inflammation. **Physiol. Rev.** 34(3): p. 529-62. 1954.

HARTT, J.K. et al. N-Formylpeptides induce two distinct concentration optima for mouse neutrophil chemotaxis by differential interaction with two N-formylpeptide receptor (FPR) subtypes. **Molecular**

- characterization of FPR2, a second mouse neutrophil FPR. **J. Exp. Med.** 190: p. 741–747. 1999.
- HE, H.Q. et al. Functional characterization of three mouse formyl peptide receptors. **Mol. Pharmacol.** 83(2): p. 389-98. 2013.
- HE, H.Q. et al. Structural determinants for the interaction of formyl peptide receptor 2 with peptide ligands. **J. Biol. Chem.** 289 (4): p. 2295-306. 2014.
- HEO, S.K. et al. LPS induces inflammatory responses in human aortic vascular smooth muscle cells via Toll-like receptor 4 expression and nitric oxide production. **Immunol. Lett.** 120(1-2):57-64. 2008.
- HINSHAW, L.B. Sepsis/septic shock: participation of the microcirculation: an abbreviated review. **Crit. Care Med.** 24: p. 1072-1078. 1996.
- HO, K.H.; KWA, C.Y.; BOURREAU, J.P. Hyporesponsiveness to Ca²⁺ of aortic smooth muscle in endotoxin-treated rats: no-dependent and -independent *in vitro* mechanisms. **Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.** 92: p. 275-284. 1996.
- HOCHSTADT, A.; MEROZ, Y.; LANDESBURG, G. Myocardial dysfunction in severe sepsis and septic shock: more questions than answers? **J. Cardiothorac. Vasc. Anesth.** 25(3): p. 526-35. 2011.
- HOLLENBERG, S.M. et al. Practice parameters for hemodynamic support of sepsis in adult patients: 2004 update. **Crit. Care Med.** 32(9): p. 1928-1948. 2004.
- HOROWITZ, A. et al. Mechanisms of smooth muscle contraction. **Physiol. Rev.** 76(4): p. 967-1003. 1996.
- HOTCHKISS, R.S.; KARL, I.E. The pathophysiology and treatment of sepsis. **New Eng. J. Med.** 348(2): p. 138-150. 2003.
- HOTCHKISS, R.S.; MONNERET, G.; PAYEN, D. Immunosuppression in sepsis: a novel understanding of the disorder and a new therapeutic approach. **Lancet Infect Dis.** 13(3): p. 260-8. 2013.

HUET, E. et al. The role of beta-arrestins in the formyl peptide receptor-like 1 internalization and signaling. **Cell. Signal.** 19: p. 1939–48. 2007.

IACCIO, A. et al. Protein kinase C- α and - δ are required for NADPH oxidase activation in WKYMVm-stimulated IMR90 human fibroblasts. **Arch. Biochem. Biophys.** 459: p. 288–294. 2007.

IGNARRO, L.J. et al. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.** 84(24): p. 9265-9269. 1987.

INCE, C.; SINNASAPPEL, M. Microcirculatory oxygenation and shunting in sepsis and shock. **Crit. Care Med.** 27: p. 1369-1377. 1999.

JAWAD, I.; LUKSIC, I.; RAFNSSON, S.B. Assessing available information on the burden of sepsis: global estimates of incidence, prevalence and mortality. **J Glob Health.** 2(1): p. 010404. 2012.

JIA, Y. et al. Regulation of lung fibroblast activation by annexin A1. **J Cell Physiol.** 228(2): p. 476-84. 2013.

JULOU-SCHAEFFER, G. et al. Loss of vascular responsiveness induced by endotoxin involves L-arginine pathway. **Am. J. Physiol.** 259: H1038-H1043. 1990.

KAM, A.Y.; LIU, A.M.; WONG, Y.H. Formyl peptide-receptor like-1 requires lipid raft and extracellular signal-regulated protein kinase to activate inhibitor- κ B kinase in human U87 astrocytoma cells. **J. Neurochem.** 103: p. 1553–1566. 2007.

KAN, W. et al. Lung, spleen, and kidney are the major places for inducible nitric oxide synthase expression in endotoxic shock: role of p38 mitogen-activated protein kinase in signal transduction of inducible nitric oxide synthase expression. **Shock.** 21(3): p. 281-7. 2004.

KANG, H.K. et al. The synthetic peptide Trp-Lys-Tyr-Met-Val-D-Met inhibits human monocyte-derived dendritic cell maturation via formyl peptide receptor and formyl peptide receptorlike 2. **J. Immunol.** 175: p. 685–692. 2005.

KARLSSON, J. The peptide Trp-Lys-Tyr-Met-Val- D-Met activates neutrophils through the formyl peptide receptor only when signaling through the formylpeptide receptor like 1 is blocked. A receptor switch with implications for signal transduction studies with inhibitors and receptor antagonists. **Biochem. Pharmacol.** 71: p. 1488–1496. 2006.

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

KILBOURN, R.G. et al. Reversal of endotoxin-mediated shock by NG-methyl-L-arginine, an inhibitor of nitric oxide synthesis. **Biochim. Biophys. Res. Commun.** 172: p. 1132-1138. 1990.

KILBOURN, R.G.; SZABO, C.E.; TRABER, D.L. Beneficial versus detrimental effects of nitric oxide synthase inhibitors in circulatory shock: lessons learned from experimental and clinical studies. **Shock.** 7(4): p. 235-246. 1997.

KIM, S.D. et al. The agonists of formyl peptide receptors prevent development of severe sepsis after microbial infection. **J. Immunol.** 185(7): p. 4302-10. 2010.

KIM, S.D. et al. The immune-stimulating peptide WKYMVm has therapeutic effects against ulcerative colitis. **Exp. Mol. Med.** 45:e40. 2013.

KOCZULLA, R. et al. An angiogenic role for the human peptide antibiotic LL-37/hCAP-18. **J. Clin. Invest.** 111(11): p. 1665–72. 2003.

KRISHNAMOORTHY, S. et al. Resolvin D1 receptor stereoselectivity and regulation of inflammation and proresolving microRNAs. **Am. J. Pathol.** 180 (5): p. 2018-27. 2012.

KUMAR, A. et al. Tumor necrosis factor-alpha and interleukin1-beta are responsible for depression of *in vitro* myocardial cell contractility induced by serum from humans with septic shock. **J. Exp. Med.** 183: p. 949-58. 1996.

KUMAR, G. et al. Nationwide trends of severe sepsis in the 21st century (2000-2007). **Chest.** 140(5): p. 1223-31. 2011.

KWAN, D.H.; KAM, A.Y.; WONG, Y.H. Activation of the Human FPRL-1 Receptor Promotes Ca²⁺ Mobilization in U87 Astrocytoma Cells. **Neurochem. Res.** 33: p. 125–133. 2008.

LAD, P.M.; OLSON, C.V.; SMILEY, P.A. Association of the N-formyl-Met-Leu-Phe receptor in human neutrophils with a GTP-binding protein sensitive to pertussis toxin. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 82: p. 869–873. 1985.

LAGU, T. et al. Hospitalizations, costs, and outcomes of severe sepsis in the United States 2003 to 2007. **Crit. Care Med.** 40(3): p. 754-61. 2012.

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

LE, Y. et al. Utilization of two seven-transmembrane, G protein-coupled receptors, formyl peptide receptor-like 1 and formyl receptor, by the synthetic hexapeptide WKYMVm for human phagocyte activation. **J. Immunol.** 163: p. 6777–6784. 1999.

LE, Y.; MURPHY, P.M.; WANG, J.M. Formyl-peptide receptors revisited. **Trends Immunol.** 23(11): p. 541-8. 2002.

LEE, H.Y. et al. Differential production of leukotriene B₄ or prostaglandin E₂ by WKYMVm or serum amyloid A via formyl peptide receptor-like 1. **Biochem. Pharmacol.** 72: p. 860–868. 2006.

LEFER, A. et al. Lipoxins A₄ and B₄: Comparison of eicosanoids having bronchoconstrictor and vasodilator actions but lacking platelet aggregatory activity. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 85: p. 8340-8344. 1988.

LEONE, M.; MARTIN, C. Vasopressor use in septic shock: an update. **Curr. Opin. Anesthesiol.** 21: p. 141–147. 2008.

LEVY, B.D. et al. Multi-pronged inhibition of airway hyperresponsiveness and inflammation by lipoxin A₄. **Nat. Med.** 8(9): p. 1018-23. 2002.

LEVY, M.M. et al. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. **Intensive Care Med.** 29(4): p. 530-8. 2003.

LIAUDET, L.; VASSALLI, G.; PACHER, P. Role of peroxynitrite in the redox regulation of cell signal transduction pathways. **Front. Biosci.** 14: p. 4809-4814. 2009.

LIU, M. et al. Formylpeptide receptors are critical for rapid neutrophil mobilization in host defense against *Listeria monocytogenes*. **Sci Rep.** 2: p. 786. 2012.

LOPEZ, A. et al. Multiple-center, randomized, placebo-controlled, double-blind study of the nitric oxide synthase inhibitor 546C88: effect on survival in patients with septic shock. **Crit. Care Med.** 32(1): p. 21-30. 2004.

LUCAS, K.A. et al. Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP. **Pharmacol Rev.** 52(3): p. 375-414. 2000.

MADERNA, P. et al. FPR2/ALX receptor expression and internalization are critical for lipoxin A4 and annexin-derived peptide-stimulated phagocytosis. **FASEB J.** 24(11): p. 4240-9. 2010.

MACHADO, F.S. et al. Anti-inflammatory actions of lipoxin A4 and aspirin-triggered lipoxin are SOCS-2 dependent. **Nat. Med.** 12(3): p. 330-4. 2006.

MACMICKING, J.D. et al. Altered responses to bacterial infection and endotoxin shock in mice lacking inducible nitric oxide synthase. **Cell.** 81: p. 641-650. 1995.

MARIK, P.E.; VARON J. The hemodynamic derangements in sepsis: implications for treatment strategies. **Chest.** 114: p. 854-860. 1998.

MARTIN, G.S. et al. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. **N. Engl. J. Med.** 348(16): p. 1546-54. 2003.

MATLUNG, H. L.; BAKKER, E.N.; VANBAVEL, E. Shear stress, reactive oxygen species and arterial structure and function. **Antioxid. Redox Signal.** 11(7): p. 1699-709. 2009.

MAYR, F.B. et al. Infection rate and acute organ dysfunction risk as explanations for racial differences in severe sepsis. **JAMA**. 303(24): p. 2495-503. 2010.

MAYR, F.B.; YENDE, S.; ANGUS, D.C. Epidemiology of severe sepsis. **Virulence**. 5(1): p. 4-11. 2014.

MCDONALD, B. et al. Intravascular danger signals guide neutrophils to sites of sterile inflammation. **Science**. 330(6002): p. 362-6. 2010.

MCKENNA, T.M. et al. Vascular endothelium contributes to decreased aortic contractility in experimental sepsis. **Circ. Shock**. 19: p. 267. 1986.

MIGEOTTE, I.; COMMUNI, D.; PARMENTIER, M. Formyl peptide receptors: a promiscuous subfamily of G protein-coupled receptors controlling immune responses. **Cytokine & Growth Factor rev**. 17(6): p. 501-19. 2006.

MIGEOTTE, I. et al. Identification and characterization of an endogenous chemotactic ligand specific for FPRL2. **J. Exp. Med**. 201: p. 83-93. 2005.

MINGHETTI, L. et al. Down-regulation of microglial cyclo-oxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase expression by lipocortin 1. **Brit. J. Phar.** 126: p. 1307-1314. 1999.

MIRANDA, K.M. et al. The Chemical Biology of Nitric Oxide. In: Ignarro, L. J., (Ed.). **Nitric Oxide Biology and Pathobiology**. p. 41-56. 2000.

MONCADA, S. et al. An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation. **Nature**. 263(5579): p. 663-5. 1976.

MONCADA, S. et al. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. **Pharmacol. Reviews**. 43(2): p. 109-42. 1991.

MONCADA, S.; ERUSALIMSKY, J.D. Does nitric oxide modulate mitochondrial energy generation and apoptosis? **Nat. Rev. Mol. Cell Biol**. 3(3): p. 214-220. 2002.

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

MONCADA, S.; HIGGS, A. The L-arginine-nitric oxide pathway. **N. Engl. J. Med.** 329: p. 2002-2012. 1993.

MOU, H. et al. Proinflammatory stimulants promote the expression of a promiscuous G protein-coupled receptor, mFPR2, in microvascular endothelial cells. **Inflammation.** 35(2): p. 656-64. 2012.

MUNOZ, C. et al. Dysregulation of *in vitro* cytokine production by monocytes during sepsis. **J. Clin. Invest.** 88(5): p. 1747-54. 1991.

NAKAKI, T. et al. Endothelium-accelerated hyporesponsiveness of norepinephrine-elicited contraction of rat aorta in the presence of bacterial lipopolysaccharide. **Eur. J. Pharmacol.** 219: p. 311–318. 1992.

NATHAN, C.; SHILOH, M.U. Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 97: p. 8841-8848, 2000.

NAVA, E.; PALMER, R.M.J.; MONCADA, S. The role of nitric oxide in endotoxin shock: effects of L-NMMA. **J. Cardiovasc. Pharmacol.** 12:S132-S134. 1992.

NELSON, J.W. et al. ALX/FPR2 receptor for RvD1 is expressed and functional in salivary glands. **Int J Ophthalmol.** 7(2): p. 187-93. 2014.

O'BRIEN, J.M. et al. Sepsis. **The American Journal of Medicine.** 120(12): p. 1012-22. 2007.

OCHOA, J.B. et al. Nitrogen oxide levels in patients after trauma and during sepsis. **Ann. Surg.** 214(5): p. 621-626. 1991.

OGUT, O.; BROZOVICH, F.V. Regulation of force in vascular smooth muscle. **J. Mol. Cell Cardiol.** 35: p. 347–355, 2003.

OKAMOTO, T. et al. Activation of matrix metalloproteinases by peroxynitrite-induced protein S-glutathiolation via disulfide S-oxide formation. **J. Biol. Chem.** 276: p. 29596–29602, 2001.

OSUCHOWSKI, M.F. et al. Stratification is the key: inflammatory biomarkers accurately direct immunomodulatory therapy in experimental sepsis. **Crit.Care Med.** 37: p. 1567–1573. 2009.

PACHER, P.; BECKMAN, J.S.; LIAUDET, L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. **Physiol. Rev.** 87: p. 315-424. 2007.

PALMER, R.M.; FERRIGE, A.G.; MONCADA, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. **Nature.** 327(6122): p. 524-526. 1987.

PARK, S. et al. A novel delivery platform for therapeutic peptides. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 450(1): p. 13-8. 2014.

PARKER, M.M. Pathophysiology of cardiovascular dysfunction in septic shock. **New Horiz.** 6: p. 130-38. 1998.

PARRATT, J.R. Nitric oxide in sepsis and endotoxaemia. **J. Antimicrob. Chemother.** 41 Suppl A: p. 31-39. 1998.

PARRILLO, J.E. et al. Septic shock in humans. Advances in the understanding of pathogenesis, cardiovascular dysfunction, and therapy. **Ann. Intern. Med.** 113(3): p. 227-242. 1990.

PARRILLO, J.E. Pathogenetic mechanisms of septic shock. **Engl. J. Med.** 328: p. 1471-1477. 1993.

PAYA, D. et al. Temporal relationships between levels of circulating NO derivatives, vascular NO production and hyporeactivity to noradrenaline induced by endotoxin in rats. **Cardiovasc. Res.** 30: p. 952-959. 1995.

PETERS-GOLDEN, M. “Good” lipids for asthma. **Nat. Med.** 8(9): p. 931-2. 2002.

PIEPOT, H.A. et al. The role of inducible nitric oxide synthase in lipopolysaccharide-mediated hyporeactivity to vasoconstrictors differs among isolated rat arteries. **Clin. Sci. (Lond.).** 102: p. 297-305. 2002.

PLANAGUMÀ, A. et al. Lack of activity of 15-epi-lipoxin A4 on FPR2/ALX and CysLT1 receptors in interleukin-8-driven human neutrophil function. **Clin. Exp. Immunol.** 173(2): p. 298-309. 2013.

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

PROSSNITZ, E.R.; YE, R.D. The N-formyl peptide receptor: a model for the study of chemoattractant receptor structure and function. **Pharmacol. Ther.** 74(1): p. 73-102, 1997.

RABIET, M.J.; HUET, E.; BOULAY, F. The N-formyl peptide receptors and the anaphylatoxin C5a receptors: an overview. **Biochimie.** 89: p. 1089–1106. 2007.

RABIET, M.J.; HUET, E.; BOULAY, F. Human mitochondria-derived N-formylated peptides are novel agonists equally active on FPR and FPRL1, while *Listeria monocytogenes*-derived peptides preferentially activate FPR. **Eur. J. Immunol.** 35(8): p. 2486-95. 2005.

RABIET, M.J. et al. N-formyl peptide receptor 3 (FPR3) departs from the homologous FPR2/ALX receptor with regard to the major processes governing chemoattractant receptor regulation, expression at the cell surface, and phosphorylation. **J. Biol. Chem.** 286: p. 26718–26731. 2011.

RANGEL-FRAUSTO, M.S. Sepsis: still going strong. **Arch. Med. Res.** 36: p. 672-681. 2005

REBER, A.J. et al. Immunosenescence and Challenges of Vaccination against Influenza in the Aging Population. **Aging Dis.** 3(1): p. 68-90. 2012

REES, D.D. et al. Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase *in vitro* and *in vivo*. **Br. J. Pharmacol.** 101: p. 746-52. 1989.

REES, D.D. Role of nitric oxide in the vascular dysfunction of septic shock. **Biochem. Soc. Trans.** 23(4): p. 1025-1029. 1995.

REGARD, J.B.; SATO, I.T.; COUGHLIN, S.R. Anatomical profiling of G protein-coupled receptor expression. **Cell**. 135(3): p. 561-71. 2008.

RIGATO, O.; SALOMAO, R. Impaired production of interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha but not of interleukin 10 in whole blood of patients with sepsis. **Shock**. 19(2): p. 113-6. 2003.

RUDIGER, A.; SINGER, M. The heart in sepsis: from basic mechanisms to clinical management. **Curr. Vasc. Pharmacol**. 11(2): p. 187-95. 2013.

SALES, J.A.L. Sepsis Brasil: Estudo Epidemiológico da Sepsis em Unidades de terapia intensiva Brasileiras. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**. 18: p. 9-16. 2006.

SAWMYNADEN, P., PERRETTI, M. Glucocorticoid upregulation of the annexin-A1 receptor in leukocytes. **Biochem. Biophys. Res. Commun**. 349(4): p. 1351- 1355. 2006.

SCHESCHOWITSCH, K. Translocação nuclear de NF- κ B e de receptores de glicocorticoides em células musculares lisas: envolvimento do óxido nítrico e do peroxinitrito. (Dissertação de mestrado em Farmacologia. Centro de ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina). Florianópolis. 2011.

SCHIFFMANN, E.; CORCORAN, B.A.; WAHL, S.M. N-formylmethionyl peptides as chemoattractants for leucocytes. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**. 72: p. 1059 –1062. 1975a.

SCHIFFMANN, E. et al. The isolation and partial characterization of neutrophil chemotactic factors from *Escherichia coli*. **J. Immunol**. 114: p. 1831–1837. 1975b

SCHINI, V.B. et al. Interleukin-1b induces the production of an L-arginine-derived relaxing factor from cultured smooth muscle cells from rat aorta. **Biochem. Biophys. Res. Commun**. 176: p. 114–121. 1991.

SCHWARTZ, D.; BLANTZ, R.C. Nitric oxide, sepsis, and the kidney. **Semin. Nephrol**. 19(3): p. 272-276. 1999.

SELVATICI, R. et al. Signal transduction pathways triggered by selective formylpeptide analogues in human neutrophils. **Eur. J. Pharmacol.** 534, 1(3): p. 1-11. 2006.

SHARMA, A.C. Sepsis-induced myocardial dysfunction. **Shock.** 28(3): p. 265-9. 2007.

SHERWOOD, E.R. Mechanisms of the inflammatory response. **Best. Pract. Res. Clin. Anaesthesiol.** 18: p. 385-405. 2004.

SHOWELL, H.J. et al. The structure-activity relations of synthetic peptides as chemo- tactic factors and inducers of lysosomal secretion for neutrophils. **J. Exp. Med.** 143: p. 1154 –1169. 1976.

SILVA, E. et al. Brazilian Sepsis Epidemiological Study (BASES study). **Crit. Care.** 8: R251-260. 2004.

SILVA-SANTOS, J.E. et al. The Rho-A/Rho- kinase pathway is up-regulated but remains inhibited by cyclic guanosine monophosphate-dependent mechanisms during endotoxaemia in small mesenteric arteries. **Crit Care Med.** 37: p. 1716-1723. 2009.

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

SINGER, M. Biomarkers in sepsis. **Curr. Opin. Pulm. Med.** 19(3): p. 305-9. 2013.

SINISTRO, A. et al. Downregulation of CD40 ligand response in monocytes from sepsis patients. **Clin. Vaccine Immunol.** 15(12): p. 1851-8. 2008.

SORDI, R.; FERNANDES, D.; ASSREUY, J. Differential involvement of potassium channel subtypes in early and late sepsis-induced hyporesponsiveness to vasoconstrictors. **J. Cardiovasc. Pharmacol.** 56(2): p. 184-9. 2010.

SORDI, R. et al. Dual role of lipoxin A4 in pneumosepsis pathogenesis. **Int. Immunopharmacol.** 17(2): p. 283-92. 2013a.

SORDI, R. et al. Pneumonia-induced sepsis in mice: temporal study of inflammatory and cardiovascular parameters. **Int. J. Exp. Pathol.** 94(2): p. 144-55. 2013b;

SOUTHGATE, E.L. et al. Identification of formyl peptides from *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* as potent chemoattractants for mouse neutrophils. **J Immunol.** 181: p. 1429–1437. 2008.

SPITE, M. et al. Resolvin D2 is a potent regulator of leukocytes and controls microbial sepsis. **Nature.** 461(7268): p. 1287-91. 2009.

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

SUFFRADINI, A.F. et al. The cardiovascular response of normal humans to the administration of endotoxin. **N. Engl. J. Med.** 321: p. 280-287. 1989.

SZABO, C. et al. Nitric oxide-mediated hyporeactivity to noradrenaline precedes the induction of nitric oxide synthase in endotoxin shock. **Br. J. Pharmacol.** 108: p. 786-792. 1993.

SZABÓ, C.; ISCHIROPOULOS, H.; RADI, R. Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics. **Nat. Rev. Drug Discovery.** 6: p. 662-680. 2007.

TAKAKURA, K. et al. Modification of alpha1-adrenoceptors by peroxynitrite as a possible mechanism of systemic hypotension in sepsis. **Crit. Care Med.** 30: p. 894-899, 2002.

TIFFANY, H.L. et al. Characterization of Fpr-rs8, an atypical member of the mouse formyl peptide receptor gene family. **J Innate Immun.** 3: p. 519–529. 2011.

TILKI, D. et al. Emerging biology of vascular wall progenitor cells in health and disease. **Trends Mol Med.** 15(11): p. 501-9. 2009.

TITHERADGE, M.A. Nitric oxide in septic shock. **Biochim. Biophys. Acta.** 1999; 1411:437-455. 1999.

- TORGERSEN, C. et al. Macroscopic postmortem findings in 235 surgical intensive care patients with sepsis. **Anesth. Analg.** 108(6): p. 1841-7. 2009.
- TSIOTOU, A. G. et al. Septic shock; current pathogenetic concepts from a clinical perspective. **Medical Science Monitor.** 11(3): p. 76-85. 2005.
- UEDA, T. et al. Combination therapy of 15-epi-lipoxin A4 with antibiotics protects mice from Escherichia coli-induced sepsis. **Crit. Care Med.** 42(4):e288-95. 2014.
- UENO, M.; LEE, T.J. Endotoxin decreases the contractile responses of the porcine basilar artery to vasoactive substances. **J. Cereb. Blood Flow Metab.** 13: p. 712-719. 1993.
- VAN DISSEL, J.T. et al. Anti-inflammatory cytokine profile and mortality in febrile patients. **Lancet.** 351(9107): p. 950-3. 1998.
- VAYSSETTES-COURCHAY, C. et al. Cutaneous venous dysfunction studied *in vivo* in the LPS-treated rabbit: implication of NO in saphenous vein hyporeactivity. **Naunyn Schm. Arch. Pharmacol.** 367: p. 516-523. 2003.
- VINCENT, J.L. et al. (2000). Effects of nitric oxide in septic shock. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.** 161(6): p. 1781-1785. 2000.
- VINCENT, J.L. et al. International study of the prevalence and outcomes of infection in intensive care units. **Jama.** 302(21): p. 2323-9. 2009.
- VON DER WEID, P.Y. et al. Aspirin-triggered, cyclooxygenase-2-dependent lipoxin synthesis modulates vascular tone. **Circulation.** 110(10): p. 1320-5. 2004.
- WALKER, J. et al. Lipoxin a4 increases survival by decreasing systemic inflammation and bacterial load in sepsis. **Shock.** 36(4): p. 410-6. 2011.
- WEIGHARDT, H. et al. Sepsis after major visceral surgery is associated with sustained and interferon-gamma-resistant defects of monocyte cytokine production. **Surgery.** 127(3): p. 309-15. 2000.

WENZEL, R.P.; EDMOND M.B. Septic shock--evaluating another failed treatment. **N. Engl. J. Med.** 366(22): p. 2122-4. 2012.

WHITTLE, B.J. Nitric oxide in physiology and pathology. **The Histochemical Journal.** 27: p. 727-737. 1995.

WILLIAMS, S.C. After Xigris, researchers look to new targets to combat sepsis. **Nat Med.** 18(7): p. 1001. 2012.

WILSON, P.G. et al. Serum amyloid A, but not C-reactive protein, stimulates vascular proteoglycan synthesis in a pro-atherogenic manner. **Am. J. Pathol.** 173: p. 1902-10. 2008.

WINK, D.A. et al. Inhibition of cytochromes P450 by nitric oxide and a nitric oxide-releasing agent. **Arch. Biochem. Biophys.** 300(1): p. 115-123. 1993.

WINK, D.A. et al. The Chemical Biology of Nitric Oxide. Balancing Nitric Oxide with Oxidative and Nitrosative Stress. In: Mayer, B., (Ed.). **Nitric Oxide.** p. 7-32. 2000.

WINK, D.A.; MITCHELL, J.B. Chemical biology of nitric oxide: Insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. **Free Radic. Biol. Med.** 25: p. 434-456. 1998.

WU, C.C. et al. Aminoguanidine attenuates the delayed circulatory failure and improves survival in rodent models of endotoxic shock. **Br. J. Pharmacol.** 114(8): p. 1666-1672. 1995.

WU, C.C.; RUETTEN, H.; THIEMERMANN, C. Comparison of the effects of aminoguanidine and N-nitro-L-arginine methyl ester on the multiple organ dysfunction caused by endotoxaemia in the rat. **Eur. J. Pharmacol.** 300: p. 99-104. 1996.

WU, F.; WILSON, J.X.; TYML, K. Ascorbate inhibits iNOS expression and preserves vasoconstrictor responsiveness in skeletal muscle of septic mice. **Am. J. of Phys. Regulatory, integrative and comparative physiology.** 285(1): p. R50-6. 2003.

XU, J. Deaths: Final Data for 2007, in National Vital Statistics Report. **CDC.** 2010.

YE, R.D. et al. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXIII. Nomenclature for the formyl peptide receptor (FPR) family. **Pharmacol. Rev.** 61(2): p. 119-61. 2009.

ZEN, K.; LIU, Y. Role of different protein tyrosine kinases in fMLP-induced neutrophil transmigration. **Immunobiology.** 213(1): p. 13-23. 2008.

ZHANG, H. et al. Adventitia as a source of inducible nitric oxide synthase in the rat aorta. **Am. J. Hypertens.** 12(5): p. 467-75. 1999.

ZHANG, Q. et al. Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury. **Nature.** 464(7285): p. 104-7. 2010.

ZHOU, M.; WANG, P.; CHAUNDRY, I.H. Cardiac contractility and structure are not significantly compromised even during the late, hypodynamic stage of sepsis. **Shock.** 5: p. 352-58. 1998.

ANEXOS

MATERIAL SUPLEMENTAR

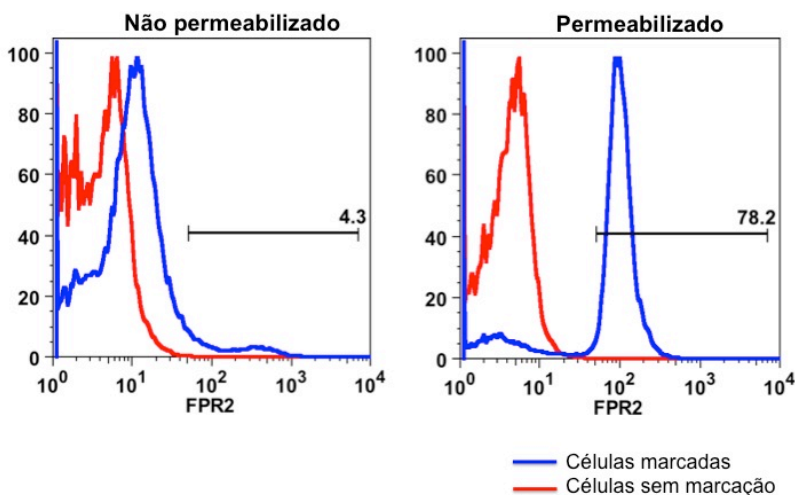


Figura suplementar 1: Análise da expressão do receptor FPR2/ALX em células do músculo liso vascular. Aliquotas de 10^6 células da linhagem A7r5 foram fixadas (formaldeído tamponado 1%) e, em seguida, permeabilizadas (saponina 0,5%) ou não. As células foram suspensas em tampão de citometria (soro bovino fetal 1% em PBS) contendo 0,5 mg/mL de anti-Fc γ RIII/II (clone 2.4G2; BD Pharmingen, CA, EUA) e incubadas (1 h, 4 °C, escuro) com anticorpo anti-FPR2 na diluição de 1:100 (clone M-73; Santa Cruz Biotechnology, CA, USA). Após este período, as amostras foram lavadas e incubadas (0,5 h, 4 °C, escuro) com anticorpo secundário anti-IgG conjugado com Alexa Fluor 488 (Invitrogen, UK). Após o tempo de incubação, as amostras foram centrifugadas (1200 g, 5 min, 4 °C), o sobrenadante foi descartado, as células foram suspensas em tampão de citometria e adquiridas pelo citômetro de fluxo (FACSCanto II, BD Biosciences, CA, EUA). Foram analisados 50.000 eventos por amostra. Os dados foram coletados com o programa FACSDiva (BD Biosciences, CA, EUA) e analisados usando-se o software Flowjo (Tree Star, Ashland, OR, EUA).

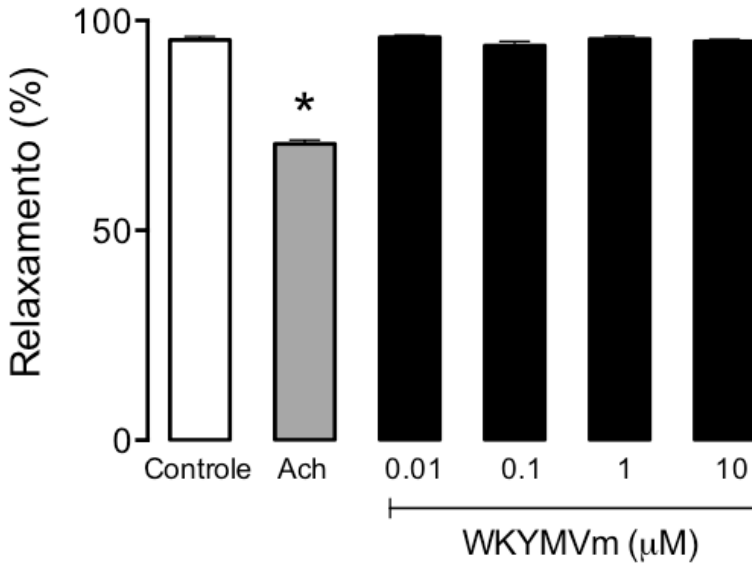


Figura suplementar 2: Efeito do WKYMVm sobre as contrações induzidas pela fenilefrina em anéis de aorta com endotélio de camundongos. Os anéis foram pré-contraídos com fenilefrina e expostos à acetilcolina (Ach) ou à diferentes concentrações do peptídeo WKYMVm (0,01; 0,1; 1 e 10 µM). Os pontos representam a média ± E.P.M., n=3. ANOVA de uma via seguido pelo teste de Bonferroni. * $p < 0,05$ comparado ao controle.

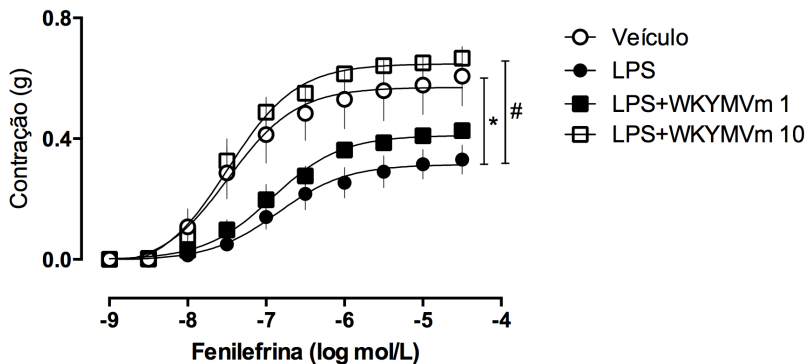


Figura suplementar 3: Curvas concentração-resposta para WKYMVm sobre as contrações induzidas pela fenilefrina em anéis de aorta sem endotélio de camundongos. Os anéis foram expostos ou não (veículo) ao LPS (10 $\mu\text{g/ml}$) por 10 horas. A incubação com o WKYMVm, em duas concentrações diferentes (1 e 10 μM), foi realizada por 30 min antes da avaliação da reatividade à fenilefrina. Os pontos representam a média \pm E.P.M., $n=5$. ANOVA de duas vias seguido pelo teste de Bonferroni. * $p < 0,05$ comparado ao veículo e # $p < 0,05$ comparado ao LPS.

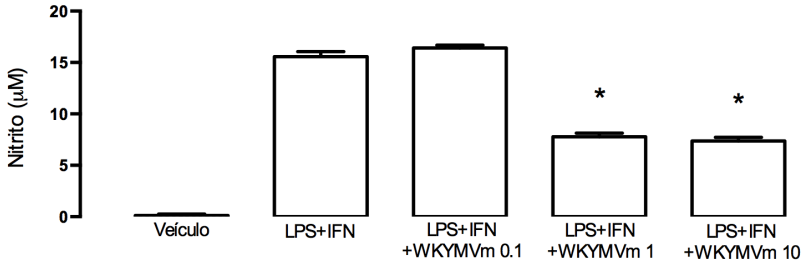


Figura suplementar 4: Efeito do WKYMVm sobre a produção de nitrito induzida por LPS+IFN em células do músculo liso vascular. Células da linhagem A7r5 foram expostas ou não (veículo) ao LPS (1 µg/ml) e IFN- γ (200 U/ml) por 48 h. WKYMVm, em três concentrações diferentes (0,1; 1 e 10 µM), foi adicionado às células 4 h após o estímulo com LPS+IFN. O acúmulo de nitrito no sobrenadante foi quantificado através da reação de Griess. As barras representam a média \pm E.P.M., n = 3. * p < 0.05 comparado ao LPS+IFN.

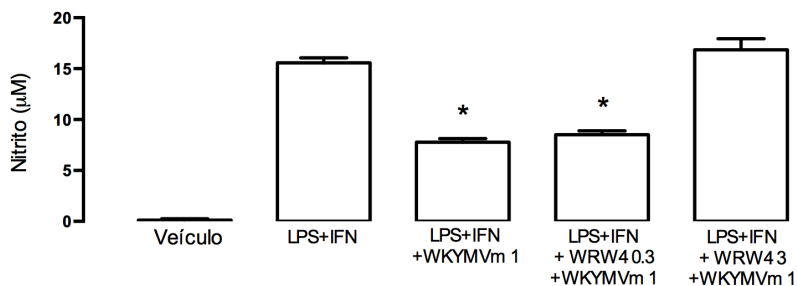


Figura suplementar 5: Efeito do antagonista WRW4 sobre a produção de nitrito induzida por LPS+IFN em células do músculo liso vascular. Células da linhagem A7r5 foram expostas ou não (veículo) ao LPS (1 µg/ml) e IFN- γ (200 U/ml) por 48 h. WKYMVm (1 µM) foi adicionado às células 4 h após o estímulo com LPS+IFN. WRW4, em duas concentrações diferentes (0,3 e 3 µM) foi adicionado 30 min antes do tratamento com o WKYMVm. O acúmulo de nitrito no sobrenadante foi quantificado através da reação de Griess. As barras representam a média \pm E.P.M., n = 3. * p < 0.05 comparado ao LPS+IFN.

APRESENTAÇÕES DE RESULTADOS E MANUSCRITOS RELACIONADOS À TESE DE DOUTORADO

Artigos publicados:

Horewicz VV, Crestani S, de Sordi R, Rezende E, Assreuy J. FPR2/ALX activation reverses LPS-induced vascular hyporeactivity in aorta and increases survival in a pneumosepsis model. *Eur J Pharmacol*. 2015 Jan 5;746:267-73. doi: 10.1016/j.ejphar.2014.11.026. Epub 2014 Dec 2.

Sordi R, Menezes-de-Lima O Jr, **Horewicz VV**, Scheschowitsch K, Santos LF, Assreuy J. Dual role of lipoxin A4 in pneumosepsis pathogenesis. *Int Immunopharmacol*. 2013 Oct;17(2):283-92. doi: 10.1016/j.intimp.2013.06.010. Epub 2013 Jun 28.

Apresentação oral em congresso:

Trabalho selecionado para concorrer ao Prêmio “Luiz Poli de Figueiredo”

Verônica Vargas Horewicz, Sandra Crestani, Regina de Sordi, Muryel de Carvalho Gonçalves, Jamil Assreuy. FPR2/ALX activation reverses LPS-induced vascular hyporeactivity and reduces mortality in pneumosepsis. XI Fórum Internacional de Sepse, 2014, São Paulo.

Resumos em congressos:

Sordi R, Menezes de Lima O Jr, **Horewicz VV**, Scheschowitsch K, Santos LF, Assreuy J. Lipoxina A₄ como mediador da resposta antiinflamatória na sepse. IX Fórum Internacional de Sepse, 2012, São Paulo.

*Agraciado com o Prêmio “Luiz Poli de Figueiredo” de melhor trabalho.

Sordi R, Menezes de Lima O Jr, **Horewicz VV**, Scheschowitsch K, Santos LF, Assreuy J. Dysregulation of the inflammatory response in pneumosepsis by early lipoxin A4 production. In: 44th Brazilian Congress of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2012, Foz do Iguaçu. Livro de Resumos, 2012.

OUTRAS ATIVIDADES DESENVOLVIDAS DURANTE O PERÍODO DO DOUTORADO

Artigos publicados:

Cury PR, Carmo JP, **Horewicz VV**, Santos JN, Barbuto JA. Altered phenotype and function of dendritic cells in individuals with chronic periodontitis. *Arch Oral Biol.* 2013 Sep;58(9):1208-16. doi: 10.1016/j.archoralbio.2013.03.013.

Horewicz VV, Ramalho L, dos Santos JN, Ferrucio E, Cury PR. Comparison of the distribution of dendritic cells in peri-implant mucosa and healthy gingiva. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2013 Jan-Feb;28(1):97-102. doi: 10.11607/jomi.2487.

Abstract Article, Published on 22 Aug 2013

Yamashiro LH, **Horewicz VV**, Garcia MD, Báfica A. Modelling human granuloma to study the mechanisms by which isoniazid inhibits *Mycobacterium tuberculosis* growth. *Front. Immunol.*, doi: 10.3389/conf.fimmu.2013.02.01096.

Resumos em congressos:

Yamashiro LH, Soncini M, Eto C, **Horewicz VV**, Garcia MD, Rovaris D, Báfica A. Isoniazid controls *Mycobacterium tuberculosis* growth in human granuloma through a katg dependent pathway. *Infection Biology Retreat, Stockholm.* 2014.

Yamashiro LH, **Horewicz VV**, Garcia MD, Báfica A. Revisiting isoniazid mycobactericidal mechanism of action in human granuloma: role of t lymphocyte. XXXVIII Congress of the Brazilian Society for Immunology, Natal, RN. 2013.

Horewicz VV, Yamashiro LH, Garcia MD, Souza NM, Báfica A. Effects of isoniazid on a human *in vitro* granuloma model. XXXVII Congress of the Brazilian Society for Immunology, Campos do Jordão, SP. 2012.

Morales SLV, Souza NM, Nogueira L, **Horewicz VV**, Mansur D, Báfica A. Studies on a secreted *Mycobacterium tuberculosis* ricin-like lectin (SMTL-13) during initial interactions with macrophages. XXXVII

Congress of the Brazilian Society for Immunology, Campos do Jordão, SP. 2012.

Horewicz VV, Roman M, Souza N, Soares F, Garcia M, Báfica A. Microparticles as inert delivery systems in artificially-induced pulmonary granuloma. V Simpósio Sul de Imunologia. Florianópolis, SC. 2012.

Horewicz VV, Faria TJ, Roman M, Cruz AC, Báfica A. Nanoparticles modulate toll-like receptor-induced dendritic cells activation. XXXV Congress of the Brazilian Society for Immunology, Porto Alegre, RS. 2010.

Participações em eventos:

XI Fórum Internacional de Sepsis. São Paulo, SP. 2014.

X Fórum Internacional de Sepsis. Rio de Janeiro, RJ. 2013.

XXXVII Congress of the Brazilian Society for Immunology, Campos do Jordão, SP. 2012.

I Simpósio de Integração das Pós-graduações do CCB/UFSC. Florianópolis, SC. 2012.

V Simpósio Sul de Imunologia. Florianópolis, SC. 2012.

XXXV Congress of the Brazilian Society for Immunology. Porto Alegre, RS. 2010.

VII Fórum Internacional de Sepsis. Búzios, RJ. 2010.

Documentos de aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais

Adendo ao Protocolo PP00790

Aos Membros da CEUA

Trata-se de solicitação por parte do pesquisador Prof. Jamil Assreuy, para inclusão da aluna Verônica Vargas Horewicz do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia e Biociências - nível doutorado, matrícula n. 201007049 no protocolo acima identificado com o título de Metodologias utilizadas no Laboratório do Óxido Nítrico.

Considerando que não há nenhum impedimento relativo à presente solicitação, somos de parecer favorável à inclusão da aluna Verônica Vargas Horewicz neste protocolo.

Fpolis, 01/09/2014.

Resultado de Solicitação de Protocolo

Protocolo

PP00790

Título

Metodologias utilizadas no Laboratório do Óxido Nítrico

Data de Entrada

30/11/2012

Resultado:

Aprovado

Data/Prazo

05/09/2014

Considerações

Ofício nº 179/CEUA/PROPESQ/2014

Do: Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais- CEUA

Ao(ã): Prof(a) Dr(a) Jamil Assreuy, Departamento de Farmacologia - CCB

Prezado(a) Professor(a),

Em relação ao protocolo de pesquisa sob sua responsabilidade a CEUA deliberou o seguinte:

- APROVADA a inclusão de aluno neste protocolo.

Adita-se o Ofício nº 008/CEUA/PROPESQ/2013

Do: Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais-CEUA

Ao(ã): Prof(a) Dr(a) Jamil Assreuy, Departamento de Farmacologia - CCB

Prezado(a) Professor(a),

Em relação ao protocolo de pesquisa sob sua responsabilidade a CEUA deliberou o seguinte:

- APROVADO, por 48 meses, para a utilização de cinco mil camundongos (*Mus musculus*) e seis mil e quinhentos Ratos (*Rattus Norvegicus*)

- Procedência do animal: BIC/UFSC.

Por ocasião do término desse protocolo, DEVERÁ SER APRESENTADO RELATÓRIO detalhado relacionando o uso de animais no Projeto desenvolvido aos resultados obtidos, conforme formulário ONLINE CEUA.

Atenciosamente

Relatório Final previsto para (90 dias após término da vigência do protocolo ou no momento da apresentação de um novo protocolo)

Data 12/07/2017

Data 10/09/2014

Parecer(es):



**Prof. Assoc. Carlos Rogério Tonussi, D.Sc.
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – PRPE – UFSC
PRESIDENTE**

[Abrir Solicitação](#)

[Criar Relatório](#)



[Parecer01_PP00790.docx](#)



[Parecer02_PP00790.docx](#)



[Adendo_Pesquisador_PP00790.pdf](#)



[Parecer Final_PP00790.pdf](#)