

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Ciências Básicas da Saúde
Departamento de Bioquímica
Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica

**Efeito do peptídeo liberador de gastrina na
resposta inflamatória local e sistêmica:
envolvimento na sinalização
do receptor *Toll-like 4***

FABRICIA CARDOSO PETRONILHO

Orientador:

Prof. Dr. Felipe Dal-Pizzol

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Ciências Básicas da Saúde
Departamento de Bioquímica
Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica

**Efeito do peptídeo liberador de gastrina na
resposta inflamatória local e sistêmica:
envolvimento na sinalização
do receptor *Toll-like 4***

FABRICIA CARDOSO PETRONILHO

Orientador:

Prof. Dr. Felipe Dal-Pizzol

**Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas: Bioquímica, como requisito parcial para a obtenção do título
de Doutor em Bioquímica.**

Porto Alegre, Março de 2010

“Cultivem o espírito crítico. Se deixado de lado, ele não desperta idéias, nem estimula as grandes coisas. Sem ele, nada tem valor. Ele tem sempre a última palavra. Isso que lhes peço é o que, por sua vez, vocês devem pedir aos discípulos que vão formar, é o que há de mais difícil para o inventor. Acreditar que se encontrou um fato científico importante, sentir um desejo ardente de anunciá-lo, e ser obrigado durante dias, semanas e até durante anos a combater a si próprio, esforçando-se para desmentir suas próprias experiências e só proclamar sua descoberta quando esgotarem todas as hipóteses contrárias, sim, é uma tarefa árdua. Porém quando depois de tantos esforços chega-se, finalmente a certeza, sentimos uma das maiores alegrias que a alma humana pode experimentar...”

Louis Pasteur

*À minha mãe **Marlize**, e ao meu pai, **Antônio**, por todo apoio, carinho e amor em todas as etapas da minha vida. Por terem me proporcionado a oportunidade de conquistar o mais valioso de todos os bens, a cultura. E à minha irmã **Taise** minha eterna incentivadora, companheira e amiga.*

Meu eterno agradecimento.

Este trabalho é dedicado a vocês.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de iniciar os meus agradecimentos ao Prof. Dr. Felipe Dal Pizzol, não porque de praxe devemos fazê-lo ao Orientador, mas sim, porque foi ele quem me abriu as portas para conhecer o “mundo da pesquisa científica”. A sua sabedoria e competência aliadas a simplicidade o torna uma das pessoas mais admiráveis que conheci. Por isso agradeço pela chance de ser a sua orientanda desde o mestrado e poder trabalhar ao seu lado todos esses anos, por ter acesso aos seus conhecimentos valiosos e pelo incentivo e confiança em mim depositados. A você Felipe, minha eterna gratidão e admiração...

Ao Prof. Dr. Emílio Luis Streck, “Xuxa” e seus orientandos por toda ajuda e disponibilidade oferecida a este trabalho e pelo convívio no Laboratório de Fisiopatologia Experimental - UNESC, o nosso querido “triângulo”.

À Profa. Dra. Cristiane Ritter, do Laboratório de Intensivismo Experimental – UNESC, e seus bolsistas pela fundamental contribuição na disponibilização de dados e amostras de sangue dos pacientes.

Ao Prof. Dr. José Claudio Fonseca Moreira do Departamento de Bioquímica da UFRGS e seus bolsistas pela colaboração nos estudos *in vitro*.

Ao Prof. Dr. Francisco Garcia Soriano do Departamento de Medicina do Hospital Universitário da USP e sua equipe para os experimentos de RT-PCR.

Ao Prof Dr. Rafael Roesler e ao Prof. Dr. Gilberto Schwartzmann do Laboratório de Pesquisa do Câncer da UFRGS pela parceria na discussão dos estudos envolvendo a ação do peptídeo liberador de gastrina na inflamação.

Ao Prof Dr. João Quevedo, cujo entusiasmo pela ciência contagia a todos que com ele convivem.

À Profa. Dra. Tatiana Barichello pela amizade e palavras de incentivo em vários momentos e a Profa. Dra Patricia Fernanda Schuck, minha querida Pati uma pessoa maravilhosa que Deus deu de presente para o FISIOPAT, pelas valiosas dicas que só ela sabe dar e pela amizade, obrigada minha amiga cor-de-rosa.

Aos colegas do Laboratório de Fisiopatologia Experimental da UNESC: às ICs Bruna de Souza (Bruninha), que me ajudou nesse estudo até em dia de Natal; à vencedora de todos os prêmios, Francielle Mina (Fram Mina), à Francieli Vuolo, a minha Inha o meu anjinho; à Fabíola (Ti Bibi) minha companheira sempre e exemplo de amizade; à Francine que esta sempre pronta aos experimentos, à Angele, Riti e Vanessa. E as colegas de pós-graduação à Amanda e as inseparáveis Larissa Constantino (Lara) e Cristiane Damiani Tomasi (Cris), obrigada à todas por todo companheirismo e por fazerem parte da minha história no lab.

Aos colegas dos outros vértices do “triângulo” obrigada pelo convívio, e entre elas, as “Gis, Gisele, sempre disposta a ajudar e à Gislaine Tezza Rezin “meu toquinho” que só é pequena de tamanho mais é gigante pela força e honestidade, obrigada amiga pelo carinho, incentivo, pelo ombro consolador e por mostrar acreditar no meu potencial durante todo o tempo que trabalhamos juntas.

Aos colegas do NEUROLAB e LAFIBE, pelos momentos de descontração quando dividíamos o mesmo espaço... saudades daquela

época... à “Gi do Neuro” Gislaine Zilli Réus, minha amiga querida, minha companheira de congressos, dos cafezinhos, obrigada pela alegria do convívio.

À todos os ratos que fizeram parte desse estudo e aos pacientes, objetivo maior de toda atividade científica.

À Universidade do Extremo Sul Catarinense e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde por me acolherem tão bem durante todos esses anos.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pelo ensino gratuito e de qualidade, que possibilitou a realização de um sonho.

À Capes, pela bolsa de Doutorado e pela confiança que dedica aos pesquisadores e à pesquisa científica brasileira.

Aos meus pais, que propiciaram os meios e a estrutura onde me formei, intelectualmente e moralmente. Sem seu suporte e orientação, não teria tido as oportunidades de aprendizado que tive, nem saberia usar, de maneira ética, o que aprendi.

À amiga, companheira e irmã, Taise, minha Tequinha pelo constante incentivo e auxílio desmedido durante toda minha vida.

À Deus, que sempre esteve ao meu lado, nas minhas quedas, fraquezas, nas lutas e controvérsias, vitórias e derrotas. Obrigada por tudo o que vi, ouvi e aprendi durante esse tempo como doutoranda... obrigada pela vida.

A todos, meu eterno e inesquecível

“Muito Obrigada”

SUMÁRIO

PARTE I

Resumo.....	2
Abstract.....	3
Lista de Abreviaturas.....	4
I.1. INTRODUÇÃO	7
I.1.1. Definição e aspectos epidemiológicos da sepse.....	7
I.1.2. Fisiopatologia da sepse.....	10
I.1.3. Mecanismos moleculares de ação do LPS	12
I.1.4. Migração de neutrófilos	15
I.1.4.1. Aspectos gerais	15
I.1.4.2. Origem e mobilização de neutrófilos.....	16
I.1.4.3. Ação dos neutrófilos no foco infeccioso.....	18
I.1.4.4. Falência da migração de neutrófilos na sepse severa.....	20
I.1.3. Neuropeptídeos e inflamação	23
I.1.3.1 Bombesina/Peptídeo liberador de gastrina.....	24
I.1.3.2 Importância do GRP	25
I.1.3.3 RC-3095- um antagonista do receptor GRP	27
I.1.4 Modelos animais de inflamação pleural e sepse.....	29
I.2. OBJETIVOS.....	33
I.2.1. Objetivo Geral	33
I.2.2. Objetivos Específicos.....	33

PARTE II

Capítulo I - <i>Protective effect of gastrin-releasing peptide receptor antagonist in carrageenan-induced pleural inflammation in rats</i>	36
Capítulo II - <i>Antagonist of gastrin-releasing peptide receptors induces a protection from lethal sepsis: involvement of toll-like receptor 4 signaling</i>	44
Capítulo III - <i>Gastrin-releasing peptide receptor as a molecular target for inflammatory diseases</i>	92

PARTE III

III.1. DISCUSSÃO	98
III.2. CONCLUSÕES	111
III.3. PERSPECTIVAS.....	113
III.4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	115

PARTE I

Introdução e Objetivos

RESUMO

É bem estabelecido que respostas imunes possam ser influenciadas pelo sistema nervoso. O neuropeptídeo, peptídeo liberador de gastrina (GRP) tem sido detectado na produção e liberação de citocinas, em modelo animal e em humanos com doenças inflamatórias e sabe-se que o antagonista do receptor de GRP, RC-3095 modula a resposta de citocinas pro-inflamatórias em macrófagos ativados por lipopolissacarídeo (LPS) molhando a sobrevivência em modelo animal de sepse induzida por ligação e perfuração cecal (CLP). Neste contexto, neste estudo avaliamos o efeito modulatório de GRP em modelos animais de doenças inflamatórias agudas: injúria pulmonar associada à pleurisia induzida por carragenina e sepse induzida por CLP e adicionalmente, em pacientes sépticos através da correlação dos seus níveis com o desfecho clínico. Para esta proposta, no **Capítulo 1** avaliamos em pleurisia induzida por carragenina os seguintes parâmetros: migração celular, atividade da lactato desidrogenase, conteúdo de proteínas totais, concentração de nitrito/nitrato e níveis de TNF- α e IL- β no exsudato pleural e atividade da mieloperoxidase e marcadores de dano oxidativo em lipídios e proteínas no tecido pulmonar. Assim, o RC-3095 exibiu significativa ação anti-inflamatória através da inibição do influxo de leucócitos e bloqueio da mieloperoxidase, conteúdo de nitrito/nitrato e níveis de citocinas. Além disso, os resultados mostraram que RC-3095 exerce ação contra o dano oxidativo em lipídios e proteínas, bem como o aumento na viabilidade celular. Isto sugere que RC-3095 tem propriedades anti-inflamatórias que podem estar relacionadas com a redução do dano oxidativo. No **Capítulo 2**, entretanto, nós seguimos no modelo animal de sepse onde buscamos o entendimento do papel protetor que exerce o RC-3095. Vários estudos sugerem o envolvimento de TLR-4 como um importante elemento de defesa do hospedeiro durante a infecção, e importantes evidências indicam que esses receptores também possuem um papel na patofisiologia da sepse, onde camundongos deficientes de TLR-4 não apresentam falência na migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal durante a sepse polimicrobiana induzida por CLP letal, e como conseqüência, foram mais resistentes para sepse que controles. Nossos resultados indicam que este efeito protetor pode ser atribuído para uma atenuação de sinalização de TLR-4 em cultura de células RAW 264.7 estimuladas por LPS e tecido pulmonar em ratos CLP, levando a uma diminuição de citocinas pro-inflamatórias as quais a via de ativação de GRPR mostra seletividade como verificado no **Capítulo 3**, possibilitando a explicação dos baixos níveis de citocinas pro-inflamatórias em pacientes sépticos tratados com RC-3095. Esta atenuação favorece a infiltração de neutrófilos, resultando na diminuição de bacteremia preservando o controle da infecção no local melhorando o desfecho da sepse. Nossos resultados ainda mostram que níveis plasmáticos de GRP podem prever o desfecho na sepse, mas não em pacientes SIRS sugerindo que GRP exerce funções diferenciais nas duas condições e sugere que o antagonismo de GRPR modula a inflamação incontrolada por agir em respostas mediadas por TLR-4 e funcionalidade imunoregulatória. Em conclusão, os presentes resultados indicam que o antagonista de GRPR exerce um papel na inflamação aguda e pode ser utilizado como uma nova terapia alternativa para sepse bacteriana Gram-negativa.

ABSTRACT

It is well established that immune responses may be influenced by the nervous system. The neuropeptide gastrin-releasing peptide (GRP) has been detected on the production and release of cytokines, both in animal models and humans with inflammatory diseases and reported that the GRP receptor antagonist RC-3095 modulates the response of proinflammatory cytokines in activated macrophages by lipopolysaccharide and improved the survival in an animal model of sepsis induced by cecal ligation and puncture (CLP). Within this context, in this work we evaluate the GRP modulatory effect in animal models of acute inflammatory illnesses: lung injury associated with carrageenan-induced pleurisy, and in CLP-induced sepsis and additionally in septic patients through the correlations of its levels with the clinical outcome. For this purpose, in **Chapter 1** we evaluated in carrageenan-induced pleurisy the following parameters: cell migration, lactate dehydrogenase activity, total protein content, nitrite/nitrate concentration, TNF- α and interleukin-1 β (IL-1 β) levels in pleural exudates; myeloperoxidase activity and lipid and protein oxidative damage markers in lung tissue. Thus, RC-3095 exhibited pronounced anti-inflammatory actions by inhibition of leukocyte influx and blockade of myeloperoxidase, nitrite/nitrate content and cytokine levels. Moreover, the results showed that RC-3095 elicits action against oxidative damage in lipids and proteins, as well as increases cell viability. These suggest that RC-3095 has anti-inflammatory properties that can be related with the reduction of oxidative damage. In **Chapter 2**, however, we follow the animal model of sepsis where we search the agreement of the protective role that RC-3095 exerts. Increasing evidences suggest the evolvement of TLR-4 as an important element of host defense during an infection, a growing body of evidence indicates that these receptors also may play a role in the pathophysiology of sepsis where TLR-4 defective mice did not present failure of neutrophil migration to the peritoneal cavity during polymicrobial sepsis induced by lethal CLP, and as consequence, they were more resistant to sepsis than controls. Our results further indicate that this protective effect can be attributed to an attenuation of TLR-4 signaling in RAW 264.7 cell culture stimulated by LPS and lung tissue in CLP rats, leading to a decrease of release of proinflammatory cytokines which the pathway of activation of GRPR shows selectivity as verified in **Chapter 3**, and can additionally explain the lower levels of the proinflammatory cytokine in RC-3095-treated septic patients. This attenuation favors neutrophil infiltration, resulting in decreased bacteremia preserving the control of infection *in situ* improving sepsis outcome. Our finding still show that plasma GRP levels could predict outcome in sepsis but not SIRS patients suggesting that GRP plays different roles in the two conditions and suggest that GRPR antagonism modulates uncontrolled inflammation by targeting TLR-4-mediated responses and immunoregulatory functionality. Taken together, the present results indicate that a GRPR antagonist plays a role in acute inflammation and could be developed as a new alternative therapy for Gram-negative bacterial sepsis.

LISTA DE ABREVIATURAS

BASES - *brazilian sepsis epidemiological study*

BN – bombesina

BNPs – peptídeos relacionados à bombesina

C5a – quinto fragmento do sistema complemento ativado

CLP – ligação e perfuração cecal

EROs – espécies reativas de oxigênio

ERK1/2 – quinase regulada por sinais extracelulares 1/2

G-CSF – fator de estimulação de colônias de granulócitos

GPI – glicosilfosfatidilinositol

GPCR – receptor acoplado a proteína G

GRK-2 – quinase 2 do receptor acoplado a proteína G

GRK-5 – quinase 5 do receptor acoplado a proteína G

GRO- α – oncogene relacionada ao crescimento - α

GRP – peptídeo liberador de gastrina

GRPR – receptor do peptídeo liberador de gastrina

HO-1 – heme oxigenase -1

ICAMs – molécula de adesão intrecelular

ICAM -2 – molécula de adesão intracelular – 2

IFN- γ – interferon- γ

IL-1 β – interleucina-1 β

IL-6 – interleucina – 6

IL-8 – interleucina – 8

IL-10 – interleucina -10

IL-12 – interleucina -12

iNOS – óxido nítrico sintase induzível

IRAK – quinase associada ao receptor de IL-1

IRF-1 – fator regulatório de interferon-1

JAK/STAT – janus quinase/transdutora de sinais e ativadora de transcrição

JNK – quinase n-terminal c-Jun

KC – quimiocina derivada de queratinócitos

LBP – proteína ligadora de LPS

LPS – lipopolissacarídeo

LTA – ácido lipoteicóico

LTB₄ – leucotrieno B₄

MCP-1 – proteína quimiotática de monócitos - 1

MD2 – proteína de diferenciação mielóide - 2

MIP-1 α – proteína inflamatória de macrófagos - 1 α

MIP-1 β – proteína inflamatória de macrófagos - 1 β

MIP2 – proteína inflamatória de macrófagos 2

MyD88 – fator de diferenciação mielóide humano 88

NADPH – nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

NETs – *neutrophil extracellular traps*

NF- κ B – fator nuclear- κ B

NK – *natural killer*

NMB – neuromedina B

NMC – neuromedina C

NO – óxido nítrico

PAF – fator de agregação plaquetária

PAMPs – padrões moleculares associados a patógenos

PECAM – molécula de adesão plaquetária

PI3K – fosfatidilinositol 3 quinase

PPRs – receptores de reconhecimento de padrões

SDF-1 – fator derivado de estroma da medula óssea

SIRS – síndrome da resposta inflamatória sistêmica

SNC – sistema nervoso central

TIR – domínio intracelular *Toll*/interleucina -1

TIRAP – proteína adaptadora contendo o domínio TIR

TLRs – receptores *toll-like*

TLR-2 - receptor *toll-like-2*

TLR-3 – receptor *toll-like-3*

TLR-4 – receptor *toll-like-4*

TNF- α – fator de necrose tumoral – α

TRAF6 – fator 6 associado ao receptor de TNF

TRAM – molécula adaptadora relacionada ao TRIF

TRIF – domínio TIR contendo adaptador do indutor de interferon β

UTI - unidade de terapia intensiva

VCAMs – molécula de adesão vascular

VIP – peptídeo vasoativo intestinal

I.1. INTRODUÇÃO

I.1.1. Definição e aspectos epidemiológicos da sepse

Todo processo infeccioso desencadeia uma resposta inflamatória do hospedeiro, cuja magnitude pode variar de indivíduo para indivíduo. A interação complexa entre o organismo e o agente causador da infecção resulta no processo fisiopatológico que antigamente era definido como septicemia e hoje é denominado sepse (Vicent e Korhut, 2008).

Em 1879-80, Louis Pasteur encontrou pela primeira vez, bactérias no sangue de uma paciente que sobreviveu à sepse e assim as diferentes etapas desse processo, foram inicialmente definidas por Willian Osler em 1892 (Baron, Baron e Perrella, 2006). Aproximadamente um século após a observação feita por Pasteur é que finalmente se chegou a um consenso sobre a definição de sepse. A relativa demora se deve principalmente à dificuldade de identificação desta síndrome por clínicos e pesquisadores, uma vez que os sinais e sintomas clínicos variam enormemente dependendo do estágio em que o paciente se encontra (Annane, Bellissant e Cavaillon, 2005). E em 1991 na Conferência de Consenso feita pela *American College of Chest Physicians and the Society of Critical Care Medicine* foram estabelecidos critérios para a classificação de sepse e doenças similares (Bone et al., 1992).

Optou-se por enquadrá-las como síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS). Além disso, ficou estabelecido também que o termo sepse deveria ser utilizado nos casos onde a infecção é documentada, pois a SIRS pode ser causada por diversos outros insultos (além da infecção por bactérias,

vírus e fungos), considerados como “estéreis”, tais como trauma, queimaduras, choque hemorrágico e pancreatite aguda (Beishuizen, Vermes e Haanen, 1999). Esta medida foi necessária para adequação do tratamento à fase de evolução da síndrome em que o paciente se encontra. Esses parâmetros vêm sendo reavaliados nas subseqüentes conferências e hoje compõe as diretrizes da “*Surviving Sepsis Campaign*” para diagnóstico precoce e tratamento adequado em cada etapa do processo fisiopatológico da sepse, com objetivo único de diminuir a taxa de mortalidade (Dellinger et al., 2008; Vicent e Korhut, 2008).

O desenvolvimento de alterações clínicas, hematológicas, bioquímicas e imunológicas associadas à infecção caracteriza a sepse, a qual quando complicada pela disfunção orgânica é denominada sepse severa. O choque séptico se refere a um estado de falência circulatória aguda com hipotensão arterial apesar da reposição volêmica, fazendo-se necessário a terapia vasopressora para manutenção de uma pressão arterial a valores aceitáveis (Vicent e Korhut, 2008).

A ocorrência de falência orgânica segue um padrão comum: a disfunção pulmonar ocorre quase sempre e precoce, persiste durante o choque, que também ocorre precocemente, e se resolve rapidamente ou é fatal. Sérias anormalidades da função hepática, coagulação e manifestações neurológicas tendem a ocorrer horas ou dias após o início da sepse e persistem por tempo indeterminado (Bone, 1996; Nathens e Marshall, 1996; Warren, 1997; Hotchkiss e Karl, 2003). O número de falências orgânicas, além da gravidade destas, afeta o prognóstico do paciente, pois cada órgão adicional em falência acrescenta de 15-20% a taxa de mortalidade (Boné, 1992; Warren, 1997, Friedman, Silva e Vicent, 1998; Hotchkiss e Karl, 2003).

Apesar do desenvolvimento crescente de diversos métodos diagnósticos e terapêuticos, as taxas de mortalidades globais da sepse permanecem inaceitavelmente altas, variando, conforme o estudo, de 20 a 80% (Zannon et al., 2002). Sepse e choque séptico juntos representam a causa mais importante de morte em unidades de terapia intensiva (UTIs) de adultos, superando as doenças cardiovasculares (Nguyen et al., 2006). Dados dos Estados Unidos indicam que ocorrem aproximadamente 751.000 casos de sepse por ano (Remick, 2007). No Brasil, dados do “Brazilian Sepsis Epidemiological Study” (BASES) mostram que a sepse é o maior problema de saúde pública em UTIs brasileiras, com uma alta incidência (cerca de 57 pacientes-dia por 1000), altas taxas de mortalidade (33,9% para sepse, 46,9% para sepse grave e 52,3% para choque séptico) e altos custos (Silva et al., 2004). Um estudo observacional multicêntrico, realizado em pacientes sépticos de 21 UTIs de hospitais públicos e privados do Brasil, no período de outubro de 2003 a março de 2004, estimou uma média de custo de US\$ 9.632 por internação, com um custo médio diário de US\$ 934 por paciente (Sogayar et al., 2008).

A análise conjunta desses dados nos dá a dimensão dos enormes custos sociais e econômicos que a sepse representa, em vidas perdidas, em perda de capacidade produtiva e em dispêndio direto. Ainda que nos últimos anos, ocorreram importantes avanços no entendimento da fisiopatologia da sepse e que estudos multicêntricos tenham identificado intervenções benéficas no manejo da sepse, como a manutenção adequada dos parâmetros hemodinâmicos e o uso precoce da antibioticoterapia, com a sua elevada mortalidade torna essencial a busca de novas alternativas de tratamento (Carvalho e Trotta, 2003).

I.1.2. Fisiopatologia da sepse

A fisiopatologia da sepse está relacionada com uma interação complexa entre o hospedeiro e o microorganismo infectante. Os mecanismos de reconhecimento específico, componentes da resposta inata, têm sido caracterizados como uma via de controle da imunidade adquirida. Esses mecanismos são deflagrados por receptores de membrana celular, que, por sua vez, são ativados com o reconhecimento do microorganismo através de estruturas conservadas, constitutivamente expressas na superfície dos patógenos, denominadas padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs) (Cinel e Dellinger, 2007). Assim, os fatores desencadeadores da ativação celular e da cascata de eventos plasmáticos são principalmente os componentes da parede celular dos microorganismos, como o ácido lipoteicóico (LTA) e peptideoglicados, derivados de bactérias Gram-positivas (exotoxinas), ou o lipopolissacarídeo (LPS), no caso de bactérias Gram-negativas (endotoxinas).

O LPS e as exotoxinas são liberados normalmente durante a replicação da bactéria e/ou como consequência de sua morte, devido a lise da parede celular. Diversos receptores foram encontrados nos últimos anos, capazes de reconhecer essas moléculas e ativar assim, a resposta imune inata (Triantafilou e Triantafilou, 2002). Dessa forma os PAMPs são reconhecidos por receptores encontrados em células do sistema imune inato como neutrófilos polimorfonucleares, macrófagos e células dendríticas. Esses receptores são denominados de receptores de reconhecimento de padrões (PPRs). Entre os membros mais importantes dos PPRs destacam-se os receptores *Toll-like*

(TLRs). Tais receptores são uma família de receptores transmembrana do tipo 1, codificados em linhagem germinativa e não clonais, que são caracterizados por domínios extracelulares repetitivos ricos em leucina e um domínio citoplasmático homólogo ao receptor de interleucina-1 (IL-1) (Weighardt e Holzmann, 2007).

O primeiro receptor da família *Toll* foi identificado em *Drosophila* como componente da via de sinalização que controla a polaridade dorso-ventral em embriões, e, além disso, com importante participação na resposta imune de moscas adultas, o que pode ser demonstrado pelo fato de moscas com mutação que lhes confira perda da função do gene *Toll*, tornam-se altamente suscetíveis a infecções fúngicas (Lemaitre et al., 1996). Atualmente, 11 homólogos humanos dos TLRs foram identificados e, se não todos, a maioria envolvida no reconhecimento dos principais padrões microbianos (Hopkins e Sriskanda, 2005) existindo a evidência de que o polimorfismo de proteínas dos TLRs pode explicar em parte a grande variabilidade de respostas individuais aos estímulos infecciosos (Lorenz et al., 2000).

Portanto, de um modo geral, após a interação inicial PAMPs-PPRs acontece ativação da resposta imune inata com a finalidade de coordenar uma resposta defensiva envolvendo componentes humorais e celulares. Nesse contexto, com tal interação, células residentes têm um papel chave, liberando uma grande variedade de moléculas sinalizadoras como prostaglandinas, leucotrienos, citocinas e quimiocinas que desencadeiam a resposta inflamatória, culminando no recrutamento e ativação de leucócitos para o local da infecção, representando uma das funções mais importantes da imunidade inata (Janeway, 2001; Janeway, 2002). No entanto, a interação de vários

componentes como infecciosos, imunológicos, endócrinos, hemodinâmicos, cardiovasculares e até mesmo genéticos (De Maio, Torres e Reeves, 2005; Remick, 2007), pode levar a uma resposta exacerbada do organismo com produção de vários mediadores inflamatórios e consequentes alterações fisiológicas (Annane, Bellissant e Cavailon, 2005; Rocha, Oliveira e Farias-Corrêa, 2006).

I.1.3. Mecanismos moleculares de ação do LPS

Diversos estudos mostram a importância do LPS como fator desencadeador da sepse como o estudo demonstrado após a sua administração em humanos saudáveis, com reprodução de alterações hemodinâmicas observadas em pacientes com sepse e em modelos experimentais sendo provavelmente a estrutura com maior atividade imunoestimulatória entre os componentes de bactérias, incluindo a produção de citocinas pró-inflamatórias como interleucina-1 β (IL-1 β), fator de necrose tumoral- α (TNF- α), interleucina -12 (IL-12) e substâncias inflamatórias efetoras como o óxido nítrico (NO) (Sufradini et al., 1989).

Em bactérias Gram-negativas, o LPS tem papel determinante no reconhecimento deste grupo bacteriano. A membrana externa de Gram-negativos é composta por uma dupla camada lipídica, separada da membrana citoplasmática por uma camada de peptidoglicano. O LPS está embebido na porção externa através de sua porção lipídica (o lipídio A) (Akira, Uematsu e Takeuchi, 2006).

A falta de um receptor para LPS foi durante muitos anos uma barreira no entendimento de como bactérias Gram-negativas disparavam a resposta inflamatória que resultava no choque séptico. Porém, uma série de estudos mostram que a ativação de macrófagos estimulados por LPS é dependente da presença de proteínas ligadoras de LPS (LBP) e da proteína de membrana CD-14 (Cohen, 2002; Liew, Xu e Brint, 2005). A LBP é uma proteína de fase aguda que catalisa a transferência do LPS para CD-14 potencializando a ativação de macrófagos induzida por LPS de 100 a 1.000 vezes. O CD-14 foi originalmente identificado como um co-receptor essencial na ativação de monócitos por LPS e trata-se de uma proteína ancorada à membrana através de uma âncora glicosilfosfatidilinositol (GPI) (Cohen, 2002; Heumann e Roger, 2002; Liew, Xu e Brint, 2005).

Embora a descoberta do CD-14 tenha representado um importante passo na compreensão de como o hospedeiro responde ao LPS, o fato de CD-14 não possuir um domínio intracelular tornava obscura a maneira pela qual a interação LPS-LBP-CD-14 induzia ativação celular (Beutler e Poltorak, 2001). Portanto como descrito anteriormente, um componente da família dos receptores *Toll* se faz presente. O CD-14 em conjunto com a proteína de diferenciação mielóide-2 (MD-2) uma pequena molécula sem região transmembrana, participam da apresentação de LPS para o receptor similar ao *Toll* e em 1998, Poltorak e colaboradores, mostraram que a sinalização pelo LPS é transmitida pelo receptor *Toll-like-4* (TLR-4) o primeiro membro da família a ser caracterizado em mamíferos (Poltorak et al., 1998).

TLR-4 transmite um sinal de ativação onde o domínio intracelular *Toll*/Interleucina-1 (TIR) interage com quatro moléculas adaptação do domínio

TIR. Todas compartilham uma sequência significativa de aminoácidos similares. São elas o fator de diferenciação mieloide humano 88 (MyD88), a proteína adaptadora contendo o domínio TIR (TIRAP), a domínio TIR contendo o adaptador do indutor de interferon- β (TRIF) e a ~~é~~ proteína adaptadora relacionada ao TRIF (TRAM). Atualmente está claro que a MyD88 e TRIF promovem uma plataforma central para a propagação de sinais complexos dos TLRs via associação direta com quinases e fatores de transcrição (Yamamoto et al., 2003; Honda et al, 2004). Na ativação do receptor, a MyD88 é recrutada via seu próprio domínio TIR que então interage com o domínio TIR do TLR em questão. Isso favorece o recrutamento e ativação da família de quinases conhecida como a quinase associada ao receptor IL-1 (IRAKs) 1, 2 e 4. A IRAK 4 é recrutada primeiramente, torna-se ativa e fosforila a IRAK 1. Estas quinases interagem com a MyD88 através do domínio de morte comum a ambas as proteínas, promovendo então a ativação do fator 6 associado ao receptor de TNF (TRAF6). Esse evento resulta na ativação de quinases situadas na seqüência do processo de sinalização com a liberação do fator nuclear- κ B (NF- κ B) que transloca para o núcleo e aumenta a expressão gênica de citocinas inflamatórias determinando, por fim, uma resposta pró-inflamatória (Akira e Takeda, 2004).

Dependendo de qual molécula de adaptação esteja envolvida, o processo de resposta dos TLRs pode ser dividido em duas categorias: de resposta precoce dependente de MyD88 onde estão envolvidos MyD88 e TIRAP, vitais para a ativação de NF- κ B pelo TLR-4, e de resposta tardia que independe de MyD88 e tem envolvimento de TRAM e TRIF, sendo este

utilizado pelo receptor *toll-like-3* (TLR-3) na indução da síntese de interferon do tipo 1 (Sato et al., 2003).

I.1.4. Migração de neutrófilos

I.1.4.1. Aspectos gerais

Conforme descrito anteriormente, o recrutamento leucocitário para o local de injúria celular é uma das etapas essenciais da defesa do organismo contra um agente agressor. Nos estágios iniciais de variados processos infecciosos, incluindo infecções por fungos, vírus e bactérias, o leucócito predominante é o neutrófilo, permanecendo em geral de 12-24 horas no local da injúria. Após esse período, o neutrófilo inicia um processo de morte programada (apoptose), sendo em seguida fagocitado por macrófagos. A partir da décima hora surgem progressivamente os eosinófilos, macrófagos e linfócitos, permanecendo por cerca de uma semana no local, isto se o agente agressor for removido, caso contrário, ocorre a cronificação do processo (Gallin e Snyderman, 1999). Todavia, existem diferenças no tipo e cinética de leucócitos dependendo do agente agressor. A migração de neutrófilos durante a resposta inflamatória resulta principalmente da liberação, por células residentes de fatores quimiotáticos. Destacando-se os mediadores lipídicos, como o PAF e o leucotrieno B₄ (LTB₄) fragmentos do complemento, como o quinto fragmento do sistema complemento ativado (C5a), citocinas e uma variedade de quimiocinas, incluindo interleucina-8 (IL-8), oncogene relacionada ao crescimento – α (GRO- α), fator derivado do estroma da medula óssea (SDF-1), quimiocina derivada de queratinócitos (KC), proteína inflamatória de

macrófagos-1 α (MIP-1 α), proteína inflamatória de macrófagos-1 β (MIP-1 β) e proteína inflamatória de macrófagos-2 (MIP-2) no sítio inflamatório formando um gradiente de concentração dessas substâncias que é fundamental para o correto direcionamento dos leucócitos para o foco inflamatório (Harkness, 1981; Lee et al., 2002).

I.1.4.2. Origem e mobilização de neutrófilos

O número de neutrófilos no sangue periférico é usualmente constante, mas o hospedeiro é capaz de aumentar significativamente a quantidade. A origem dos neutrófilos acontece a partir de células tronco da medula óssea com a influência de fator de estimulação de colônias de granulócitos (G-CSF) e podem ser rapidamente mobilizados durante reações inflamatórias tais como nas primeiras fases de sepse. Essa liberação de neutrófilos da medulla óssea resulta em um grande aumento do número de neutrófilos circulantes disponíveis para serem recrutadas ao sítio de inflamação (Furze e Rankin, 2008). A migração dessas células do compartimento intravascular para o extravascular ocorre predominantemente nas vênulas pós-capilares, sendo mediadas por uma combinação de processos mecânicos, químicos e moleculares. Tais eventos distintos estão ligados em uma sequência temporal (Seely e Pascual, 2003). Inicia-se com a marginação ou movimento dos neutrófilos do fluxo central para a periferia do vaso. Esse mecanismo ocorre através da interação molecular entre a superfície celular de neutrófilos e células endoteliais, resultando no rolamento de neutrófilos ao longo da parede do vaso. Tal interação é dependente de forças físicas e moleculares sendo mediado por selectinas e seus ligantes. Selectinas são uma família de moléculas de adesão

incluindo L-selectina, expressa constitutivamente exclusivamente em leucócitos circulantes, E-selectina (expressa em células endoteliais), e P-selectina (expressa em plaquetas e células endoteliais) após a ativação por quimiocinas e outros mediadores inflamatórios. A combinação do contato de baixa afinidade entre neutrófilos e células endoteliais e ativação de quimiocinas induzem a expressão de moléculas de adesão que permitem a ligação de alta afinidade, que compreende a segunda fase da migração. Essa fase é estabelecida pela interação entre integrinas leucocitárias, principalmente β_2 -integrinas com as moléculas-membros da superfamília das imunoglobulinas, molécula de adesão vascular (VCAM) e molécula de adesão intracelular (ICAM) expressas pelo endotélio, quando ativado. As integrinas estão normalmente expressas nos leucócitos em um estado de baixa afinidade por ligantes. No entanto, durante o rolamento, os leucócitos passam a interagir com quimiocinas como IL-8 e as quimiocinas da família GRO, que se encontram ancoradas na superfície das células endoteliais, resultando na ativação dos leucócitos promovendo alterações conformacionais nas integrinas presentes nos leucócitos em rolamento, que aumentam a sua capacidade adesiva. Conseqüentemente o rolamento é interrompido e os leucócitos aderem firmemente ao endotélio vascular (Huttenlocher, Sandborg e Horvitz, 1995; Meng et al., 2004).

O estágio final do recrutamento de neutrófilos é a passagem através da parede endotelial para o tecido inflamado. Essa etapa também envolve as integrinas leucocitárias e uma interação adesiva posterior, envolvendo uma outra molécula chamada molécula de adesão plaquetária (PECAM), e molécula de adesão intracelular-2 (ICAM-2), que são expressas tanto nos leucócitos como nas junções intracelulares das células endoteliais. Essas interações entre

leucócitos e células endoteliais permitem, finalmente, que o leucócito penetre nas junções intracelulares das células endoteliais e degradem a membrana basal com o auxílio de enzimas proteolíticas, ultrapassando finalmente a barreira endotelial (Huttenlocher, Sandborg e Horvitz, 1995; Meng et al., 2004). Uma vez que isso ocorre, o processo é guiado por um gradiente de concentração de quimiocinas conhecido como quimiotaxia. Entre as várias moléculas quimioatraentes destacam-se IL-8, quimiocinas da família Gro, bem como os mediadores lipídicos LTB₄, PAF e C5a que são produzidos primeiramente pelas células residentes no local de inflamação. A ligação das moléculas quimioatraentes aos leucócitos ocorre por meio de receptores específicos levando a uma complexa interação dos elementos do citoesqueleto dos leucócitos, como a polimerização da actina, permitindo que os leucócitos migrem em direção ao foco de inflamação (Reddy e Standiford, 2010).

I.1.4.3. Ação dos neutrófilos no foco infeccioso

Todos esses eventos que ocorrem, são responsáveis, portanto, pelo papel fundamental dos neutrófilos na circunscrição e controle do foco infeccioso. Uma vez no foco infeccioso, são capazes de engolfar os patógenos por meio de um processo conhecido como fagocitose, resultando na formação de vesículas citoplasmáticas formadas pela fusão dos fagossomas e dos lisossomas (Janeway e Medzhitov, 2002). Através dessa fusão os neutrófilos iniciam uma potente defesa antimicrobiana onde pode ser dividida em um processo dependente e independente de oxigênio. Mecanismos dependentes de oxigênio envolvem a transformação de oxigênio molecular em uma família de espécies reativas de oxigênio (EROs) que são liberadas nos fagossomos ou

no ambiente extracelular (Hampton, Kettle e Winterbourn,1998). Esses intermediários são altamente reativos com moléculas biológicas importantes causando peroxidação de lipídios, modificações estruturais de proteínas e dano ao DNA, levando a morte do microorganismo. A geração de EROs requer o complexo enzimático conhecido como nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidase na membrana fagossomal que transfere elétrons para o NADPH no citoplasma para o oxigênio molecular dentro do fagossomo iniciando a geração de EROs através de um processo conhecido como *burst* respiratório. Produtos importantes dessa reação são ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxil (OH^\cdot), ácido hipocloroso (HClO) e peroxinitrito ($ONOO^-$) (Marshall, 2005).

Os efetores da defesa antimicrobiana de neutrófilos independentes de oxigênio estão contidos em grânulos no citoplasma dos neutrófilos conhecidos como grânulos azurófilos ou primários (Faurichou e Borregaard, 2003). Essas estruturas contêm uma variedade de proteínas pré-formadas que são liberadas no fagossomo durante o processo de morte microbiana como defensinas, elastase e lactoferrinas (Marshall, 2005) . Ainda em uma descoberta recente revelou que durante a ativação de neutrófilos, estes liberam sua cromatina para o meio extracelular conhecido como NETs (do inglês *neutrophil extracellular traps*). A cromatina extracelular forma uma espécie de “teia” que aprisiona bactérias, ao mesmo tempo que concentra a atividade bactericida da elastase e das histonas, sobre a bactéria liberando mediadores inflamatórios, como citocinas e eicosanóides, com extrema importância na defesa do hospedeiro, promovendo a ativação celular, recrutamento de mais leucócitos para o sítio infeccioso e indução da atividade microbicida (Clark et al., 2007).

I.1.4.4 Falência da migração de neutrófilos na sepse severa

Conforme mencionado anteriormente, neutrófilos são conhecidos por exercer um importante papel na resposta inflamatória por uma série de funções efetoras que representam um mecanismo central de imunidade contra infecções (Nathan, 2006; Appelberg, 2007). Dessa forma, o recrutamento de neutrófilos é um evento chave para o controle do processo infeccioso visto que o desequilíbrio desse processo pode ser verificado em diferentes patologias onde encontra-se uma redução na quimiotaxia *in vitro*, além da diminuição de migração para o tecido infectado em modelos *in vivo*, resultando no aumento da suscetibilidade do hospedeiro à infecção (Pereira, Sannomiva e Leme, 1987; Mastroianni et al., 1999; Fiúza, 2002). Da mesma forma, estudos mostram que em modelo animal de sepse severa por ligação e perfuração cecal (CLP) encontra-se a falência da migração de neutrófilos para o foco infeccioso, associado ao número de bactérias aumentado no exsudato peritoneal e sangue, seguido pela inflamação sistêmica caracterizada pelo aumento dos níveis de citocinas e quimiocinas circulantes e o seqüestro de neutrófilos para o pulmão e redução da taxa de sobrevivência (Alves-Filho et al., 2006a). Assim como em modelo animal, neutrófilos em pacientes sépticos apresentam uma supressão da resposta quimiotática por diferentes estímulos que associado ao índice de mortalidade dos pacientes (Tavares-Murta et al, 2002).

Diferentes mecanismos estão envolvidos no desequilíbrio desse sistema. Entre as investigações no entendimento de tais mecanismos, verifica-se a redução da expressão do receptor CXCR-2 um dos receptores da quimiocina IL-8 que se associa a diminuição na função quimiotática dos neutrófilos em

pacientes com sepse grave além da relação entre a sua redução e a piora dos índices prognósticos de pacientes com sepse tornando-se claro a importância da presença de tais receptores em neutrófilos na prevenção e controle de insultos infecciosos (Chishti et al., 2004). Embora os mecanismos envolvidos na falência da migração de neutrófilos devido a dessensibilização e internalização desses receptores não serem completamente entendidos, a produção excessiva de citocinas e quimiocinas circulantes, proteínas de fase aguda, aumento da atividade de óxido nítrico sintase induzível (iNOS), heme oxigenase-1 (HO-1) e ativação sistêmica de TLRs são associados a esse fenômeno (Alves-Filho et al., 2008).

Conforme mencionado, TLRs são componentes essenciais na resposta imune inata contra a infecção, no entanto, diferentes evidências indicam que podem desempenhar um papel importante na patofisiologia da sepse (Meng et al., 2004). Durante uma infecção polimicrobiana onde componentes estruturais de diferentes bactérias levam a ativação de vários TLRs, a ativação de um deles é suficiente para o desencadeamento de uma eficiente resposta inflamatória local. Por outro lado, a sinalização excessiva de todos os receptores leva à geração de uma resposta inflamatória sistêmica que é caracterizada pela excessiva produção e liberação de citocinas e quimiocinas na circulação (Alves-Filho et al., 2008). Esse fato leva, portanto, a dessensibilização e internalização de receptores CXCR2 por sua ativação constante e excessiva de quimiocinas na sepse severa.

Durante a sepse, acontece um aumento de duas enzimas conhecidas como a quinase 2 e a quinase 5 do receptor acoplado a proteína G (GRK-2 e GRK-5, respectivamente). Essas enzimas promovem a fosforilação de

receptores quimiotáticos, que pertencem a família dos receptores acoplados a proteína G (GPCR), levando a sua dessensibilização e internalização, resultando na redução significativa da sinalização intracelular que culmina na redução da polimerização da actina nos neutrófilos (Fan e Malik, 2003).

Nesse sentido, neutrófilos de pacientes sépticos em comparação com neutrófilos controle mostram um aumento da expressão de GRK2 e GRK5 (Arraes et al., 2006). Similarmente, a indução de células de pacientes controle saudáveis com LPS levam a *up-regulation* na expressão de GRK2 em neutrófilos. Esses dados sugerem que o aumento de mediadores inflamatórios sistêmicos na sepse podem aumentar a estimulação de neutrófilos circulantes, induzindo a expressão de GRK e a fosforilação de GPCR. Assim, a dessensibilização de GPCR muito provavelmente induzida pelo aumento na produção de mediadores em pacientes com sepse severa podem ser responsável pelos neutrófilos não responderem a quimioatraentes durante a sepse (Carvalho et al., 2008).

Recentemente, foi investigado o papel crucial de TLRs durante sepse polimicrobiana, onde foi demonstrado que a ativação sistêmica de TLR-2 e TLR-4 prejudica a migração de neutrófilos para o sítio de infecção por *down-regulating* a expressão de CXCR2 em neutrófilos circulantes (Alves-Filho et al., 2006a; Alves-Filho et al., 2009). Além disso, essa redução de CXCR2 foi restabelecida através da inibição genética TLR-2 ou TLR-4, bem como pela inibição farmacológica e genética de iNOS (Rios-Santos et al., 2007).

De um modo geral portanto, a falência de neutrófilos que pode resultar na falência orgânica e alta mortalidade estando associada à ativação sistêmica de TLRs na sepse severa. O conjunto dos dados sugerem que a falência da

migração neutrofílica para o foco infeccioso compromete diversas etapas da migração celular, incluindo a dessensibilização e internalização de receptores de fatores quimiotáticos redução da sinalização intracelular envolvida na quimiotaxia e redução do rolamento e adesão dos neutrófilos ao endotélio vascular resultando no aumento da disseminação bacteriana (Alves-Filho et al., 2008).

Portanto, os receptores TLR como TLR-4 exercem um papel central na patogênese de sepse, sendo um alvo no desenvolvimento de novas terapias antisepticas (Matsuda e Hattori, 2006).

I.1.3. Neuropeptídeos e inflamação

Atualmente o tratamento de sepse inclui o controle precoce do processo infeccioso, o suporte hemodinâmico com reposição volêmica e drogas vasoativas para otimização da oferta e consumo de oxigênio tecidual, correção dos distúrbios da coagulação, glicocorticóides, controle à glicemia e suporte às disfunções orgânicas como a oxigenoterapia e a ventilação mecânica (Azevedo, Park e Schettino, 2008). Assim, o controle do processo inflamatório é um dos objetivos mais pesquisados na biologia do paciente séptico. Nesse sentido, interessante nos últimos anos tem-se dado ênfase no estudo de neuropeptídeos como tratamento de doenças inflamatórias.

Neuropeptídeos são peptídeos liberados por neurônios que atuam como mensageiros intracelulares, exercendo inúmeras funções modulatórias do sistema nervoso. O espectro da sua ação é restrito, isto se dá de acordo com o tipo de neuropeptídeo e o local de ação (Brogden et al., 2005).

A evidência do seu envolvimento em doenças inflamatórias tem focalizado predominantemente no papel proinflamatório da substância P (O'Connor et al., 2004), peptídeo liberador de gastrina (GRP) (Dal-Pizzol et al., 2006) e nociceptina/orphanina FQ (Carvalho et al., 2008), bem como efeito imunomodulador do peptídeo Y (Bedoui et al., 2004) e atividade anti-inflamatória do peptídeo vasoativo intestinal (VIP) (Gonzalez-Rey et al., 2007). Dessa forma, o mecanismo de ação dos neuropeptídeos na modulação das doenças inflamatórias é, em grande parte, pela influência na produção de citocinas.

I.1.3.1 Bombesina/Peptídeo Liberador de Gastrina

A bombesina (BN) é um peptídeo primeiramente isolado por Anastasi e colaboradores a partir da pele dos sapos *Bombina bombina* em 1971 (Anastasi, Esparmer e Bucci, 1971). Estudos imunquímicos mostraram a presença da BN (imunoreatividade) no Sistema Nervoso Central (SNC) e trato gastrointestinal em várias espécies, incluindo ratos, porcos, cachorros e humanos. Contudo a imunoreatividade, não é devida somente a BN, como também aos peptídeos relacionados: GRP, decapeptídeo neuromedina-B (NM-B) e neuromedina C (NM-C). Todos esses peptídeos fazem parte da família dos peptídeos relacionados a bombesina (BNPs) (Cornelio et al., 2007). Um análogo mamífero da bombesina, com potente atividade liberadora de gastrina, o GRP, foi caracterizado quimicamente em 1978 a partir do tecido gástrico de suínos (McDonald et al., 1978). Esse peptídeo apresenta 27 aminoácidos e é estruturalmente homólogo à BN de anfíbios, tendo em comum 9 dos 10 aminoácidos da porção carboxiterminal (McDonald et al., 1979). Estudos

direcionados ao GRP, têm mostrado que encontra-se em vários tecidos de diversas espécies de mamíferos, incluindo: trato gastrointestinal (Bjornskov-Bartholdy, Bersani e Holst, 1991), cérebro (Hernanz, 1990), glândula pituitária (Larsen et al., 1989), medula espinhal (Fuxe et al., 1983), gânglios simpático e sensorial (Panula et al., 1983; Helen et al, 1984), glândula adrenal (Lemaire et al., 1986), pulmão (McKillop et al., 1990), tireóide (Conlon et al., 1988), trato genituriário (Bjornskov-Bartholdy, Bersani e Holst, 1991; Xiao, et al., 1996) e articulações (Chu et al., 1995).

O receptor de GRP (GRPR) é uma proteína de superfície celular ligante com alta-afinidade da BN e GRP, assim como de peptídeos intimamente relacionados, desencadeando alterações intracelulares que influenciam o comportamento celular (Tokita et al., 2001). O GRPR, clonado no início da década de 1990, interage com proteínas G e ativa a liberação de inositol-trifosfato, com aumento do cálcio iônico intracelular (Battey et al., 1991). Esses receptores apresentam uma ampla distribuição no SNC e no tecido periférico, incluindo o trato gastrointestinal de murinos, suínos, caninos e de seres humanos. São encontrados em altos níveis no músculo liso (intestino, estômago e bexiga) e em glândulas secretoras (por exemplo, pâncreas). Também são encontrados em várias linhagens celulares (por exemplo, fibroblastos de Swiss 3T3 e carcinoma pulmonar de pequenas células (Watson, 1994).

I.1.3.2 Importância do GRP

O GRP possui importante papel em várias atividades biológicas, tais como crescimento tecidual (McKillop et al., 1990), modulação do trato

gastrointestinal, SNC, trato respiratório e resposta imune. Relacionado ao crescimento celular do tecido normal e neoplásico, os efeitos tróficos foram estabelecidos na mucosa intestinal normal (Chu et al., 1995), pâncreas, (Parekh et al., 1994), neoplasias do pulmão (Alexander et al., 1988), estômago (Bold et al., 1988; Kim et al., 1996), cólon (Narayan et al., 1990), mama (Burns et al., 1999) e próstata (Bologna et al., 1989; Logothetis e Hoosein, 1992) através da mediação dos receptores de membrana específicos nas células-alvo (Sunday et al., 1998).

Na questão relacionada ao trato gastrointestinal, o GRP modula a secreção gástrica e pancreática através da ativação das células G e consequente liberação de colestocinina e gastrina, regulando a secreção do ácido gástrico e funções motoras na musculatura estomacal (Ghatei et al., 1982). No pâncreas, estimula a liberação de neurotensina, motilina, peptídeo pancreático, insulina e glucagon (Minamino et al., 1983). Enquanto no SNC, tem sido envolvido na modulação da saciedade (McCoy e Avery, 1990), termorregulação (Brown, Carver e Fisher, 1988), homeostase, ritmo circadiano (Albers et al., 1991), metabolismo (Hill e McDonald, 1992) e na participação em desordens psiquiátricas e neurológicas desempenhando papel neuroimunomodulatório importante na patogenia da ansiedade, depressão, esquizofrenia, autismo e demência (Roesler et al., 2006; Roesler, Henriques e Schwartzmann, 2006).

Finalmente, o GRP atua sobre o desenvolvimento e regulação da resposta imune através de ações diretas sobre as células do sistema imunológico. Linfócitos, neutrófilos, eosinófilos, macrófagos, mastócitos e células endoteliais expressam o receptor GRP (Degan et al., 2008; Tokita et al.,

2001). A ativação do receptor do GRP tem efeitos imunológicos, incluindo quimioatração de macrófagos peritoneais, monócitos e linfócitos (Medina et al., 1998a,b; Del Rio, Hernanz e de la Fuente, 1994) estímulo da produção de linfócitos (Del Rio e De la Fuente, 1994), ativação de células *natural killer* (NK) e citotoxicidade dependente de anticorpos (De la Fuente, Del Rio e Hernanz, 1993). Além disso, induz a proliferação de mastócitos e quimiotaxia *in vitro*, sendo implicado na patogenia de doenças pulmonares (Subramaniam et al., 2003) e artrite reumatóide (Green, 2005; Grimsholm, Rantapaa-Dahlqvist e Forsgren, 2005).

1.1.3.3. RC-3095 - um antagonista do receptor GRP

O antagonista da BN, RC-3095 foi sintetizado através de uma técnica de fase sólida da resina benzidrilamina no laboratório de Shally (Universidade de Tulane, New Orleans) (Liebow et al., 1994). Na posição 6 a forma D do análogo Trp 2, 3, 4, 9 tetrahydro-1H-pirido (3, 4-b) ácido indol-3-carboxílico (Tpi) foi introduzida no nonapeptídeo Leu 13 ψ (Ch₂-NH) Leu 14-Bombesina. A redução da ligação peptídica entre a posição 13 e 14 foi introduzida utilizando-se uma reação de alquilação redutiva (Cuttitta et al., 1985). O antagonista da BN foi sintetizado como dois diferentes sais: D-21663 é um sal trifluor-acetato e D-22213 é um sal acetato (Schwartzmann et al., 2006).

Diversas pesquisas mostram que a meia-vida de peptídeos relacionados a BN, como o GRP, é muito curta na circulação, devido a sua rápida metabolização. Assim, os efeitos de BN/GRP e seus antagonistas aparecem rapidamente mais são relativamente de curta duração. Estudo *in vitro* mostra que a meia-vida de vários antagonistas da BN/GRP estão entre 154 e 1.388

minutos (Davis et al., 1992). Experimentos em modelos animais demonstraram que o RC-3095, em nível sanguíneo, decresce rapidamente após injeção intravenosa ou subcutânea, decaindo rapidamente e tornando-se indetectável após 3-5h (Groot et al., 1995). Quando é administrado pela via subcutânea, os efeitos do RC-3095 são obtidos em 15-30 minutos após a injeção terminando em poucas horas. Observa-se inibição significativa da liberação da gastrina diminuindo a elevação de glicose no plasma, causada pelo GRP (Pinski et al., 1992a; Pinski J. et al., 1992b).

Em relação ao perfil de segurança, estudos clínicos de fase I em pacientes com diferentes tipos de câncer em estágio avançado não tem demonstrado nenhum efeito colateral significativo, mesmo em doses mais elevadas, que variam entre 8-96ug/kg (Schwartzmann et al., 2006).

Como macrófagos ativados secretam GRP e estas células exercem função importante entre as células do sistema imune no desenvolvimento de doenças inflamatórias (Dal-Pizzol, 2004; Shasby e McCray, 2004) recentemente foi abordado o efeito de RC-3095 como importante papel anti-inflamatório. Em modelo experimental de artrite induzida por adjuvante completo de Freund em ratos, RC-3095 exerceu significativa inibição na inflamação articular com diminuição nos níveis séricos de IL-1 β , TNF, interleucina-6 (IL-6) e interleucina-10 (IL-10) em relação ao grupo controle (Oliveira et al., 2008). Um estudo recente também verificou o seu papel em modelo animal de colite ulcerativa e sua atividade anti-inflamatória foi associada com a redução na expressão colônica de TNF- α (Damin et al., 2009).

Os efeitos do RC-3095 foram demonstrados por nosso grupo em modelo bem estabelecido de sepse experimental de CLP e dano pulmonar agudo (Dal-Pizzol et al., 2006). Nesses modelos propostos, o RC-3095 melhorou as taxas de sobrevivência, reduzindo a insuficiência orgânica e o infiltrado inflamatório. Além disso, modulou a liberação de citocinas pró-inflamatórias (TNF e IL-1 β) por macrófagos ativados, bloqueando diversos processos associados a progressão da sepse. De forma interessante, o RC-3095 não modula a liberação de IL-10, sugerindo que os caminhos intracelulares modulados pela BN/GRP é seletivo para citocinas pró-inflamatórias. Portanto, o RC-3095 pode representar um possível alvo farmacológico para o controle da resposta inflamatória local e sistêmica.

I.1.4. Modelos animais de inflamação pleural e sepse

Diversos modelos de inflamação, utilizando animais de diferentes espécies, têm sido utilizados para avaliar as drogas usadas no tratamento de doenças inflamatórias. Isto se deve ao fato de que apesar da maioria das reações inflamatórias apresentarem características comuns, sua etiologia e manifestações clínicas diferem significativamente, necessitando, portanto, de modelos específicos que reproduzam as suas características básicas. Desta forma é fácil compreender também porque o tratamento de doenças inflamatórias é bastante diversificado.

Relacionado ao modelo de inflamação pleural, o modelo foi originalmente desenvolvido em ratos (Spector, 1956) e mais tarde reproduzido

em cobaias (Yamamoto et al., 1975; Saleh, Calixto e Medeiros, 1996). Com o desenvolvimento deste modelo, foi possível fazer uma avaliação não só do extravasamento de líquido como da migração de células induzidos por diversos agentes flogísticos (Saleh, Calixto e Medeiros, 1997; Saleh, Calixto e Medeiros, 1999). A técnica de pleurisia possui vantagens, pois a partir da coleta do lavado na cavidade pleural é possível analisar e quantificar os componentes celulares e humorais da inflamação, sem necessitar recorrer a procedimentos complicados de extração e quantificação. Outra vantagem adicional é a sua fácil execução, pois diferentes agentes flogísticos (específicos e não específicos) podem ser estudados. Caracterizada por uma primeira fase, que ocorre 4 h após a administração da carragenina na cavidade pleural destes animais onde evidencia-se um aumento na exsudação, bem como de leucócitos do tipo polimorfonucleares. A segunda fase ocorre 48 h após, e é caracterizada pelo aumento da exsudação e de leucócitos do tipo mononucleares (Saleh, Calixto e Medeiros, 1997; Frode e Medeiros, 2001; Dalmarco, Frode e Medeiros, 2002).

Admite-se que o sítio primário da inflamação na cavidade pleural seja a microvasculatura subpleural, local onde se inicia a exsudação e o influxo de células inflamatórias. A partir do processo inflamatório, induzido experimentalmente na cavidade, pode ocorrer acúmulo de líquido, o qual pode apresentar características de exsudato, com ou sem fibrina, ou transudato. Os mediadores envolvidos neste tipo de inflamação são liberados por células residentes ou que migram para o local do processo inflamatório. Além disso, o tipo, a intensidade e a duração da inflamação produzida pela injeção de um

agente flogístico dependerá da sua persistência na cavidade pleural e da natureza da sua interação com fatores humorais e/ou celulares.

Relacionado à sepse, sabe-se que em humanos é uma síndrome complexa e terapeuticamente desafiadora, na qual diversos sistemas orgânicos estão interligados e desequilibrados. Vários modelos experimentais têm sido desenvolvidos para os estudos dos aspectos fisiopatológicos e das consequências sistêmicas da sepse, assim como para a investigação de agentes potencialmente terapêuticos e seus mecanismos de ação. Para esta proposta, deve-se utilizar um modelo animal que reproduza a vasodilatação, hipotensão, aumento no débito cardíaco, resposta ao tratamento e mortalidade vistos em pacientes sépticos. Tem-se utilizado para tal finalidade o modelo de sepse abdominal, sepse cutânea, sepse induzida pela administração de LPS ou TNF. Porém os modelos que induzem peritonite são mais amplamente utilizados. A peritonite pode ser induzida por inoculação direta de bactérias ou conteúdo fecal na cavidade peritoneal e, entretanto o modelo mais aceito na literatura, e que parece simular mais adequadamente o quadro clínico de sepse é chamado de CLP (Deitch, 2005; Hubbard et al., 2005; Rocha, Oliveira e Farias-Corrêa, 2006; Rittirsch, Hoesel e Ward, 2007). A CLP baseia-se na ligação do ceco logo abaixo da válvula íleo cecal, perfuração do ceco com tamanho padronizado e liberação do conteúdo fecal para a cavidade peritoneal, conforme classicamente descrito por Wichterman e colaboradores (Wichterman, Baue e Chaudry, 1980). Desta maneira além da peritonite se induz isquemia mesentérica simulando as grandes síndromes clínicas de sepse abdominal (p. ex. apendicite, isquemia mesentérica) (Hollenberg et al., 2001). Representa vantagens como relativa simplicidade, reprodutibilidade e

possibilidade de controlar o grau de contaminação bacteriana na cavidade peritoneal, e conseqüentemente, a mortalidade, pela mudança do tamanho da agulha e/ou número de perfurações realizadas no ceco. Em contrapartida, variabilidades na mortalidade podem ser encontradas mesmo quando protocolos iguais são usados devido a fatores aos quais, na maioria das vezes, não são considerados como, por exemplo, diferenças no tamanho da incisão na pele e músculo, no comprimento ligado do ceco e volume de conteúdo fecal extravasado para a cavidade peritoneal (Deitch, 2005; Hubbard et al., 2005; Rocha, Oliveira e Farias-Corrêa, 2006; Rittirsch, Hoesel e Ward, 2007). Por isso, a padronização do procedimento de indução de sepse polimicrobiana por CLP tem relevante importância na consistência e reprodutibilidade dos resultados.

I.2. OBJETIVOS

I.2.1. Objetivo Geral

Determinar o efeito modulatório do peptídeo liberador de gastrina na resposta inflamatória.

I.2.2. Objetivos Específicos

- Investigar o efeito do antagonista do peptídeo liberador de gastrina nos marcadores de inflamação e dano oxidativo em dano pulmonar associado à pleurisia induzida por carragenina em ratos.
- Investigar o efeito do antagonista do peptídeo liberador de gastrina na expressão genética e protéica de TLR-4 em culturas de células RAW 264.7 estimulados por LPS e em tecido pulmonar e lavado broncoalveolar de ratos induzidos ao modelo de sepse por ligação e perfuração cecal.
- Investigar o efeito do antagonista do peptídeo liberador de gastrina nas vias de sinalização quinase regulada por sinais extracelulares 1/2 (ERK1/2), quinase n-terminal c-Jun (JNK) a Akt e a translocação nuclear dos fatores de transcrição NK-κB e AP-1 em culturas de células RAW 264.7 estimulados por LPS.
- Investigar o efeito do antagonista do peptídeo liberador de gastrina nos níveis de citocinas e quimiocinas em culturas de células RAW 264.7 estimulados por LPS e no soro e lavado broncoalveolar de ratos induzidos ao modelo de sepse por ligação e perfuração cecal.

- Investigar os níveis plasmáticos de citocinas sob infusão contínua por 12h do antagonista do peptídeo liberador de gastrina em pacientes sépticos.
- Investigar o efeito do antagonista do peptídeo liberador de gastrina na migração de neutrófilos no lavado broncoalveolar e disseminação bacteriana a nível sistêmico em ratos induzidos ao modelo de sepse por ligação e perfuração cecal.
- Investigar os níveis plasmáticos do peptídeo liberador de gastrina em pacientes com síndrome da resposta inflamatória sistêmica e sepse e a correlação com o desfecho clínico.

PARTE II

Artigos Científicos

Capítulo I

***Protective effect of gastrin-releasing peptide receptor antagonist in
carrageenan-induced pleural inflammation in rats***

Fabricia Petronilho, Bruna de Souza, Francieli Vuolo, César A. F. Benetton,
Emilio L. Streck, Rafael Roesler, Gilberto Schwartzmann, Felipe Dal-Pizzol

Artigo científico aceito para publicação no periódico

Inflammation Research

Protective effect of gastrin-releasing peptide receptor antagonist in carrageenan-induced pleural inflammation in rats

Fabricia Petronilho · Bruna de Souza · Francieli Vuolo · César A. F. Benetton · Emilio L. Streck · Rafael Roesler · Gilberto Schwartzmann · Felipe Dal-Pizzol

Received: 4 November 2009 / Revised: 14 January 2010 / Accepted: 15 March 2010
© Springer Basel AG 2010

Abstract

Objective We report the effects of the gastrin-releasing peptide (GRP) receptor antagonist RC-3095 in an acute inflammation model induced by carrageenan.

Methods Male Wistar rats received saline or saline containing 2% λ -carrageenan into the pleural cavity, with some also receiving RC-3095 3 mg/kg subcutaneously, immediately after surgery. Four hours later, the rats were killed and pleural exudate was obtained for evaluation of total cell count, lactate dehydrogenase activity, total protein, cytokines analysis and nitrite/nitrate concentrations; myeloperoxidase (MPO) activity and oxidative stress were evaluated in the lung.

Results RC-3095 exhibited pronounced anti-inflammatory actions by inhibition of leukocyte influx and blockade of MPO, nitrite/nitrate and cytokine levels. Moreover, the results showed that RC-3095 elicits action against oxidative damage in lipids and proteins, as well as increasing cell viability.

Conclusion The present findings suggest that GRP plays a role in acute inflammation that can be related with the reduction of oxidative damage and that it could be effective in therapeutic applications.

Keywords Gastrin-releasing peptide · Pleurisy · RC-3095 · Oxidative stress

Responsible Editor: I. Ahnfelt-Rønne.

F. Petronilho · B. de Souza · F. Vuolo · C. A. F. Benetton · E. L. Streck · F. Dal-Pizzol (✉)
Experimental Physiopathology Laboratory, Postgraduate Program in Health Sciences, University of the Extreme-South Catarinense, 88006-000 Criciúma, SC, Brazil
e-mail: pizzol.ez@terra.com.br

F. Petronilho · F. Dal-Pizzol
Department of Biochemistry,
Institute for Basic Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, 90046-900 Porto Alegre, RS, Brazil

R. Roesler
Cellular and Molecular Neuropharmacology Research Group,
Department of Pharmacology Institute for Basic Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul,
90046-900 Porto Alegre, RS, Brazil

G. Schwartzmann
Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine,
Federal University of Rio Grande do Sul,
90035-003 Porto Alegre, RS, Brazil

Introduction

Carrageenan is a high-molecular-weight sulphated polysaccharide which is widely used in pharmacology to induce local inflammation (paw oedema and pleurisy) [1] in mice. Carrageenan-induced pleurisy is a well-characterized experimental model of inflammation which permits the quantification and correlation of both exudates and cellular migration with changes in other inflammatory parameters [2].

The administration of carrageenan into the pleural space leads to pleurisy, characterized by an immediate neutrophil infiltration followed by replacement of neutrophils by macrophages and lung injury. Besides neutrophil infiltration, the pleurisy induced by carrageenan is characterized by the production of neutrophil-derived reactive oxygen species (ROS), such as hydrogen peroxide (H_2O_2), superoxide anion and hydroxyl radical, as well as the release of other neutrophil-derived mediators [3]. Evidence from the literature shows that the production of ROS and reactive

nitrogen species (RNS) occurs at the site of inflammation and contributes to tissue damage [4].

Under pathological circumstances, such as acute lung injury and sepsis, excessive production of neutrophil-derived ROS, RNS and cytokines may influence neighbouring endothelial or epithelial cells, contributing to the amplification of inflammatory tissue injury [5]. Furthermore, oxidative stress elicits the activation of redox-sensitive transcription factors such as NF- κ B and AP-1, resulting in a large output of proinflammatory cytokines and chemokines, which further increase inflammation- and oxidative stress-induced tissue damage [6].

Gastrin-releasing peptide (GRP) has been detected in various cells and has been related to immune cell regulation [7–9]. GRP is also considered a critical mediator of the development of bronchopulmonary dysplasia [10, 11] and is implicated in the pathophysiology of other chronic inflammatory lung diseases [12]. Studies have shown the role of GRP in the production and release of cytokines, both in animal models and humans with inflammatory diseases [11, 13]. Some pathologic conditions, such as exposure to tobacco smoke, chronic obstructive pulmonary diseases and eosinophilic granuloma, have recently been found to be associated with an increase of pulmonary GRP-producing cells [14]. We have recently reported that the GRP receptor antagonist RC-3095 modulates the response of proinflammatory cytokines in activated macrophages by lipopolysaccharide, and improved the survival in an animal model of sepsis induced by cecal ligation and puncture (CLP) [15]. Additionally, RC-3095 was able to improve experimental arthritis, attenuate joint damage and decrease serum levels of cytokines [16].

Within this context, the present study was designed to investigate the effect of RC-3095 on lung injury associated with carrageenan-induced pleurisy. For this purpose, we evaluated the following parameters: cell migration, lactate dehydrogenase (LDH) activity, total protein content, nitrite/nitrate concentration, TNF- and interleukin-1 β (IL-1 β) levels in pleural exudates; myeloperoxidase (MPO) activity and lipid and protein oxidative damage markers in lung tissue.

Materials and methods

Materials

The GRP receptor antagonist RC-3095, originally synthesized in the Schally laboratory by solid-phase methods [17], was made by Zentaris (Frankfurt am Main, Germany). Thiobarbituric acid (TBA), dinitrophenylhydrazine (DNPH), 5,5'-dithio-bis (2-nitrobenzoic acid), hexadecyltrimethylammonium bromide, tetramethylbenzidine,

5,5-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (2-nitrobenzoic acid) and λ -carrageenan were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, USA).

Animals

Adult male Wistar rats (weighing 250–350 g) obtained from Central Animal House of Universidade do Extremo Sul Catarinense were used for induction of pleurisy. They were caged in groups of five, with free access to food and water, and were maintained on a 12-h light–dark cycle (lights on 7:00 a.m.), at a temperature of $22 \pm 1^\circ\text{C}$. All experimental procedures involving animals were performed in accordance with the National Institutes of Health (Bethesda, MD, USA), Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, with the approval of Ethics Committee from Universidade do Extremo Sul Catarinense.

Induction of pleurisy

Pleurisy was induced by carrageenan as previously described [18]. The rats were anesthetized with ketamine hydrochloride and submitted to a skin incision at the level of the left sixth intercostal space. The underlying muscle was dissected and saline (0.2 ml) or saline containing 2% λ -carrageenan (0.2 ml) was injected into the pleural cavity. The skin incision was closed with a suture and the animals received RC-3095 3 mg/kg subcutaneously (s.c). Four hours after the induction of pleurisy, the animals were killed and approximately 1 ml of pleural exudates from each animal was obtained for total cell count, LDH activity, total protein, cytokines analysis and nitrite/nitrate concentrations; lung was separated to evaluate inflammatory and oxidative damage parameters.

Experimental groups

The animals were divided into three groups ($n = 8$ animals per group): group 1 was treated only with saline, receiving 0.2 ml saline into the intrapleural cavity, group 2 received 0.2 ml of carrageenan 2% in the intrapleural cavity and group 3 received 0.2 ml of 2% carrageenan intrapleural cavity plus 3 mg/kg of RC-3095 s.c immediately after surgery [15].

Inflammatory parameters in pleural exudates

Cells of pleural exudate were counted in a Neubauer chamber. LDH activity was determined with commercially available kits (Labtest Diagnóstica, Brazil) and the amount of total protein was measured in accordance with the

Lowry method using bovine serum albumin as the standard [19].

Measurement of nitrite/nitrate concentration in pleural exudates

Total nitrite concentration in the samples was then measured using the Griess reaction, by adding 100 μ l of Griess reagent [0.1% (w/v) naphthylethylenediamide dihydrochloride in H₂O and 1% (w/v) sulphanilamide in 5% (v/v) concentrated H₃PO₄], vol. [1:1] to the 100 μ l sample. The optical density at 550 nm (OD₅₅₀) was measured using ELISA microplate reader [20].

Measurement of cytokines in pleural exudates

TNF- α and IL-1 β concentrations were evaluated in the pleural exudates at 4 h after intrapleural injection of carrageenan. The assay was carried out by using a colorimetric, commercial ELISA kit (Calbiochem-Novabiochem Corporation, USA).

Myeloperoxidase activity in lung tissue

Tissues were homogenized (50 mg/ml) in 0.5% hexadecyltrimethylammonium bromide and centrifuged at 15,000 \times g for 40 min. The suspension was then sonicated three times for 30 s. An aliquot of supernatant was mixed with a solution of 1.6 mM tetramethylbenzidine and 1 mM H₂O₂. Activity was measured spectrophotometrically as the change in absorbance at 650 nm at 37°C [21].

Thiobarbituric acid reactive substances in lung tissue

The formation of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) during an acid-heating reaction is widely adopted as a sensitive method for measurement of lipid peroxidation [22]. Briefly, the samples were mixed with 1 ml of 10% trichloroacetic acid and 1 ml of 0.67% TBA. Subsequently, they were heated in a boiling water bath for 30 min. Malondialdehyde (MDA) equivalents were determined by absorbance at 532 nm using 1,1,3,3-tetramethoxypropane as an external standard. Results were expressed as MDA equivalents (nmol/mg protein).

Protein carbonyl content in lung tissue

The oxidative damage to proteins was assessed by the determination of carbonyl groups content, based on the reaction with dinitrophenylhydrazine (DNPH) [23]. Briefly, proteins were precipitated by the addition of 20% trichloroacetic acid and redissolved in DNPH, and the absorbance was monitored at 370 nm.

Sulfhydryl groups in lung tissue

Total thiol content in lungs was determined using the 5,5-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (2-nitrobenzoic acid) method (DTNB). The conditions of DTNB measurement were as described in [24] with some modifications. Briefly, 30 μ l of a sample was mixed with 1 ml of PBS/1 mM EDTA (pH 7.5). The reaction was started by the addition of 30 μ l of 10 mM DTNB stock solution in PBS. Control samples, which did not include DTNB or protein, were run simultaneously. After 30 min of incubation at room temperature, the absorbance at 412 nm was measured and amounts of TNB formed [equivalent to the amount of sulfhydryl (SH) groups] were calculated.

Statistical analysis

Results are expressed as mean \pm SEM and $P < 0.05$ was considered to be significant. Differences between groups were determined by one-way analysis of variance followed by a Newman–Keuls test. All statistical analyses were performed with SPSS 12.0 for Windows (SPSS, Chicago, IL, USA).

Results

The effects of subcutaneous injection of RC-3095 on inflammatory cell recruitment into the pleural cavity are illustrated in Fig. 1a. Carrageenan-induced pleurisy displayed a substantial increase in the number of cells in the pleural cavity compared with control rats, and treatment with RC-3095 decreased cells migration in the pleural cavity compared to the carrageenan group. RC-3095 administration reduced protein content and pleural effusion LDH as an index of pleural cell injury (Fig. 2a, b, respectively). Moreover, a substantial increase in TNF- and IL-1 β production was found in pleural exudates collected from rats 4 h after carrageenan injection (Fig. 3). Pleural exudates production of TNF- and IL-1 β was significantly reduced in carrageenan-injected rats treated with RC-3095. A significant decrease in nitrite/nitrate accumulation in the pleural exudates 4 h after carrageenan administration and with RC-3095 relative to the non-treated carrageenan group was also observed (Fig. 4).

We also investigated the effect of RC-3095 on the presence of neutrophils by measurement of the activity of MPO. MPO activity in the lung tissues was significantly elevated at 4 h after carrageenan administration (Fig. 5a). In addition, in rats treated with RC-3095, MPO activity in the lungs was significantly reduced. The pulmonary injury in carrageenan-treated animals was also characterized by an increase in the tissue levels of MDA, indicative of lipid

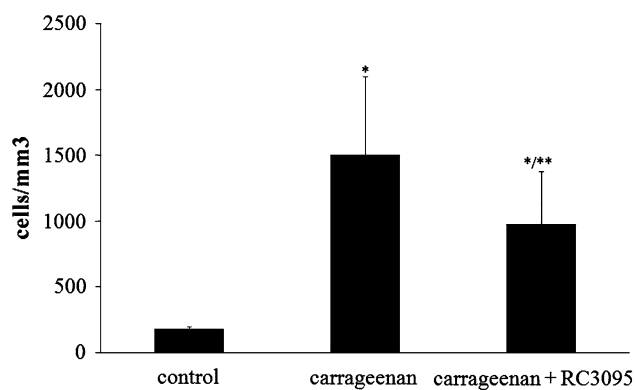


Fig. 1 Cell migration into the pleural cavity in carrageenan-induced pleurisy and treated with RC-3095. Assessment of cell migration into the pleural cavity was performed 4 h after pleurisy induction and treatments. Results are expressed as mean \pm SD, $n = 8$ per group; * $P < 0.05$ compared with control group and ** $P < 0.05$ compared with carrageenan group

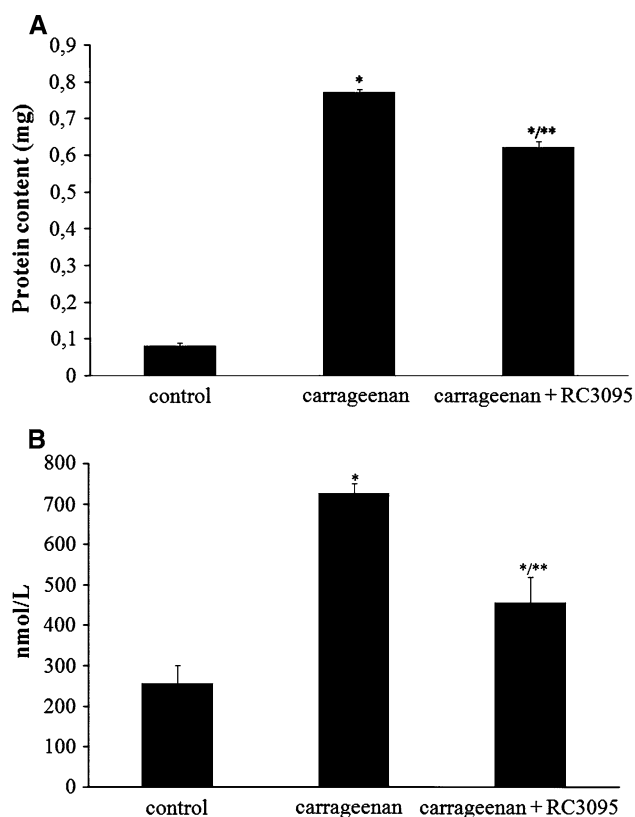


Fig. 2 Total protein (a) and LDH activity (b) in pleural exudate of rats submitted to carrageenan administration and treated with RC-3095. Results are expressed as mean \pm SD, $n = 8$ per group; * $P < 0.05$ compared with the control group and ** $P < 0.05$ compared with the carrageenan group

peroxidation (Fig. 5b). MDA levels were significantly enhanced in lungs collected from carrageenan-treated rats when compared to those found in the saline group and were significantly reduced when RC-3095 was administered. In

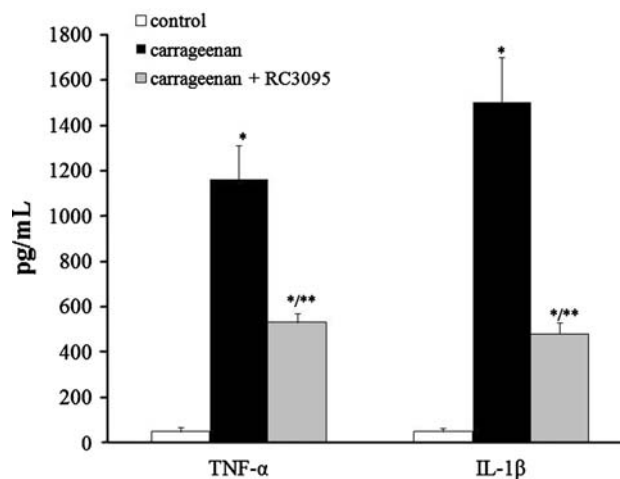


Fig. 3 TNF- α and IL-1 β levels in pleural exudates of rats subjected to carrageenan administration and treated with RC-3095. Results are expressed as mean \pm SD, $n = 8$ per group; * $P < 0.05$ compared with the control group and ** $P < 0.05$ compared with the carrageenan group

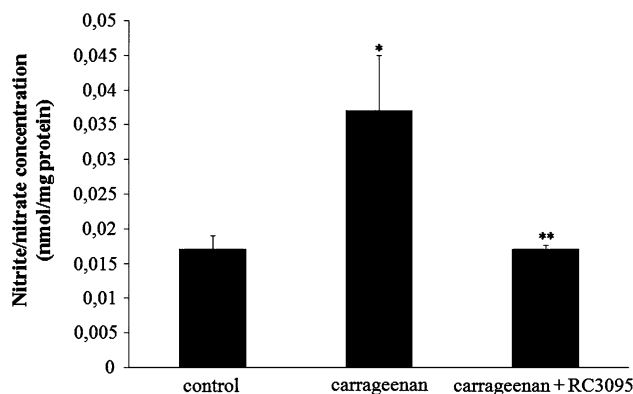


Fig. 4 Nitrite/nitrate concentration in pleural exudates of rats subjected to carrageenan administration and treated with RC-3095. Results are expressed as mean \pm SD, $n = 8$ per group; * $P < 0.05$ compared with the control group and ** $P < 0.05$ compared with the carrageenan group

addition, carrageenan decreased the free SH groups, and this was partially reversed by RC-3095 treatment (Fig. 5c); this did not occur with protein carbonyl levels (data not shown).

Discussion

In this study, we report on the effects of the GRP receptor antagonist RC-3095 in a well-established murine model for acute inflammation induced by carrageenan. In the present work, acute administration of RC-3095 exhibited pronounced anti-inflammatory actions, characterized by the inhibition of leukocyte influx into the pleural cavity, nitrite/nitrate content, TNF- α and IL-1 β levels in the acute model

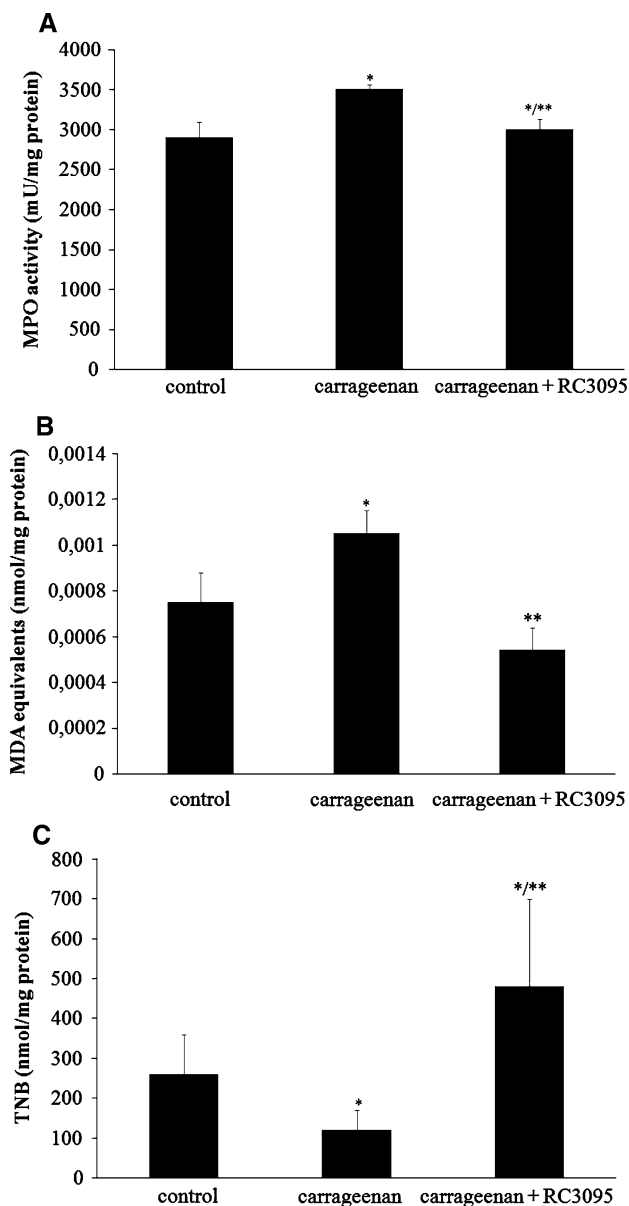


Fig. 5 Myeloperoxidase activity (a), oxidative damage in lipids through thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) measurement (b) and free SH groups in proteins (c) in lung tissue of rats submitted to carrageenan administration and treated with RC-3095. Results are expressed as mean \pm SD, $n = 8$ per group; * $P < 0.05$ compared with the control group and ** $P < 0.05$ compared with the carrageenan group

of inflammation caused by intrapleural administration of carrageenan. Moreover, RC-3095 elicited important action against oxidative damage in lipids and free SH groups and increased cell viability. Taken together, these findings suggest that the administration of RC-3095 could effectively interfere with the inflammatory process in pleurisy induced by carrageenan.

Cellular immune responses appear to be the predominant mechanisms involved in the pathogenesis of most

inflammatory pleural effusions. Recent advances in basic research have extended our comprehension of the immunological mechanisms underlying pleural inflammation. Clearly, understanding the pleural inflammatory mechanisms has direct clinical implications, although many aspects relating to pleural inflammation and disease progression or resolution remain only partially understood [25]. Although differential leukocyte count in pleural fluid is of limited diagnostic value, it reflects the stage of the inflammatory response and narrows the diagnostic possibilities in exudative effusions. A pleural neutrophil predominance is associated with the early phase of the inflammatory response and can be found in several infectious and non-infectious conditions, such as parapneumonic effusions, pulmonary embolus, viral infection, gastrointestinal disease and acute tuberculous pleuritis [26]. In our study, we demonstrated that RC-3095 inhibited cell migration, LDH activity and total protein in pleural exudates in carrageenan-induced pleurisy; this could block several processes associated with pleural diseases progression [27].

Studies have also shown that cell influx into the pleural cavity occurs after the release of chemotactic cytokines by pleural mesothelial cells in response to other cytokines [27]. There is evidence that the pro-inflammatory cytokines TNF- α and IL-1 β help to propagate the extension of a local or systemic inflammatory process [28–30]. We confirm here that the inflammatory process caused by the administration of carrageenan into the pleural cavity leads to a substantial increase in the levels of both TNF- α and IL-1 β in the exudates. Interestingly, the levels of these two pro-inflammatory cytokines are significantly lower in the exudate obtained from RC-3095-treated animals. Dal-Pizzol and colleagues described that, in a sepsis animal model, RC-3095 attenuated TNF- α and IL-1 β and macrophage stimulation with lipopolysaccharide [15]. Additionally, another study demonstrated that RC-3095 was able to attenuate serum levels these cytokines on complete Freund's adjuvant-induced arthritis in rats [16].

There is a large amount of evidence that the enhanced formation of nitric oxide (NO) by inducible nitric oxide synthase (NOS) may negatively contribute to the inflammatory process [3, 31–34]. For instance, inhibitors of NOS activity reduce the development of carrageenan-induced inflammation [32, 35]. In this context, we demonstrated that the formation of nitrite and nitrate (final metabolites of NO in water) after carrageenan administration were reduced in pleural exudate from RC-3095-treated rats compared to non-treated rats. The induction of iNOS by injection of endotoxin in rodents *in vivo* is mediated by endogenous TNF- α and IL-1 β [36, 37]. As the levels of TNF- α and IL-1 β are significantly lower in the exudates obtained from RC-3095-treated rats, we propose that the

attenuation of the formation of nitrite and nitrate observed is secondary to reduced TNF- α and IL-1 β levels.

Reduced amounts of NO lead to decreased endothelial cell membrane permeability, thus limiting polymorphonuclear cell transmigration from the vascular compartment into the lung [6]. Together with NO, MPO activity is an indirect marker of activated leukocytes and is implicated in exudation and cell migration [38]. The low MPO and NO levels in our study following RC-3095 treatment showed what had already been verified in an animal model of sepsis by CLP [15].

ROS and primary granule constituents are secreted by activated neutrophils, and these sometimes lead to injury of normal tissue [39]. Several studies have demonstrated its participation in models of inflammation, such as carrageenan-induced pleurisy in rats [40–43]. In accordance with Guo and Ward [6], lipid peroxidation is believed to play an important role in inflammatory lung diseases. As expected, MDA concentrations increased in lung tissue in the carrageenan group. On the other hand, when RC-3095 was administered, the levels of lipid peroxidation end-products were substantially reduced. Other oxidative indicators, SH-containing amino acid residues in protein sulfhydryls, are susceptible targets for a variety of pro-oxidants [44]. The increase of free SH groups in proteins from the lung provides additional evidence for a decrease in oxidative damage by RC-3095.

The present study showed that ROS amplify inflammatory response by activating oxidant-regulated transcription factors such as nuclear factor κ B (NF- κ B) and activation protein-1 (AP-1), with a subsequent increase of pro-inflammatory cytokines [45]. NF- κ B inhibitors strongly inhibit the early phase of the pleural inflammatory response induced by carrageenan in mice, suggesting that the NF- κ B pathway plays a relevant role in the inflammatory response elicited by carrageenan in the mice model of pleurisy [46]. Levine and colleagues showed that bombesin stimulates NF- κ B activation and expression of pro-angiogenic factors in prostate cancer cells [47]. Therefore, the decrease of inflammatory response and oxidative damage in carrageenan-induced pleurisy may be attributed to the GRP receptor; RC-3095 can be involved in the regulation of NF- κ B activation.

In conclusion, the present results support the view that in carrageenan-induced pleurisy model, the GRP receptor antagonist RC-3095 has anti-inflammatory properties which can be related with the reduction of oxidative damage.

Acknowledgments This work was supported by grants from Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC), Coordenação de Aperfeiçoamento de Nível Superior (CAPES) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

References

- Lentsch AB, Ward PA. Regulation of experimental lung inflammation. *Respir Physiol*. 2001;128:17–21.
- Vinegar R, Traux JF, Selph JL, Voelker FA. Pathway of onset, development, and decay of carrageenan pleurisy in the rat. *Fed Proc*. 1982;41:2588–95.
- Salvemini D, Wang ZQ, Wyatt P, Bourdon DM, Marino MH, Manning PT, et al. Nitric oxide: a key mediator in the early and late phase of carrageenan-induced rat paw inflammation. *Br J Pharmacol*. 1996;118:829–37.
- Salvemini D, Masferrer JL. Interactions of nitric oxide with cyclooxygenase: in vitro, ex vivo, and in vivo studies. *Methods Enzymol*. 1996;269:12–25.
- Fialkow L, Wang Y, Downey GP. Reactive oxygen and nitrogen species as signaling molecules regulating neutrophil function. *Free Radic Biol Med*. 2007;42:153–64.
- Guo RF, Ward PA. Role of oxidants in lung injury during sepsis. *Antioxid Redox Signal*. 2007;9:02–1991.
- Medina S, Del Rio M, Victor VM, Hernandez A, De la Fuente M. Changes with ageing in the modulation of murine lymphocyte chemotaxis by CCK-8S, GRP and NPY. *Mech Ageing Dev*. 1998;102:249–61.
- Medina S, Rio MD, De la Cuadra B, Fuente MD. Age-related changes in the modulatory action of gastrin-releasing peptide, neuropeptide Y and sulfated cholecystokinin octapeptide in the proliferation of murine lymphocytes. *Neuropeptides*. 1999;33:173–9.
- Genton L, Kudsk KA. Interactions between the enteric nervous system and the immune system: role of neuropeptides and nutrition. *Am J Surg*. 2003;186:253–8.
- Sunday ME, Yoder BA, Cuttitta F, Haley KJ, Emanuel RL. Bombesin like peptide mediates lung injury in a baboon model of bronchopulmonary dysplasia. *J Clin Invest*. 1998;102:584–94.
- Subramaniam M, Sugiyama K, Coy DH, Kong Y, Miller YE, Weller PF, et al. Bombesin-like peptides and mast cell responses: relevance to bronchopulmonary dysplasia? *Am J Respir Crit Care Med*. 2003;168:601–11.
- Sunday ME. Neuropeptides and lung development. In: McDonald JA, editor. *Lung growth and development*. New York: Marcel Dekker; 1997. p. 401–94.
- Grimsholm O, Rantapaa-Dahlqvist S, Forsgren S. Levels of gastrin-releasing peptide and substance P in synovial fluid and serum correlate with levels of cytokines in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2005;7:416–26.
- Petronilho F, Roesler R, Schwartzmann G, Dal-Pizzol F. Gastrin-releasing peptide receptor as a molecular target for inflammatory diseases. *Inflamm Allergy Drug Targets*. 2007;6:197–200.
- Dal-Pizzol F, Di Leone LP, Ritter C, Martins MR, Reinke A, Pens Gelain D, et al. Gastrin-releasing peptide receptor antagonist effects on an animal model of sepsis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006;173:84–90.
- Oliveira PG, Brenol CV, Edelweiss MI, Brenol JC, Petronilho F, Roesler R, et al. Effects of an antagonist of the bombesin/gastrin-releasing peptide receptor on complete Freund's adjuvant-induced arthritis in rats. *Peptides*. 2008;29:1726–31.
- Radulovic S, Cai R-Z, Serfozo P, Groot K, Redding TW, Pinski J, et al. Biological effects and receptor binding affinities of new pseudononapeptide bombesin/GRP receptor antagonists with N-terminal d-Trp or d-Tpi. *Int J Pept Protein Res*. 1991;38:593–600.
- Vinegar R, Traux JF, Selph JL. Some quantitative temporal characteristics of carrageenan-induced pleurisy in the rat. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1943;143:711–4.
- Lowry OH, Rosebrough AL, Randal RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951;193:265–75.

20. Green IC, Wagner DA, Glowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite and [15N] nitrate in biological fluids. *Anal Biochem.* 1982;126:131–8.
21. De Young LM, Kheifets JB, Ballaron SJ, Young JM. Edema and cell infiltration in the phorbol ester-treated mouse ear are temporally separate and can be differentially modulated by pharmacologic agents. *Agents Actions.* 1989;26:335–41.
22. Draper HH, Hadley M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 1990;186:421–31.
23. Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.* 1990;186:464–78.
24. Riddles PW, Blakeley RL, Zerner B. Reassessment of Ellman's reagent. *Methods Enzymol.* 1983;91:49–60.
25. Kroegel C, Antony VB. Immunobiology of pleural inflammation: potential implications for pathogenesis, diagnosis and therapy. *Eur Respir J.* 1997;10:2411–8.
26. Segura RM. Useful clinical biological markers in diagnosis of pleural effusions in children. *Paediatr Respir Rev.* 2004;5:205–12.
27. Antony VB, Godbey SW, Kunkel SL, Hott JW, Hartman DL, Burdick MD, et al. Recruitment of inflammatory cells to the pleura space: chemotactic cytokines IL-8, and monocyte chemoattractant peptide-1 in human pleural fluids. *J Immunol.* 1993;151:7216–23.
28. Romano M, Sironi M, Toniatti C, Polentarutti N, Fruscella P, Ghezzi P, et al. Role of IL-6 and its soluble receptor in induction of chemokines and leukocyte recruitment. *Immunity.* 1997;6:315–25.
29. Alonzi T, Fattori E, Cappelletti M, Ciliberto G, Poli V. Impaired stat3 activation following localized inflammatory stimulus in IL-6 deficient mice. *Cytokine.* 1998;10:13–8.
30. Utsunomiya I, Nagai S, Oh-ishi S. Sequential appearance of IL-1 and IL-6 activities in rat carrageenan-induced pleurisy. *J Immunol.* 1991;147:1803–9.
31. Oh-Ishi S, Hayashi I, Hayashi M, Yamaki K, Utsunomiya I. Pharmacological demonstration of inflammatory mediators using experimental inflammatory models: rat pleurisy induced by carrageenin and phorbol myristate acetate. *Dermatologica.* 1989;179:68–71.
32. Tracey WR, Nakane M, Kuk J, Budzik G, Klinghofer V, Harris R. The nitric oxide synthase inhibitor, l-NG-monomethylarginine, reduces carrageenan-induced pleurisy in the rat. *J Pharmacol Exp Ther.* 1995;273:1295–9.
33. Wei XQ, Charles IG, Smith A, Ure J, Feng GJ, Huang FP, et al. Altered immune responses in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *Nature.* 1995;375:408–11.
34. Cuzzocrea S, Zingarelli B, Costantino G, Caputi AP. Beneficial effects of Mn(III)tetrakis (4-benzoic acid) porphyrin (MnTBAP), a superoxide dismutase mimetic, in carrageenan-induced pleurisy. *Free Radic Biol Med.* 1999;26:25–33.
35. Cuzzocrea S, Zingarelli B, Hake P, Salzman AL, Szabó C. Antiinflammatory effects of mercaptoethylguanidine, a combined inhibitor of nitric oxide synthase and peroxynitrite scavenger, in carrageenan-induced models of inflammation. *Free Radic Biol Med.* 1998;24:450–9.
36. Szabo C, Wu CC, Gross SS, Thiernemann C, Vane JR. Interleukin-1 contributes to the induction of nitric oxide synthase by endotoxin in vivo. *Eur J Pharmacol.* 1993;250:157–60.
37. Jin CY, Moon DO, Lee KJ, Kim MO, Lee JD, Choi YH, et al. Piceatannol attenuates lipopolysaccharide-induced NF-kappaB activation and NFkappaB-related proinflammatory mediators in BV2 microglia. *Pharmacol Res.* 2006;54:461–7.
38. Mariotto S, Esposito E, Di Paola R, Ciampa A, Mazzon E, de Prati AC, et al. Protective effect of *Arbutus unedo* aqueous extract in carrageenan-induced lung inflammation in mice. *Pharmacol Res.* 2008;57:110–24.
39. Yasui K, Baba A. Therapeutic potential of superoxide dismutase (SOD) for resolution of inflammation. *Inflamm Res.* 2006;55:359–63.
40. Cuzzocrea S, McDonald MC, Filipe HM, Costantino G, Mazzon E, Santagati S, et al. Effects of tempol, a membrane-permeable radical scavenger, in a rodent model of carrageenan-induced pleurisy. *Eur J Pharmacol.* 2000;390:209–22.
41. Nardi GM, Siqueira Junior JM, Delle Monache F, Pizzolatti MG, Ckless K, Ribeiro-do-Valle RM. Antioxidant and anti-inflammatory effects of products from *Croton celtidifolius* Bailon on carrageenan-induced pleurisy in rats. *Phytomedicine.* 2007;14:115–22.
42. Bhattacharyya S, Dudeja PK, Tobacman JK. Carrageenan-induced NFkappaB activation depends on distinct pathways mediated by reactive oxygen species and Hsp27 or by Bel10. *Biochim Biophys Acta.* 2008;1780:973–82.
43. Menegazzi M, Di Paola R, Mazzon E, Genovese T, Crisafulli C, Dal Bosco M, et al. Glycyrrhizin attenuates the development of carrageenan-induced lung injury in mice. *Pharmacol Res.* 2008;58:22–31.
44. Aksenov MY, Markesbery WR. Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett.* 2001;302:141–5.
45. Kirkham P, Rahman I. Oxidative stress in asthma and COPD: antioxidants as a therapeutic strategy. *Pharmacol Ther.* 2006;111:476–94.
46. Fröde-Saleh TS, Calixto JB. Synergistic antiinflammatory effect of NF-kappaB inhibitors and steroidal or non steroidal antiinflammatory drugs in the pleural inflammation induced by carrageenan in mice. *Inflamm Res.* 2000;49:330–7.
47. Levine L, Lucci JA, Pazdrak B, Cheng JZ, Guo YS, Townsend CM Jr, et al. Bombesin stimulates nuclear factor kappaB activation and expression of proangiogenic factors in prostate cancer cells. *Cancer Res.* 2003;63:3495–502.

Capítulo II

Antagonist of gastrin-releasing peptide receptors induces a protection from lethal sepsis: involvement of toll-like receptor 4 signaling

Fabricia Petronilho, Bruna de Souza, Larissa Constantino, Francieli Vuolo, Cristiane Damiani Tomasi, Vinicius Renne Giombelli, Cláudio Teodoro de Souza Sabrina da Silva, Denise Frediani Barbeiro, Francisco Garcia Soriano, Emílio Luiz Streck, Cristiane Ritter, Alfeu Zanotto-Filho, Daniel Pens Gelain, José Cláudio Fonseca Moreira, Norman L. Block, Rafael Roesler, Gilberto Schwartsmann, Andrew V. Schally, Felipe Dal-Pizzol

Artigo científico a ser submetido para publicação no periódico
Proceedings of the National Academy of Sciences USA (PNAS)

Antagonist of gastrin-releasing peptide receptors induces a protection from lethal sepsis: involvement of toll-like receptor 4 signaling

Fabricia Petronilho^a, Bruna de Souza^a, Larissa Constantino^a, Francieli Vuolo^a, Cristiane Damiani Tomasi^a, Vinicius Renne Giombelli^a, Cláudio Teodoro de Souza^b Sabrina da Silva^b, Denise Frediani Barbeiro^c, Francisco Garcia Soriano^c, Emílio Luiz Streck^a, Cristiane Ritter^a, Alfeu Zanotto-Filho^d, Daniel Pens Gelain^d, José Cláudio Fonseca Moreira^d, Norman L. Block^e, Rafael Roesler^{e,f,g}, Gilberto Schwartzmann^{f,g,h}, Andrew V. Schally^j, Felipe Dal-Pizzol^{a,1}

^aExperimental Physiopathology Laboratory, Graduate Program in Health Sciences, University of Southern Santa Catarina-UNESC, Criciúma, SC, Brazil;

^bLaboratory of Exercise Biochemistry and Physiology, Graduate Program in Health Sciences, University of Southern Santa Catarina-UNESC, Criciúma, SC, Brazil;

^cDepartment of Internal Medicine, Academic Hospital, São Paulo University, São Paulo, SP, Brazil; ^dCenter for Oxidative Stress, Department of Biochemistry, Institute for Basic Health Sciences, Departments of Biochemistry and Pharmacology, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil;

^eDepartment of Urology, University of Miami Miller School of Medicine, Miami, Florida; ^fLaboratory of Molecular Neuropharmacology, Department of Pharmacology, Institute for Basic Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil;

^gCancer Research Laboratory, University Hospital Research Center (CPE-HCPA), Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil; ^hNational Institute for Translational Medicine, Porto Alegre, RS, Brazil;

ⁱDepartment of Internal Medicine, Faculty of

Medicine, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil;
ⁱVeterans Affairs VA Medical Center and Department of Medicine, Divisions of
Endocrinology and Hematology-Oncology, University of Miami Miller School of
Medicine, and Department of Pathology, University of Miami Miller School of
Medicine, Miami, FL USA

Author contributions:

¹To whom correspondence should be addressed at: Laboratório de
Fisiopatologia Experimental, Universidade do Extremo Sul Catarinense,
Avenida Universitária, 1105, 88806-000, Criciúma, SC, Brazil. E-mail:
piz@unesc.net

Manuscript information

Number of text pages: 34

Number of figures: 5

Number of tables: 1

Abbreviations: Toll-like receptor 4 (TLR-4), gastrin-releasing peptide receptor (GRPR), tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin -1 β (IL-1 β), cecal ligation and puncture (CLP), nuclear factor- κ B (NF- κ B), activator protein 1 (AP-1), lipopolysaccharide (LPS), systemic inflammatory response syndrome (SIRS), LPS-binding protein (LBP), myeloid differentiation primary response protein 88 (MyD88), mitogen-activated protein kinases (MAPK), extracellular signal-regulated kinase (ERK-1/2), c-Jun NH2-terminal kinase (JNK), bombesin (BN), gastrin-releasing peptide (GRP), Toll-like receptors (TLRs), reverse transcriptase–polymerase chain reaction (RT-PCR), monocyte chemotactic protein 1 (MCP-1), interleukin-6 (IL-6), vasoactive intestinal peptide (VIP), phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), vasoactive intestinal peptide (VIP).

Abstract

In lethal polymicrobial sepsis, toll-like receptor-4 (TLR-4) signaling mediates a critical role in impeding the migration of neutrophils to infectious foci, thereby favoring increased bacteremia and ultimately leading to mortality. We have previously shown that the selective gastrin-releasing peptide receptor (GRPR) antagonist RC-3095 can reduce organ dysfunction in experimental sepsis by modulating the release of cytokines by activated macrophages. Here we report a novel link between GRPR and TLR-4 signaling and its relationship with inflammatory parameters in *in vitro* and *in vivo* experimental models as well as in sepsis patients. RC-3095 treatment inhibited expression of TLR-4 and molecules in its downstream signaling pathway, leading to decreased activation of nuclear factor- κ B (NF- κ B) and activator protein 1 (AP-1) in macrophages. In a rat model of sepsis, RC-3095 treatment decreased lung TLR-4 content, reduced the migration of inflammatory cells to the lung, reduced systemic cytokine levels, and attenuated bacterial dissemination. Patients with systemic inflammatory response syndrome (SIRS) and sepsis displayed elevated plasma levels of GRP and GRP plasma levels correlated with clinical outcome in the sepsis patients. These findings highlight the role of GRPR signaling in sepsis outcome and the beneficial action of GRPR antagonism in controlling the inflammatory response in sepsis through a mechanism involving inhibition of TLR-4 signaling.

Keywords: gastrin releasing peptide/ toll-like receptor 4/ RC-3095/sepsis

Introduction

Sepsis remains a critical problem with significant morbidity and mortality despite modern advances in critical care management. Severe sepsis (acute organ dysfunction secondary to infection) and septic shock (severe sepsis plus hypotension not reversed by fluid resuscitation) are major healthcare problems, affecting millions of individuals around the world annually, killing upwards of one in four afflicted patients, and increasing in incidence (1–5). As sepsis accounts for >200,000 deaths and accounts for an estimated expenditure of \$16 billion per annum in the United States alone (6), it is a financial motivations for researchers in the pharmaceutical industry to develop a therapy that can substantially improve sepsis clinical outcomes (7). A better understanding of the molecular mechanisms associated with development of sepsis and sepsis-related organ injury is essential for reducing sepsis-related mortality.

Systemic inflammation is characterized by increased levels of circulating cytokines and chemokines, and neutrophil sequestration in the lung (8). Reduction of neutrophil chemotaxis has been associated with illness severity and organ damage (9,10). Expansion of bacterial infection leads to systemic toll-like receptor (TLR) activation (11). Endotoxin (lipopolysaccharide, LPS), a major cell wall component in Gram-negative bacteria, is generally considered to be a major pathogenic element in Gram-negative bacterial infection, and can induce systemic inflammatory response syndrome (SIRS) (12). LPS sensing by innate immune cells is vital for host defense against Gram-negative bacteria. Recognition of LPS requires the accessory protein LPS-binding protein (LBP), which converts oligomeric micelles of LPS into monomers that can interact with CD14 for binding to the TLR-4-MD2 complex which is present on the surface of

many cell types including macrophages and dendritic cells (13). LPS-LBP-CD14 binding of the TLR-4-MD2 complex triggers conformational changes in TLR-4 that activate an intracellular downstream signaling pathway. Molecules involved in the TLR-4 activated pathway include the adaptor molecule myeloid differentiation primary response protein 88 (MyD88), interleukin (IL)-1 receptor-associated kinases, and tumor necrosis factor (TNF) receptor-associated factor 6 (14). This pathway culminates in activation of several mitogen-activated protein kinases (MAPKs), including extracellular signal-regulated kinase (ERK)-1/2, c-Jun NH2-terminal kinase (JNK) and p38, as well as activation of the transcription factors NF- κ B and AP-1, resulting in the expression of numerous genes encoding cytokines and other inflammatory molecules (6, 15). It is well documented that NF- κ B and AP-1 play prominent roles in LPS-induced transcriptional regulation of inflammatory genes that contribute to the development of septic shock and multiple organ failure (16). C3H/HeJ mice bearing a mutation in the TLR-4 gene and TLR-4 knockout mice are hyporesponsive to LPS and exhibit resistance to LPS-induced mortality, indicating that TLR-4 signaling plays a critical role in LPS-induced sepsis (12). However, TLR-4-defective mice exhibit neutrophil migration to the peritoneal cavity during polymicrobial sepsis induced by lethal cecal ligation and puncture (CLP), and as a consequence, were more resistant to sepsis than controls. The systemic inflammatory response was also reduced in TLR-4-defective mice because cytokine levels were lower than in wild-type TLR-4 mice submitted to polymicrobial peritonitis. These results suggest that TLR-4 signaling may diminish neutrophil migration to infection sites and promote an excessive systemic inflammatory response (17). Given its central role in the pathogenesis

of sepsis, TLR-4 is a target of choice for the development of novel antisepsis therapies (6).

Bombesin (BN) is a 14-amino acid peptide isolated from frog skin (18). BN-like immunoreactivity via amphibian BN antibodies has been demonstrated in the mammalian gut, central nervous system (CNS) and lung. Gastrin-releasing peptide (GRP), a BN-like peptide, has been implicated in the pathogenesis of inflammatory conditions (19-21) by studies showing that it is involved in the control of CNS and gastrointestinal system functions (22,23), cancer growth (24,25), and immune cell regulation (26-28). BN-like receptors such as GRP/BN-preferring receptor (GRPR), neuromedin B receptor, and the orphan BN receptor subtype 3, have been cloned. These receptors are seven-transmembrane-spanning G protein-coupled receptors that are able to stimulate various intracellular signaling pathways that are intimately involved in activation of neutrophils and macrophages by chemokines (29), long known to attract various inflammatory cells (30).

We recently demonstrated that the selective GRPR antagonist RC-3095 attenuates the release of proinflammatory cytokines *in vitro* and *in vivo* and improves survival in experimental sepsis (31). In particular, we showed in a well-established model of sepsis and acute lung injury that RC-3095 could reduce mortality rates by alleviating organ dysfunction and inflammatory infiltration and modulating the release of pro-inflammatory cytokines by activated macrophages (31). These findings are consistent with the involvement of a GRPR-stimulated inflammatory pathway in the development of sepsis. Given that TLRs are essential components of the innate immune response to infection and a growing body of evidence indicates that these receptors may

play a role in the pathophysiology of sepsis (32-34), together with the aforementioned critical role of TLR-4 in particular in neutrophil migration (6), we hypothesize that GRPR stimulation may exert its inflammatory effects via a mechanism involving the TLR-4 signaling pathway.

The aims of this study were firstly investigate the effects of RC-3095 on TLR-4 expression and its signaling pathways in LPS-stimulated peritoneal macrophages. Additionally, TLR-4 content, cytokine/chemokine levels, neutrophil migration levels, and bacterial dissemination levels were determined in a CLP animal model of sepsis. These experiments in animals were completed by an examination of cytokine levels in human septic patients. Anti-inflammatory neuropeptides have recently emerged as endogenous factors participating in the maintenance of immune tolerance and a loss of immune tolerance results in the breakdown of immune homeostasis and an exacerbation of inflammatory conditions (35). Therefore, our second aim was to examine whether GRP levels in plasma are related to sepsis severity in humans.

Results

GRPR antagonist RC-3095 inhibits expression of TLR-4 and its signaling pathway constituent molecules in LPS-stimulated RAW 264.7 cells.

Reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) experiments in RAW 264.7 cultures revealed that RC-3095 significantly reduced TLR-4 mRNA levels in macrophages after LPS exposure (Fig. 1A). The decreased TLR-4 expression induced by RC-3095 was followed by decreased ERK1/2, JNK and Akt phosphorylation in a sustained fashion (until 60 min after the end of RC-3095 treatment) (Fig. 1B). Subsequent electromobility shift assay (EMSA)

experiments showed that the nuclear extract from LPS-stimulated RAW 264.7 cells had a significant increase in the DNA-binding activity of NF- κ B and AP-1 (Fig. 1C). However this binding activity was suppressed by RC-3095 exposure, suggesting that suppression of NF- κ B and AP-1 nuclear translocation by RC-3095 was associated with decreased gene expression of TLR-4 and MAP kinase activation (Fig. 1A and B).

RC-3095 inhibits expression of TLR-4 in the lung in an animal model of polymicrobial sepsis. RT-PCR using TLR-4 specific primers demonstrated high levels of TLR-4 mRNA expression in lung tissue 6 h after sepsis and significantly reduced expression of TLR-4 mRNA in RC-3095 treated animals relative to that in the sepsis group (Fig. 2A). Immunoblotting experiments showed that the decreased mRNA levels in the lung were followed by decreased TLR-4 protein levels (Fig. 2B), and a subsequent decrease in inflammatory cell presence in the bronchoalveolar fluid (Fig. 2C). Thus pharmacologic blockade of the GRP-GRPR system decreased TLR-4 expression and protein content both *in vitro* and *in vivo*.

RC-3095 decreases cytokine/chemokine expression in LPS-activated RAW 264.7 cells and in severe sepsis animal model and in septic patients. Enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs) revealed elevated monocyte chemotactic protein 1 (MCP-1) levels in RAW 264.7 cells exposed to LPS (Fig. 3A) and serum and the bronchoalveolar fluid (BALF) of CLP septic rats (Fig. 3B and Fig. 3C), relative to unexposed control cells and un-ligated control rats, respectively. Administration of RC-3095 resulted in a significant decrease in

MCP-1 levels compared with the corresponding levels in LPS-exposed cells and CLP septic rats. LPS-stimulated RAW 264.7 cells (Fig. 3D) and vehicle-injected CLP animals showed a significant increase in serum (Fig. 3E) and BALF (Fig. 3F) interleukin-6 (IL-6) levels compared with that in unstimulated cells and sham rats, respectively. RC-3095 administration significantly reduced IL-6 levels both *in vitro* and in the animal model of sepsis (Fig. 3D-F). Continuous infusion with RC-3095 (3 mg/kg) for 12 h decreased IL-6 plasma levels in septic patients (Fig. 3G) but did not significantly affect IL-10 plasma levels (Fig. 3H). These data demonstrate that TLR-4 inhibition mediated by RC-3095 decreased inflammatory markers in sites distant to the infectious focus.

RC-3095 decreases inflammatory cell migration to the lung and bacterial dissemination. RC-3095 decreased inflammatory cell levels in the BALF of CLP animals compared to that in untreated CLP animals (Fig. 4A). RC-3095 administration also reduced bacterial dissemination in circulation (Fig. 4B) and in peritoneal exudate (Fig. 4C) compared to levels in untreated CLP animals.

Plasma GRP levels can be related to outcome in septic patients. The clinical profiles of sepsis patients (regardless of severity, n = 30) were compared to those of patients with SIRS (n = 29). The data were further analyzed for differences among sepsis patients according to disease severity: sepsis (n = 9), severe sepsis (n = 10), and septic shock (n = 11) patients. The patient groups were similar in terms of race, age, sex, ICU stay, sepsis source and SOFA score (data not shown). The median APACHE II score of the mild to moderate sepsis group was lower than those of the septic shock, severe sepsis

and SIRS groups (Table 1). Plasma GRP concentrations sampled on the patients' first day in the intensive care unit (ICU) were similar between the SIRS patients and sepsis patients (sepsis, severe sepsis, and septic shock combined; Fig. 5A). Comparing patients across sepsis gravity levels, we found that patients with septic shock had greater GRP concentrations than their sepsis and severe sepsis counterparts (Fig. 5B). Both SIRS and sepsis patients had significantly higher GRP concentrations compared to healthy subjects (data not shown). Clinical outcome measures revealed that those subjects with the highest GRP concentrations had major mortality in the sepsis groups (Fig. 5C); this association was not apparent in patients with SIRS (Fig. 5D). Patients with a GRP concentration <1 pg/ml had no mortality, whereas those with a GRP concentration ≥ 1 pg/ml had a mortality rate of approximately 87% (Fig. 5E), with an area under the ROC curve of 0.85.

Discussion

In the present study, we demonstrated for the first time that RC-3095 treatment can decrease TLR-4 expression and downstream signaling activation in RAW 264.7 cells stimulated by LPS, leading to a decrease of release of chemokines and cytokines. These results were supported by our *in vivo* experiments which showed lower IL-6 and MCP-1 concentrations and bacteremia in RC-3095 treated CLP animals. We further showed that RC-3095 treatment decreased inflammatory cell levels in the BALF of CLP animals. These findings are noteworthy given that neutrophil function is essential to preventing bacterial dissemination into the circulation; thus we can postulate that impairment of their migration should contribute to bacterial clearance failure during an infection

process (36). Our results indicate that the RC-3095 treatment limited the spread of infection beyond the abdominal compartment, suggesting that RC-3095 could potentially prevent development of multiple organ dysfunction syndrome (35-39). There are numerous factors that interact in the long chain of events from pathogen recognition to the overwhelming of host responses (40). Our findings provide support for the notion that TLR-4 is a particularly important element of host defense during an infection and may play a role in the pathophysiology of sepsis (33,34,41). This view is strongly supported by prior research showing that TLR-4 defective mice do not exhibit failure of neutrophil migration to the peritoneal cavity during polymicrobial sepsis induced by lethal CLP, and as consequence, are more resistant to sepsis than controls (17). Furthermore, increased concentration TLR-4 mRNA in lung tissue 3 h after CLP surgery has been shown to precede and correlate with death (32).

It is well established that immune responses may be influenced by the nervous system (42). Studies supporting the involvement of neuropeptides in inflammatory diseases have focused predominantly on a proinflammatory role for substance P (43,44), GRP (31,45) and nociceptin/orphanin FQ (46), as well as an immunomodulatory role for peptide Y (47) and an anti-inflammatory role for vasoactive intestinal peptide (VIP) (48). Furthermore neuropeptides, which regulate the macrophage response to LPS, affect TLR-4 expression (49), and regulate TLR-4 signaling (50). In this context, and because activated macrophages have been shown to secrete GRP (51) and macrophages seem to be central in the development of sepsis and septic shock (52,53), we observe a decrease in the expression of TLR-4 mRNA in RAW 264.7 cells stimulated by LPS following treatment with RC-3095. Our findings are consistent with recent

reports that increased expression of TLR-2 and TLR-4 during the early phase of sepsis correlates with death in CLP animals (32), and that the down-regulation of these receptors increases their survival (17). Furthermore, our observation that RC-3095 inhibits upregulation of TLR-4 in polymicrobial sepsis in lung tissue 6 h after CLP, resulting in a diminution of lung inflammation, fits with prior research indicating that GRP is present in pulmonary neuroendocrine cells and may be a mediator of acute and chronic lung injury in bronchopulmonary dysplasia (54), as well as work showing that the GRPR antagonism can alleviate alveolar edema and inflammatory infiltration (31).

TLR activation can be affected by perturbation of receptor complexes by soluble TLRs or structurally related membrane proteins, ubiquitin-mediated degradation of TLRs, and signaling proteins, sequestration of adapter proteins, expression of dominant negative signalling inhibitors, and deactivation of kinases through phosphatases (55,56). BN-activated G protein-coupled receptor may phosphorylate proteins members of the Jak/STAT family (57). RC-3096 might exert its effects on TLR-4 expression through STAT6 as phosphorylated STAT6 down-regulates TLR-4 expression and STAT6 overexpression enhances inhibition of the TLR-4 promoter (58). TLR-4 enhances the inflammatory response through four major intracellular kinase signaling pathways: p39 MAPK, JNK, and phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt (59-63). The present results provide a clear demonstration that GRPR antagonism influences TLR-4 induced activation of intracellular kinase signaling pathways. TLR-4 signaling has been previously shown to activate the ERK1/2, JNK and PI3K pathways, ultimately activating Akt (12, 64-69).

Activation of TLR-4 leads to increased activity of NF- κ B and AP-1 transcription factors (68) while TLR-4-binding peptide inhibits LPS-induced activation of NF- κ B (12). NF- κ B and AP-1 appear to play key roles in the transcription of a number of inflammatory genes strongly involved in the pathophysiology of sepsis (68). These observations are in accordance with our results showing that RC-3095 exposure in RAW 264.7 cells decreased LPS-stimulated DNA-binding activity of NF- κ B and AP-1.

Neutrophil recruitment to infection sites is heavily dependent on chemotactic cytokines (chemokines) such as MCP-1 (10,62). Moreover, because IL-6 directly affects the adhesion and migratory functions of neutrophils, it may promote the activity and production of important neutrophil modulators (69,79). Wagner and Roth's work showed that plasma MCP-1 and IL-6 are intermediate effectors in neutrophil migration by 1-2 h after endotoxemia (71). Systemic activation of TLR-4 results in inadequate activation of neutrophils by bacterial products and/or chemokines induced by the expression of inducible nitric oxide synthase, resulting mainly in CXCR2 desensitization and loss of adhesion molecules (e.g. L-selectin). In addition, increase in acute-phase protein serum levels induced by chemokines may also inhibit neutrophil-endothelium interactions, thereby reducing the rolling/adhesion and chemotaxis of neutrophils and ultimately disrupting neutrophil migration (41).

During endotoxic shock, massive numbers of neutrophils and other leukocytes accumulate in the lung, a process entirely dependent on TLR-4. Leukocyte accumulation in the lung is also observed in human septic patients (72) and systemic activation of TLR-4 results in immense trapping of leukocytes within lung capillaries (73-75). Furthermore, neuropeptides are known to

stimulate cytokine production in macrophages, lymphocytes, and mast cells, and substance P is reported to influence LPS-induced production of pro-inflammatory cytokines, which was abolished by neurokinin-1 (NK-1) receptor blocking (76). Arranz and collaborators have showed that pro-inflammatory cytokines can act synergistically, together with Gram-negative bacterial components, to upregulate TLR-4 expression, and it is possible that VIP-induced inhibition of TLR-4 up-regulation in inflammatory models occurs indirectly via suppression of pro-inflammatory cytokine production (77). We proposed in recent review that GRP may serve an autocrine/paracrine role in macrophage activation during sepsis and/or LPS stimulation, leading to a modulation of pro-inflammatory, but not anti-inflammatory responses (44).

In this study, we demonstrated RC-3095 to be an effective blocker of bacterial dissemination into the circulation. Our results showing that acute RC-3095 treatment decreased cell migration in the lung fit Alves-Filho et al.'s findings showing that TLR-4-deficient mice exhibit reduced neutrophil migration to the infection focus and sequestration of the cells within lung tissue during lethal polymicrobial sepsis (17). Cell sequestration is a key event in sepsis-induced acute lung injury as it hampers bacterial clearance, leading to bacteremia.

The presence of increased GRP concentrations in patients with inflammatory disease and correlations of GRP concentration with erythrocyte sedimentation rate and with TNF and IL-6, suggest that it may also be involved in modulation of the inflammatory process in humans (78-79). The present observation of reduced IL-6, but not IL-10, levels in the plasma of sepsis

patients treated with RC-3095 indicates that this GRPR antagonist may be selective for activation of pro-inflammatory cytokines.

Our results suggest that GRP may be differentially involved in SIRS and sepsis. Despite the presence of similar plasma levels of GRP between SIRS and sepsis patients, GRP could only predict outcome in septic patients. Our accompanying findings suggesting that GRP increases the inflammatory response via TLR upregulation could, at least in part, explain the presently observed differences between septic and SIRS patients.

Conclusions

The present experiments demonstrated that GRPR antagonism exerts an overall protective role in LPS-activated macrophages culture and in acute sepsis in rodents. Our results further indicate that this protective effect can be attributed to an attenuation of TLR-4 signaling. This attenuation favors neutrophil infiltration, resulting in decreased bacteremia and thus improving sepsis outcome. Our finding that plasma GRP levels could predict outcome in sepsis but not SIRS patients suggests that GRP plays different roles in the two conditions. Our findings suggest that GRPR antagonism modulates uncontrolled inflammation by targeting TLR-4-mediated responses and immunoregulatory functionality. Taken together, the present results suggest that a GRPR antagonist could be developed as a new alternative therapy for Gram-negative bacterial sepsis.

Materials and Methods

Cells. RAW 264.7 macrophages were obtained from UFRJ Cell Bank, Rio de Janeiro, Brazil. In preparation for RT-PCR analyses of TLR-4 mRNA, immunoblotting of pERK1/2, pJNK, pAkt, and EMSA of NF- κ B and AP-1, the cells were seeded in 24 well plates (0.5×10^6 cells/well) and incubated for 24 h in RPMI-1640 media supplemented with 10% bovine fetal serum.

Animal subjects. A total of 15 male Wistar rats, 2 to 3 mos. old, were used in this study. The rats were randomly divided, $n = 5$ per group, into sham operated, CLP and CLP plus RC-3095 groups. Six hours after surgery (described below), all rats were anesthetized with a mixture of ketamine (80 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg), given intraperitoneally. As soon as anesthesia was confirmed in each animal by the loss of pedal and corneal reflexes, the animal's thoracic cavity was opened and it was killed by cardiac puncture. Blood was collected from the site of the cardiac puncture, BALF and peritoneal lavages were performed, and the lung tissue was dissected out. All experimental procedures involving animals were performed in accordance with National Institutes of Health (Bethesda, MD) *Guide for Care and Use of Laboratory Animals* with the approval of our institutional ethics committee.

Human subjects. Twelve patients, (7 males, 5 females), admitted to an adult medical ICU with a clinical diagnosis of septic shock and failure of three or more organs were enrolled in the RC-3095 administration experiment according to the Consensus Conference (80). All procedures involving patients and healthy volunteers were performed in compliance with the Declaration of Helsinki and National Institutes of Health guidelines and were approved by the institutional

ethics committee (protocol number 431/2006). All patients gave their informed consent prior to their inclusion in the study. Their mean age (\pm SD) was 61 ± 7 y. Patients' plasma samples were collected in heparin-treated vacuum tubes before and after RC-3095 administration.

All patients consecutively admitted to an adult medical ICU between August 2008 and December 2008 with SIRS or sepsis diagnosis were screened for enrollment in the GRP analysis experiment. Septic patients ($n = 30$) were classified as sepsis, severe sepsis, or septic shock according to the Consensus Conference (80) by two board-certified internal medicine specialists. Septic patients were paired to SIRS patients ($n = 29$) in relation to age, gender, severity scores and mortality (demographics summarized in Table 1). Patients were eligible if the time between sepsis diagnosis (this was done by reviewing medical charts and/or contacting to patients assisting physician) and ICU admission was no more than 24 h. In parallel, clinically relevant data were recorded daily for 28 d. Exclusion criteria were: age below 18, chronic hepatic or renal insufficiency, neoplasia receiving chemo, or radiotherapy and immunodeficiency. Blood samples were drawn into heparin-treated vacuum tubes for GRP quantitative analysis (described below).

CLP model. Rats were subjected to CLP as previously described (81). Briefly, they were anesthetized with a mixture of ketamine (80 mg/kg) and xylazine 10 mg/kg, given intraperitoneally. Under aseptic conditions, a 3-cm midline laparotomy was performed to expose the cecum and adjoining intestine. The cecum was tightly ligated with a 3.0 silk suture at its base, below the ileocecal valve, and was perforated once with 14-gauge needle. The cecum was then

squeezed gently to extrude a small amount of feces through the perforation site. The cecum then was returned to the peritoneal cavity and the laparotomy was closed with 4.0 silk sutures. Animals were resuscitated with normal saline (50 mL/kg subcutaneous) immediately after the operation. All animals were returned to their home cages with free access to food and water.

Drug treatments. GRP receptor antagonist RC-3095, originally synthesized in the Shally laboratory by solid-phase methods (82), was obtained from Zentaris (Frankfurt am Main, Germany). Cultures were exposed to LPS (*Escherichia coli* 055:B5, Sigma Aldrich, St. Louis, MO) (100 ng/ml)–supplemented medium (RPMI 1640) or RPMI 1640 alone and, 4 h later, RC-3095 (10 ng/ml) was added for 2 h. Several times after the treatment period, cells and/or media samples were collected for analyses in RC-3095-free media. Rats in the CLP plus RC-3095 group were administered RC-3095 (3 mg/kg, subcutaneously) immediately after surgery. Human patients received a continuous infusion with RC-3095 (3 mg/kg) over a period of 12 h.

RT-PCR. RNA was extracted from RAW 264.7 cells and from lung tissue specimens collected from animals in the CLP and CLP+RC3095 groups using TRIZOL reagent (Invitrogen[®]). RNA concentration was determined by absorbance at 260 nm, and RNA integrity was confirmed by electrophoresis on 1% agarose gels and staining with 0.1 mg/L ethidium bromide. After DNase I digestion of the total extracted RNA, 1- μ g aliquots of RNA were used to synthesize single-strand cDNA using oligo dT primer (Promega[®]) and Impron II reverse transcriptase (Promega[®]). PCR was carried out with 1.0 μ l of RT

product serving as the template. The amplified products were analyzed by ethidium bromide-stained agarose gel electrophoresis. For cell extracts, the PCR primer sequence for TLR-4 were 5'GGCAGCAGGTGGAATTGTAT 3' (sense) and 5'AGGCCCCAGAGTTTTGTTCT 3'(reverse) 5' AAGAGCTGGAATACCTGGAC 3' (sense) and 5'GAAATGCTACAGTGGCTACC 3'(reverse) for cell extracts and for animal tissues. The gel was analyzed using Gene Flash and Software Image Gene Tools (Syngene). TLR-4 mRNA levels were expressed as the ratio of signal intensity for the target genes in relation to that for co-amplified glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

EMSA. The protein contents of RAW 264.7 cell nuclear extracts were prepared as described previously (83). EMSA was performed using biotin-labeled oligonucleotides to measure NF- κ B or AP-1 content according to the kit manufacturer's protocol (Pierce).

Western blot. Phosphorylation of ERK1/2, JNK and Akt in cells was measured by western blotting wherein whole cell lysates (20 μ g, for phospho-ERK1/2, phospho-JNK and phospho-Akt) were separated by 10% SDS-PAGE and then electro-transferred to nitrocellulose membranes (Amersham International, Buckinghamshire, UK). The membranes were preincubated for 1 h at room temperature in Tris-buffered saline, pH 7.6, containing 0.05% Tween 20 and 3% bovine serum albumin. The nitrocellulose membranes were incubated with phosphorylated ERK1/2, phosphorylated JNK and phosphorylated Akt and the

immunoreactive bands were detected by incubation with HRP conjugates of anti-rabbit IgGs and enhanced with chemoluminescence reagents (Amersham).

TLR-4 protein content in rat BALF and lung tissue was also quantified by immunoblotting. The tissues were pooled, minced coarsely, and homogenized immediately in extraction buffer (mM) (1% Triton-X 100, 100 Tris, pH 7.4, containing 100 sodium pyrophosphate, 100 sodium fluoride, 10 EDTA, 10 sodium vanadate, 2 PMSF and 0.1 mg of aprotinin/ml) at 4°C with a Polytron PTA 20S generator (Brinkmann Instruments model PT 10/35) operated at maximum speed for 30 s. The extracts were centrifuged at 11000 rpm and 4°C in a Beckman 70.1 Ti rotor (Palo Alto, CA) for 40 min to remove insoluble material, and the supernatants of these tissues were used for protein quantification, using the Bradford method (84). Extracted proteins were denatured by boiling in Laemmli (85) sample buffer containing 100 mM DTT, run on SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membranes. The membranes were blocked, probed with anti-TLR antibodies (Santa Cruz Biotechnology, Inc, CA) and developed as described previously (86). The blots were exposed to preflashed Kodak XAR film with Cronex Lightning Plus intensifying screens at -80°C for 12–48 h. Band intensities were quantitated by optical desitometry (Scion Image software, ScionCorp, Frederick, MD) of the developed autoradiographs.

ELISA. Concentrations of IL-6 (in cells, rat BALF and serum, and human plasma), IL-10 (in human plasma) and MCP-1 (in cells, rat BALF and serum) were determined by a standard sandwich ELISA, employing commercially available kits (R&D Systems, Minneapolis, MN). Plasma GRP concentrations

were determined in blood samples from healthy volunteers and septic patients by ELISA commercial assays according to the manufacturer's instructions (Phoenix Pharmaceuticals, Inc., Burlingame, CA, U.S.A.).

Neutrophil migration in BALF. Cells were harvested by introducing 1.5 ml of sterile PBS through the tracheal cannula and withdrawn to recover BALF. Migrating neutrophil cell counts were performed as previously described (87). The results are expressed as the number of cells/mm³.

Bacterial counts in the peritoneal exudate and blood. Bacterial count was determined as previously described (88). Briefly, after peritoneal lavage with sterile PBS and blood collection performed during euthanasia (described above), aliquots of serial dilutions of the samples were plated on Muller-Hinton agar dishes (Difco Laboratories) and incubated at 37°C; colony-forming units (CFUs) were analyzed after 24 h. The results were expressed as CFU/ml.

Statistical Analysis

Results are expressed as means \pm SD and $p < 0.05$ was considered significant. Differences between groups were determined by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's *post hoc* test. Differences between two groups were determined by *t* test. In the human experiments, demographic and clinical characteristics of the study groups were compared by *t*-test, χ^2 test or ANOVA, followed by LSD *post hoc* test, as appropriate, and a two-sided significance level of 0.05 or less was considered statistically significant. The accuracy of GRP concentrations in distinguishing between survivors and non-survivors was

examined separately by receiver operator characteristic (ROC) curves. Survival curves were generated by the Kaplan-Meier curve. Differences between groups were calculated by the log rank test. All statistical analyses were performed with SPSS 12.0 for Windows (SPSS, Chicago, IL).

ACKNOWLEDGMENTS. This work was supported by the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq); the South American Office for Anticancer Drug Development (SOAD; Porto Alegre, Brazil); and the National Institute for Translational Medicine (INCT program).

1. Angus DC, *et al.* (2001) Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med* 29:1303–1310.
2. Dellinger RP (2003) Cardiovascular management of septic shock. *Crit Care Med* 31: 946–955.
3. Martin GS, Mannino DM, Eaton S, Moss M (2003) The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med* 348:1546–1554.
4. Linde-Zwirble WT, Angus DC (2004) Severe sepsis epidemiology: sampling, selection, and society. *Crit Care* 8:222–226.
5. Dombrovskiy VY, Martin AA, Sunderram J, Paz HL (2007) Rapid increase in hospitalization and mortality rates for severe sepsis in the United States: a trend analysis from 1993 to 2003. *Crit Care Med* 35:1414–1415.
6. Matsuda N, Hattori Y (2006) Systemic inflammatory response syndrome (SIRS): molecular pathophysiology and gene therapy. *J Pharmacol Sci* 101: 189-198.
7. Dyson A, Singer M (2009) Animal models of sepsis: Why does preclinical efficacy fail to translate to the clinical setting? *Supplement* 37: 30-37.
8. Abraham E (2003) Neutrophils and acute lung injury. *Crit Care Med* 31:195–199.
9. Hedge A, Zhang H, Moochhala SM, Bhatia M (2007) Neurokinin-1 receptor antagonist treatment protects mice against lung injury in polymicrobial sepsis. *J Leukoc Biol* 82: 678-685.

10. Chishti AD, Shenton BK, Kirby JA, Baudouin SV (2004) Neutrophil chemotaxis and receptor expression in clinical septic shock. *Intensive Care Med* 30:605–611.
11. Alves-Filho JC, *et al.* (2009) Regulation of chemokine receptor by Toll-like receptor 2 is critical to neutrophil migration and resistance to polymicrobial sepsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:4018-4023.
12. Sugiyama K, Muroi M, Tanamoto K (2008) A novel TLR-4-binding peptide that inhibits LPS-induced activation of NF-KappaB and vivo toxicity. *Eur J Pharmacol* 10: 152-156.
13. Miller SI, Ernst RK, Bader MW (2005) LPS, TLR-4 and infectious disease diversity. *Nat Rev Microbiol* 3:36-46.
14. Tsung A, *et al.* (2007) A novel inhibitory peptide of Toll-like receptor signaling limits lipopolysaccharide-induced production of inflammatory mediators and enhances survival in mice. *Shock* 27: 364-369.
15. Weighardt H, Holzmann B (2007) Role of Toll-like receptor responses for sepsis pathogenesis. *Immunobiology* 212:715-722.
16. Hellmich MR, *et al.* (1999) Multiple protein kinase pathways are involved in gastrin-releasing peptide receptor-regulated secretion. *J Biol Chem* 274:23901-23909.
17. Alves-Filho JC, *et al.* (2006) Toll-like receptor 4 signaling leads to neutrophil migration impairment in polymicrobial sepsis. *Crit Care Med* 34: 461-470.
18. Anastasi A, Erspamer V, Bucci M (1971) Isolation and structure of bombesin and alytesin, 2 analogous active peptides from the skin of the European amphibians Bombina and Alytes. *Experientia* 27: 166-167.

19. Subramaniam M, *et al.* (2003) Bombesin-like peptides and mast cell responses: relevance to bronchopulmonary dysplasia? *Am J Respir Crit Care Med* 168:601–611.
20. Grimsholm O, Rantapaa-Dahlqvist S, Forsgren S. (2005) Levels of gastrin-releasing peptide and substance P in synovial fluid and serum correlate with levels of cytokines in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 7:R416–R426.
21. Cornelio DB, *et al* (2007) Targeting the bombesin/gastrin-releasing peptide receptor to treat sepsis. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov* 2: 178-181.
22. Jensen RT, Battey JF, Spindel ER, Benya RV (2008) International Union of Pharmacology. LXVIII. Mammalian bombesin receptors: nomenclature, distribution, pharmacology, signaling, and functions in normal and disease states. *Pharmacol Rev* 60: 1-42.
23. Roesler R, Henriques JA, Schwartzmann G (2006) Gastrin-releasing peptide receptor as a molecular target for psychiatric and neurological disorders. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 5: 197-204.
24. Cornelio DB, Roesler R, Schwartzmann G (2007) Gastrin-releasing peptide receptor as a molecular target in experimental anticancer therapy. *Ann Oncol* 18: 1457-1466.
25. Halmos G, Schally AV (1997) Reduction in receptors for bombesin and epidermal growth factor in xenografts of human small-cell lung cancer after treatment with bombesin antagonist RC-3095. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 956-960.

26. Genton L, Kudsk KA. (2003) Interactions between the enteric nervous system and the immune system: role of neuropeptides and nutrition. *Am J Surg* 186:253–258.
27. Medina S, *et al.* (1998) Changes with ageing in the modulation of murine lymphocyte chemotaxis by CCK-8S, GRP and NPY. *Mech Ageing Dev* 102:249–261.
28. Medina S, *et al.* (1999) Age-related changes in the modulatory action of gastrin-releasing peptide, neuropeptide Y and sulfated cholecystinin octapeptide in the proliferation of murine lymphocytes. *Neuropeptides* 33:173–179.
29. Schwartzmann G, *et al.* (2006) A phase I trial of the bombesin/gastrin-releasing peptide (BN/GRP) antagonist RC3095 in patients with advanced solid malignancies. *Invest New Drugs* 24: 403-412.
30. Guha M, Mackman N (2001) LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cell Signal* 13: 85-94.
31. Dal-Pizzol F, *et al.* (2006) Gastrin-releasing peptide receptor antagonist effects on an animal model of sepsis. *Am J Respir Crit Care Med* 173: 84-90.
32. Williams DL, *et al.* (2003) Modulation of tissue Toll-like receptor 2 and 4 during the early phases of polymicrobial sepsis correlates with mortality. *Crit Care Med* 31:1808-1818.
33. Ishii KJ, Akira S (2004) Toll-like receptors and sepsis. *Curr Infect Dis Rep* 6: 361-366.
34. Meng G, *et al.* (2004) Antagonistic antibody prevents Toll like receptor 2 driven lethal shock like syndromes. *J Clin Invest* 113: 1473-1481.

35. Gonzalez-Rey E, Delgado M. (2007) Anti-inflammatory neuropeptide receptors: new therapeutic targets for immune disorders? *Trends Pharmacol Sci.* 28:482-491.
36. Tavares-Murta BM, *et al.* (2002) Failure of neutrophil chemotactic function in septic patients. *Crit Care Med* 30:1056–1061.
37. Tsujimoto H, *et al.* (2005) Neutrophil elastase, MIP-2, and TLR-4 expression during human and experimental sepsis. *Shock* 23:39-44.
38. Iseri SO, *et al.* (2005) Oxytocin protects against sepsis-induced multiple organ damage: role of neutrophils. *J Surg Res* 126:73–81.
39. Aldridge AJ (2002) Role of the neutrophil in septic shock and the adult respiratory distress syndrome. *Eur J Surg Res* 168:204–214.
40. Alves-Filho JC, *et al.* (2008) The role of neutrophils in severe sepsis. *Shock* 30 Suppl 1:3-9.
41. Annane D, Bellissant E, Cavillon JM (2005) Septic shock. *The Lancet* 365: 63-78.
42. Bornstein SR, *et al.* (2004) Impaired adrenal stress response in Toll-like receptor 2-deficient mice. *Proc Nat Acad Sci U S A* 101:16695–16700.
43. Brogden KA., Guthmiller JM, Salzet M, Zasloff. M (2005) The nervous system and innate immunity: the neuropeptide connection. *Nat Immunol* 6: 558–564.
44. O'Connor TM, *et al.* (2004) The role of substance P in inflammatory disease *J Cell Physiol* 201:167-180.
45. Petronilho F, Roesler R, Schwartzmann G, Dal-Pizzol F. (2007) Gastrin-releasing peptide receptor as a molecular target for inflammatory diseases. *Inflamm Allergy Drug Targets* 6: 197-200.

46. Carvalho D *et al.* (2008) The nociceptin/orphanin FQ-NOP receptor antagonist effects on an animal model of sepsis. *Intensive Care Med* 34: 2284-2290.
47. Bedoui S *et al.* (2004) More sympathy for autoimmunity with neuropeptide Y *Trends Immunol.* 25:508-512.
48. Gonzalez-Rey E, Varela N, Chorny A, Delgado M (2007) Therapeutical approaches of vasoactive intestinal peptide as a pleiotropic immunomodulator. *Curr Pharm Des* 13:1113-1139.
49. Tsatsanis C, *et al.* (2006) Corticotropin-releasing factor and the urocortins induce the expression of TLR-4 in macrophages via activation of the transcription factors PU.1 and AP-1. *J Immunol* 176: 1869–1877.
50. Taylor AW (2005) The immunomodulating neuropeptide alpha-melanocystimulating hormone (alpha-MSH) suppresses LPS-stimulated TLR-4 with IRAK-M in macrophages. *J Neuroimmunol* 162: 43–50.
51. Genton L, Kudsk KA (2003) Interactions between the enteric nervous system and the immune system: role of neuropeptides and nutrition. *Am J Surg* 186:253–258.
52. Dal-Pizzol F (2004) Alternative activated macrophage: a new key for systemic inflammatory response syndrome and sepsis treatment? *Crit Care Med* 32:1971–1972.
53. Shasby DM, McCray P (2004) Sepsis and innate immunity. *Am J Respir Crit Care Med* 169:144–145.
54. Degan S, Lopez GY, Kevill K, Sunday E (2008) Gastrin-releasing peptide, immune responses, and lung disease. *Ann NY Acad Sci* 1144:136–147.

55. Liew FYD, Xu EK, Brint LAJ (2005) Negative regulation of Toll-like receptor-mediated immune responses. *Nature* 5: 446-458.
56. Han J, Ulevitch RJ (2005). Limiting inflammatory responses during activation of innate immunity. *Nat Immunol* 6:1198-1205.
57. Pansky A, et al. (1998) Growth effects of alpha-interferon but not of bombesin or angiotensin II are mediated by activation of STAT proteins. *Eur J Clin Invest* 28:398-406.
58. Fiset PO, et al. (2006) Signal transducer and activator of transcription 6 down-regulates toll-like receptor-4 expression of a monocytic cell line. *Clin Exp Allergy* 36:158-165.
59. Herrera JL, et al. (2009) Toll-like receptor stimulation differentially regulates vasoactive intestinal peptide type 2 receptor macrophages. *J Cell Mol Med* in press.
60. Mitsuhiro F, et al. (2003) Molecular mechanisms of macrophage activation and deactivation by lipopolysaccharide: roles of the receptor complex. *Pharmacol Ther* 100:171-194.
61. Togbe D, et al. (2007) Toll-like receptor and tumour necrosis factor dependent endotoxin-induced acute lung injury. *Int J Exp Path* 88: 387–391.
62. Wrann CD, et al. (2007) The phosphatidylinositol 3-kinase signaling pathway exerts protective effects during sepsis by controlling C5a-mediated activation of innate immune functions. *J Immunol* 178: 5940-5948.
63. Laird MH, et al. (2009) TLR-4/MyD88/P13K interactions regulate TLR-4 signaling. *J Leukoc Biol* 85(6):966-77.

64. Ojaniemi M, *et al.* (2003) Phosphatidylinositol 3-kinase is involved in Toll-like receptor 4-mediated cytokine expression in mouse macrophages. *Eur J Immunol* 33: 597–605.
65. Monick MM, *et al.* (2001) Lipopolysaccharide activates Akt in human alveolar macrophages resulting in nuclear accumulation and transcriptional activity of beta-catenin. *J. Immunol* 166: 4713–4720.
66. Jones BW, *et al.* (2001) Differential roles of Toll-like receptors in the elicitation of proinflammatory responses by macrophages. *Ann. Rheum Dis* 60: 6–12.
67. Akira S, Hoshino K (2003) Myeloid differentiation factor 88-dependent and -independent pathways in Toll-like receptor signaling. *J Infect Dis* 187: 356–363.
68. Chen LC, *et al.* (2007) Role of TLR-4 in liver macrophage and endothelial cell responsiveness during acute endotoxemia. *Exp Mol Pathol* 83: 311-326.
69. Adams DH, Lloyd AR (1997) Chemokines: leucocyte recruitment and activation cytokines. *Lancet* 349: 490-495.
70. Johnson, JL, *et al.* (1998) Interleukin-6 augments neutrophil cytotoxic potential via selective enhancement of elastase release. *J Surg Res* 76: 91–94.
71. Wagner JG, Roth R (1999) Neutrophil migration during endotoxemia. *J Leukoc Biol* 66: 10-24.
72. Kerfoot SM, Kubes P (2005) Local coordination verses systemic deregulation: complexities in leukocyte recruitment revealed by local and systemic activation of TLR-4 in vivo. *J Leukoc Biol* 77: 862-867.

73. Welbourn CR, Young Y (1992) Endotoxin, septic shock and acute lung injury: neutrophils, macrophages and inflammatory mediators. *Br J Surg* 79: 998–1003.
74. Andonegui G, *et al.* (2003) Endothelium-derived Toll-like receptor-4 is the key molecule in LPS-induced neutrophil sequestration into lungs. *J Clin Invest* 111:1011–1020.
75. Sheridan, BC, *et al.* (1997) Neutrophils mediate pulmonary vasomotor dysfunction in endotoxin-induced acute lung injury. *J Trauma* 42: 391–396.
76. Dickerson C, Udem B, Bullock B, Winchurch, RA (1998) Neuropeptide regulation of proinflammatory cytokine responses. *J Leukoc Biol* 63:602–605.
77. Arranz A, *et al.* (2008) Vasoactive intestinal peptide suppresses toll-like receptor 4 expression in macrophages via Akt1 reducing their responsiveness to lipopolysaccharide. *Mol Immunol* 45:2970-80.
78. Fagiolo U, *et al.* (1993) Increased cytokine production in mononuclear cells of healthy elderly people. *Eur J Immunol* 23: 2375-2378.
79. Green PG. (2005) Gastrin-releasing peptide, substance P and cytokines in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 7:111-113.
80. Bone R C, *et al.* (1992) Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in Sepsis. The ACCP-SCCM consensus conference on sepsis and organ failure. *Chest* 101:1481-1483.
81. Ritter C, *et al.* (2004) Treatment with *N*-acetylcysteine plus deferoxamine protects rats against oxidative stress and improves survival in sepsis. *Crit Care Med* 32:342-349.

82. Radulovic S, *et al* (1991). Biological effects and receptor binding affinities of new pseudonapeptide bombesin/GRP receptor antagonists with N-terminal d-Trp or d-Tpi. *Int J Pept Protein Res* 38:593–600.
83. Chang W, Alvarez-Gonzalez R (2001) The sequence-specific DNA binding of NF- κ B is reversibly regulated by the automodification reaction of poly (ADP-ribose) polymerase I. *J Biol Chem* 276: 47664-47670.
84. Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.
85. Laemmli, UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
86. De Souza CT, *et al.* (2003). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1-dependent uncoupling protein-2 expression in pancreatic islets of rats: a novel pathway for neural control of insulin secretion. *Diabetologia* 46:1522-1531.
87. Benjamim CF, Ferreira SH, Cunha FQ (2000) Role of nitric oxide in the failure of neutrophil migration in sepsis. *J Infect Dis* 182: 214–223.
88. Godshall CJ, *et al.* (2002) Genetic background determines susceptibility during murine septic peritonitis. *J Surg Res* 102:45–49.

Figure Legends

Fig. 1. RC-3095 decreased TLR-4 mRNA expression and signaling pathways in RAW 264.7 cells exposed to LPS. (A) RT-PCR using specific primers to TLR-4 demonstrated that 2-h RC-3095 treatment of LPS-activated RAW 264.7 cells (collected 30 min post-RC-3095 treatment) reduced TLR-4 mRNA levels (expressed as the ratio of signal intensity to that of co-amplified GAPDH: TLR-4 mRNA/GPDH) (* $p < 0.05$ vs. LPS without RC-3095). (B) Western blot experiments showed that RC-3095 treatment also resulted in a sustained (up to 60 min) reduction of phosphorylated ERK1/2, phosphorylated JNK and phosphorylated Akt levels ($p < 0.05$, LPS plus RC-3095 versus LPS without RC-3095). (C) RAW 264.7 macrophages were stimulated with LPS, as evidenced by increased NF- κ B and AP-1 DNA-binding activity measured by EMSA and macrophage activation was attenuated by RC-3095 treatment alone or following LPS stimulation ($p < 0.05$).

Fig. 2. Acute administration of RC-3095 decreased TLR-4 mRNA expression and TLR-4 protein level in rats subject to lethal sepsis in lung and BALF. (A) RT-PCR experiments showed that TLR-4 mRNA levels (reported as TLR-4 mRNA/GPDH) were increased in CLP rats (* $p < 0.05$ vs. sham) and this increase was attenuated in CLP rats treated with RC-3095 ($^{\$}p < 0.05$ vs. CLP without RC-3095). Immunoblot (IB) experiments with anti-TLR antibody (β -actin loading control) showed that CLP produced increased TLR-4 protein levels in lung tissue extracts (B) and lavage exudates (C) (* $p < 0.05$ vs. sham) and that RC-3095 treatment attenuated this increase ($^{\$}p < 0.05$ vs. CLP). Scanning

densitometry results are expressed as arbitrary units. Bars represent means \pm SE of five rats.

Fig. 3. RC-3095 attenuated cytokine/chemokine production *in vitro*, in CLP animals, and in sepsis patients. ELISA showed that RC-3095 attenuated MCP-1 increases induced by LPS stimulation in RAW 264.7 cells (A) as well as MCP-1 increases induced by CLP in serum (B) and BALF (C). ELISA also showed that RC-3095 similarly attenuated IL-6 increases induced by LPS stimulation in RAW 264.7 cells (D) as well as increases induced by CLP in serum (E) and BALF (F). Results are expressed as means \pm SD. (* $p < 0.05$ vs. LPS without RC-3095 in A and D and vs. sham in B, C, E and F; $^{\$}p < 0.05$ vs. LPS without RC-3095 in A and D and vs. CLP without RC-3095 in B, C, E and F). Complementary experiments in human plasma showed that 12-h infusion of RC-3095 resulted in decreased levels of IL-6 (G) and IL-10 (H). Plasma samples collected before (T0) and after (T12) the infusion were compared and the data are expressed as means \pm SD. ($p < 0.05$ vs. T0).

Fig. 4. RC-3095 protected against lung injury by impairing neutrophil migration to BALF and preventing bacterial dissemination into the blood and peritoneal exudate in CLP rats. (A) Neutrophil migration into the BALF and bacterial count was decreased in serum (B) and peritoneal exudate (C) in RC-3095 treated animals (* $p < 0.05$ vs. CLP without RC-3095). Results are expressed as means \pm SD.

Fig. 5. GRP plasma levels were elevated in human patients diagnosed with sepsis and correlated with outcome. (A) When sepsis severity was not accounted for, no difference between GRP levels was observed between SIRS and sepsis patients ($p < 0.05$). (B) Comparison between the gravity levels of sepsis (mild to moderate sepsis, severe sepsis and septic shock) revealed greater plasma GRP levels in the septic shock group relative to the other two groups ($*p < 0.05$). (C) Plasma GRP concentrations differed between sepsis patients who survived and those who did not ($*p < 0.01$). (D) Plasma GRP concentrations were similar, however, between the survivors and non-survivors in the SIRS patient group ($p > 0.05$). (E) GRP concentration served as an effective predictor of mortality in septic patients; a GRP concentration below a cut-off value of 1 pg/mL was associated with greater incidence of survival ($p < 0.01$ vs. non-survival). Results are expressed as means \pm SD.

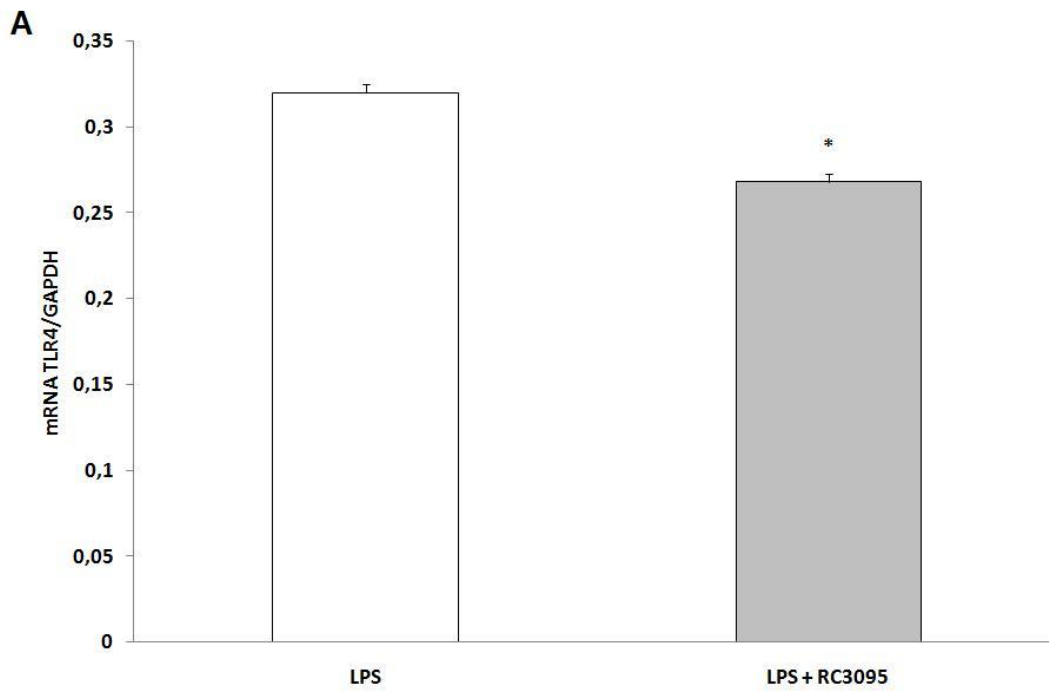
Table 1. Patient characteristics. Age, race, sex, ICU stay, mortality, APACHE II, sepsis source are quoted as median (range) or number (*n*).

	SIRS	Sepsis	Severe sepsis	Septic shock	P value
N	29	9	10	11	
Age, years, SD	59 (15)	60(14)	62(7)	56(15)	p > 0.05
Race					
Black	0	1	0	1	p > 0.05
White	29	8	10	10	p > 0.05
Sex					
Female	11	4	3	5	p > 0.05
Male	18	5	7	6	p > 0.05
ICU stay (days)	15	17	13	10	p > 0.05
Mortality, <i>n</i>	9	2*	4	10 ^{\$}	p ≤ 0.01
APACHE II, SD	18(9)	10(8)*	21(13) ^{\$}	24(10) ^{\$}	p ≤ 0.01
Sepsis source (<i>n</i>)					
Abdominal	0	2	3	5	p > 0.05
Respiratory	0	2	4	3	p > 0.05
Surgical cut	0	2	1	1	p > 0.05
Urosepsis	0	1	2	1	p > 0.05
Skin and limp tissue	0	2	0	1	p > 0.05

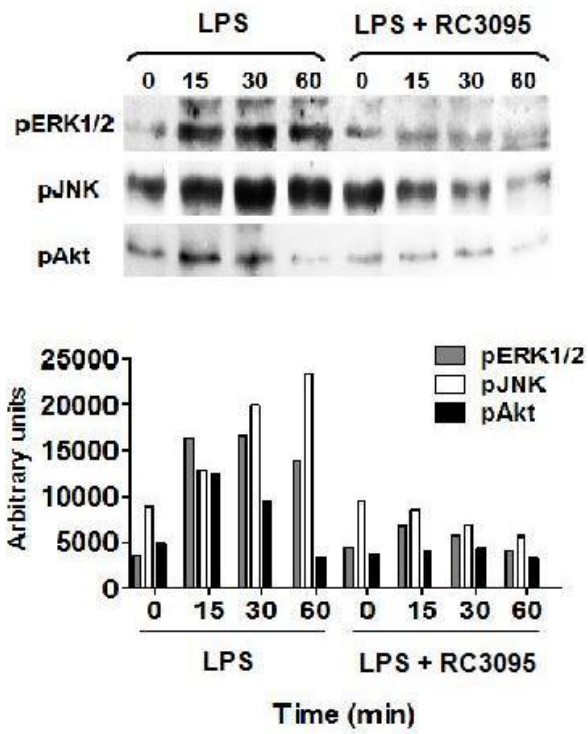
*p ≤ 0.01 vs. non-sepsis group, ^{\$}p ≤ 0.01 vs. sepsis group.

SD = Standard deviation

Fig.1.



B



C

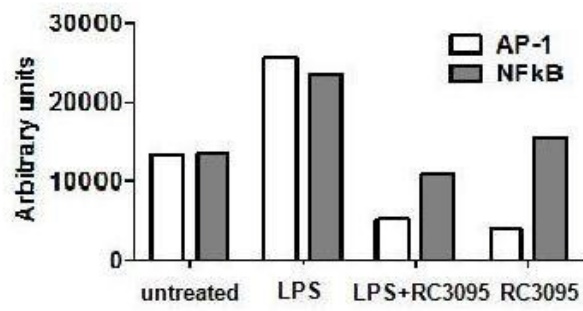
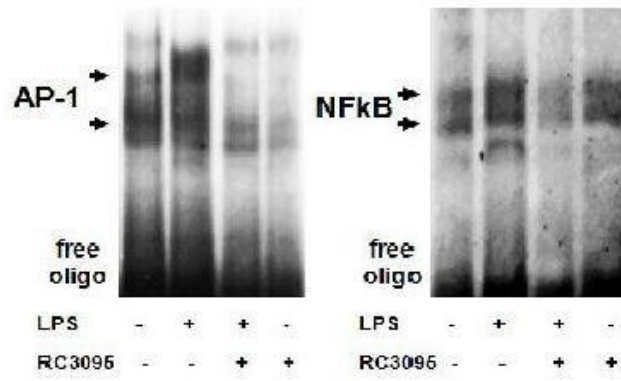


Fig. 2.

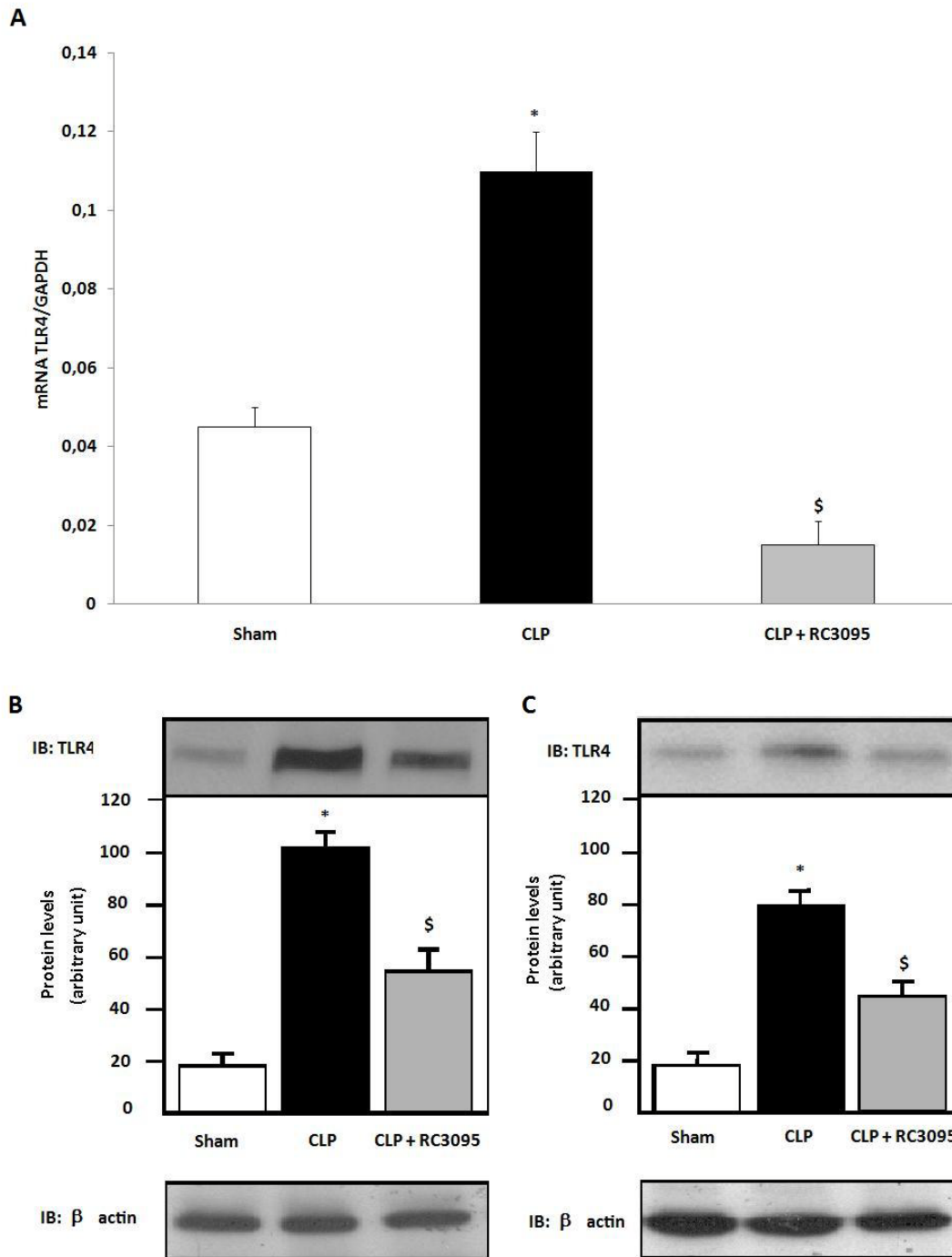
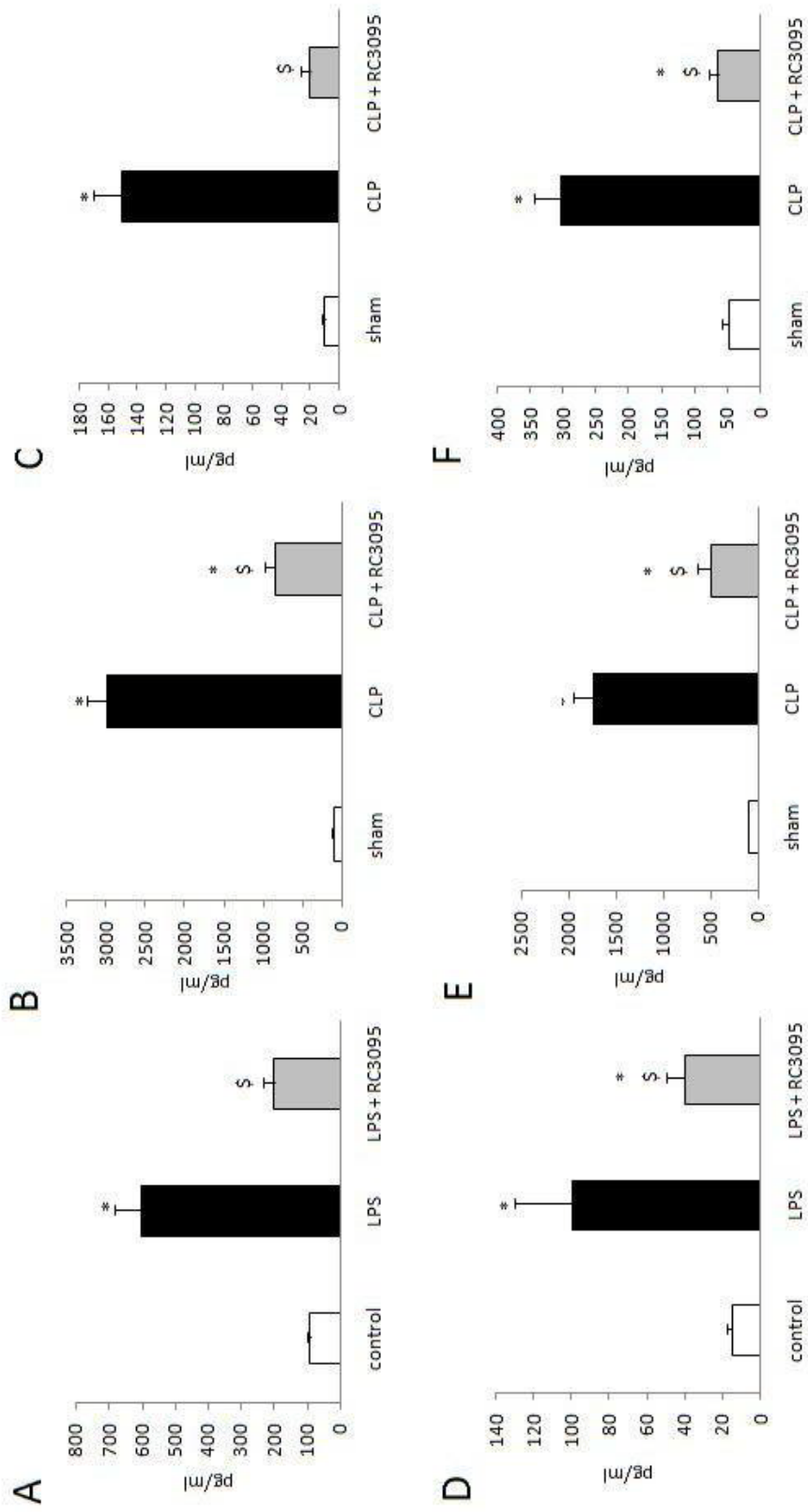
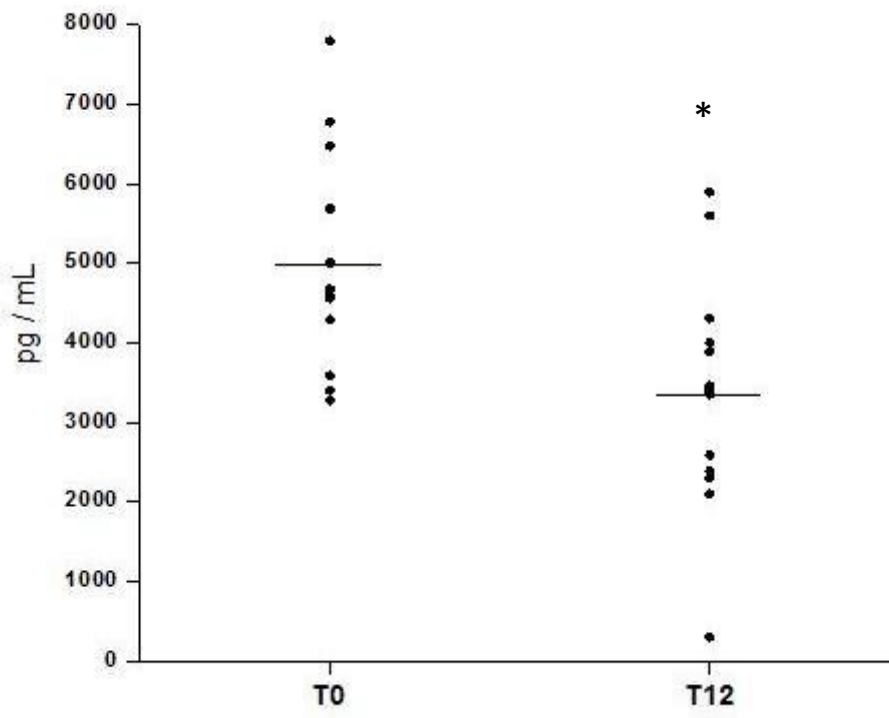


Fig. 3.



G



H

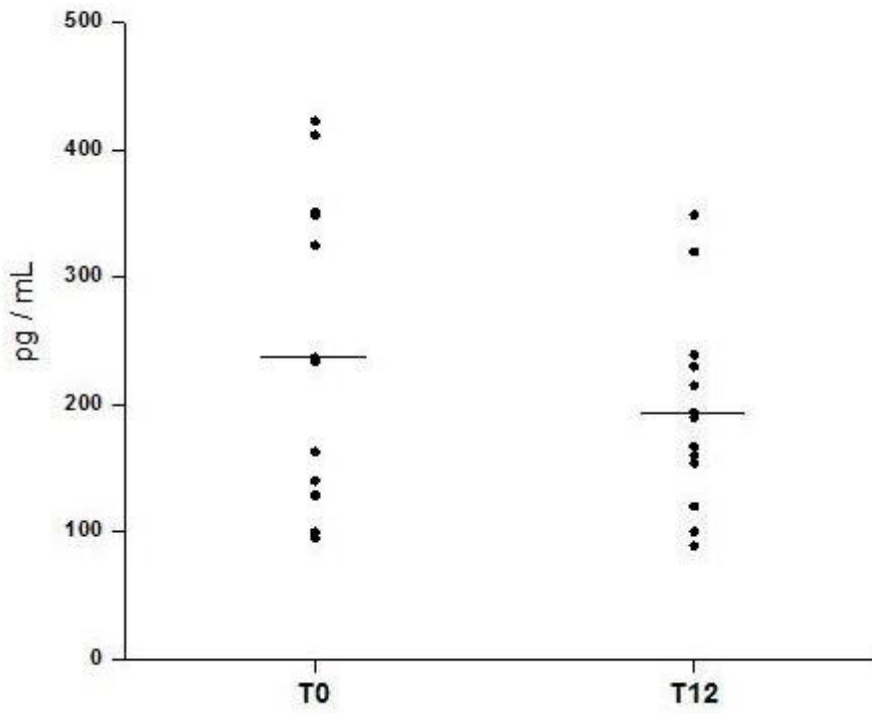
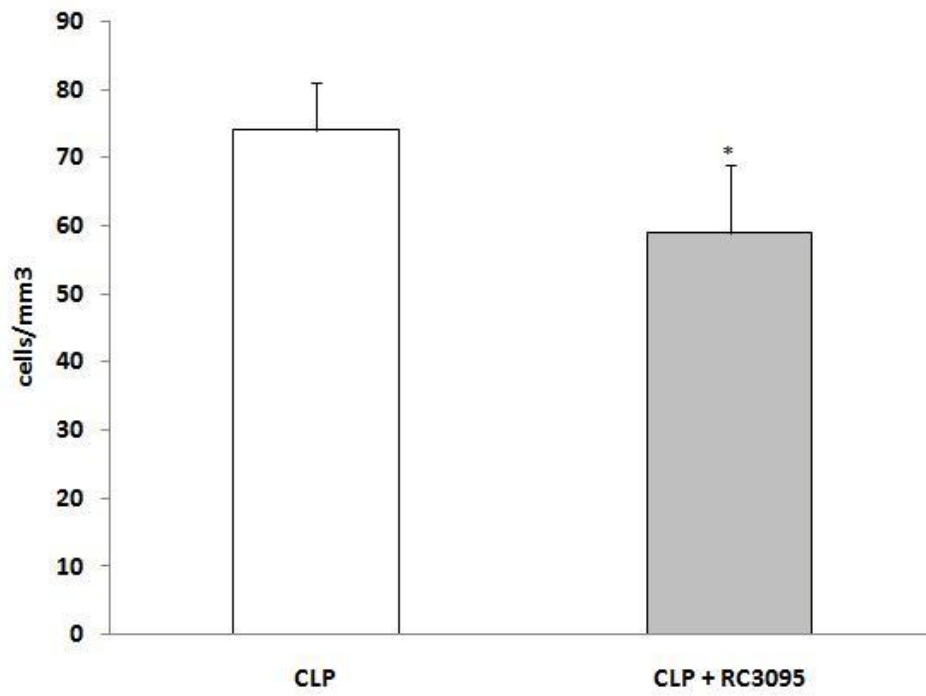
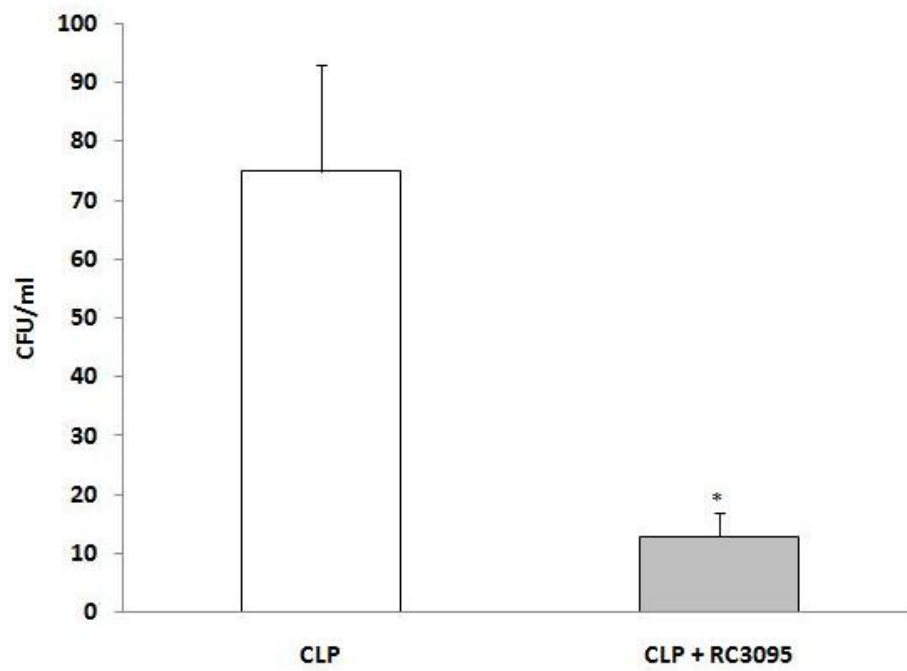


Fig. 4.

A



B



C

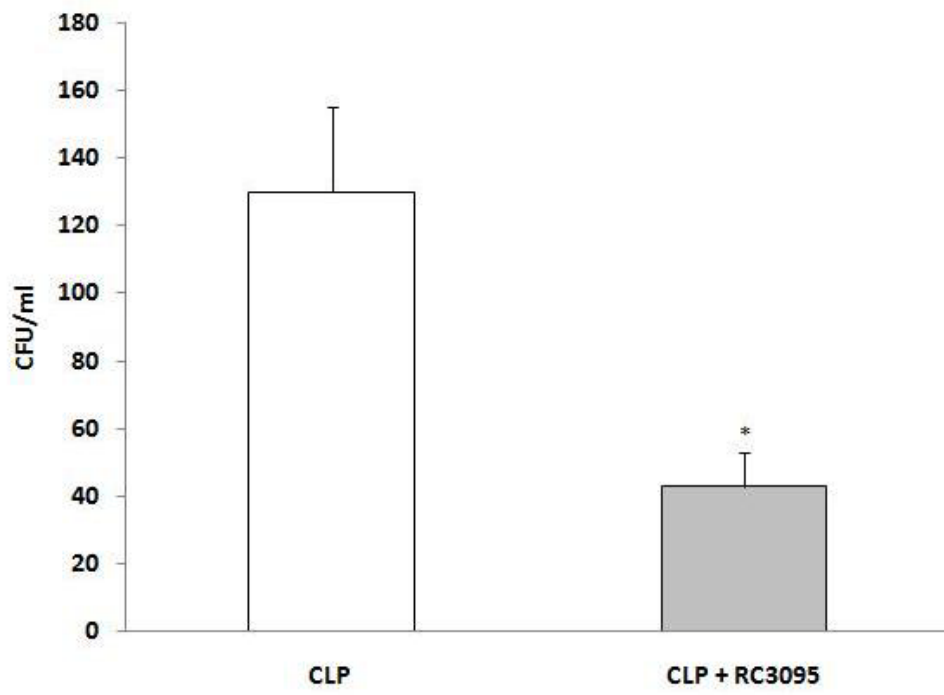
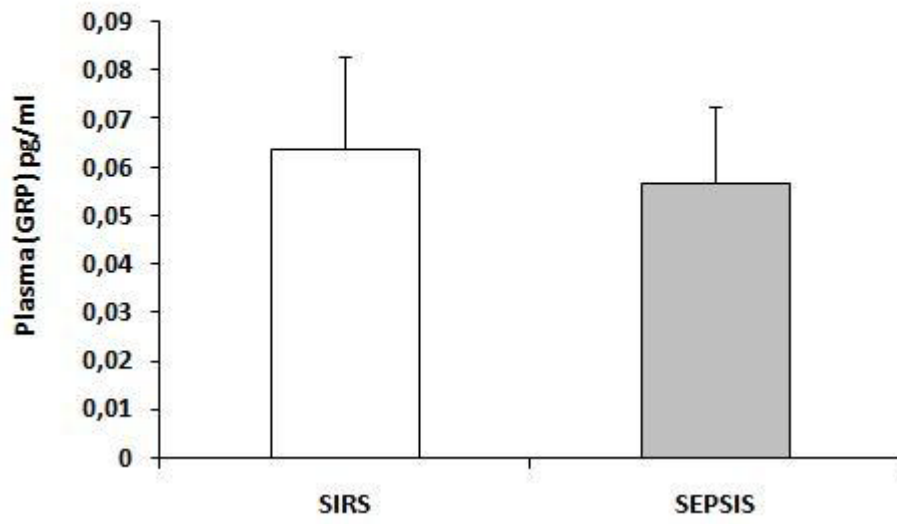
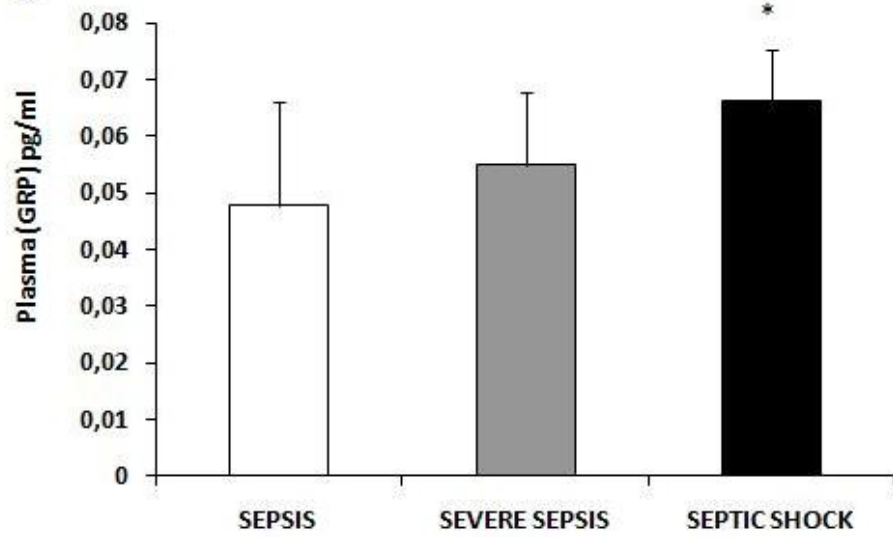


Fig. 5.

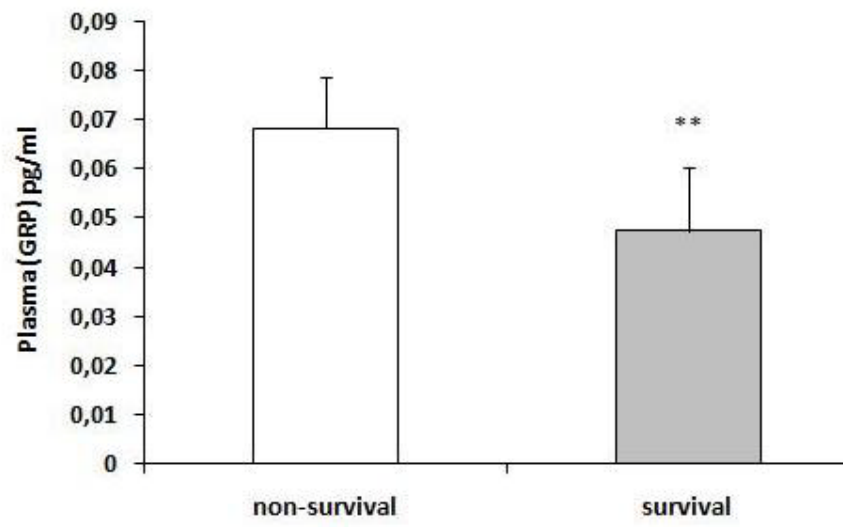
A



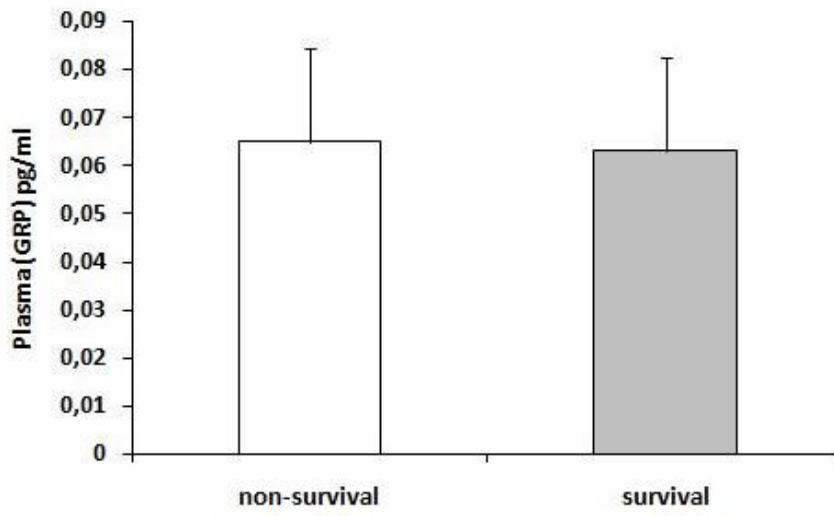
B

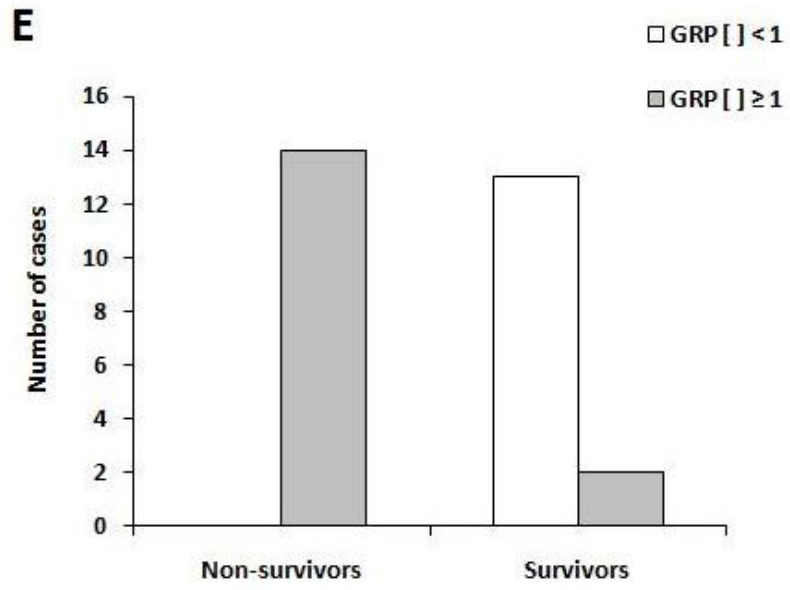


C



D





Capítulo III

Gastrin-releasing peptide receptor as a molecular target for inflammatory diseases

Fabricia Petronilho, Rafael Roesler, Gilberto Schwartzmann, Felipe Dal-Pizzol

Artigo publicado no periódico

Inflammation & Allergy Drug Targets 6 (4): 197-200, 2007

Gastrin-Releasing Peptide Receptor as a Molecular Target for Inflammatory Diseases

Fabricia Petronilho, Rafael Roesler, Gilberto Schwartzmann and Felipe Dal Pizzol*

Laboratório de Fisiopatologia Experimental, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde, Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, SC, Brazil

Cancer Research Laboratory, Academic Hospital Research Center, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

Abstract: Bombesin-like peptides (BLP) and its receptors are widely distributed in mammalian peripheral tissues and in the central nervous system. Recently, effects of these peptides on the production and release of cytokines were described both in animal models and humans with inflammatory diseases. Some pathological conditions such as exposure to tobacco smoke, chronic obstructive pulmonary diseases and eosinophilic granuloma have recently been found to be associated with an increase of pulmonary BLP-producing cells. Proinflammatory neuropeptides have a key role in the pathogenesis and maintenance of rheumatoid arthritis and sepsis. Together, these findings support the view that the GRPR should be considered a therapeutic target for a subset of inflammatory diseases.

Keywords: Neuropeptide, bombesin-like peptides, gastrin-releasing peptide receptor, immune system, sepsis.

II INTRODUCTION

Bombesin (BBS) is one of the active peptides purified from amphibian skin [1]. This peptide is also active in mammals and its pharmacological effect extends into various physiological aspects: hypertensive action, contractive effect on uterus, colon or ileum, stimulating action on the gastric secretion, hyperglycemic effect or increasing insulin secretion [2]. Many other peptides structurally related to BBS are discovered from amphibian skin and divided into three groups: BBS family that includes BBS and altyesin, ranatensin family that includes ranatensin, litorin and their derivatives and phyllolitorin family [3]. The first mammalian BBS-like peptide was isolated from porcine gastric tissue and named gastrin-releasing peptide (GRP) since its first known activity was inducing gastrin secretion from G cells in the gastric antrum [4]. Shortly thereafter, a novel bombesin-like peptide was identified in porcine spinal cord and named neuromedin B (NMB) [5].

1. GRP Receptors

Four different receptor subtypes (GRP-R, NMB-R, BRS-3 and BB4-R) have been described for the bombesin-like peptides. GRP-stimulated signal transduction occurs with the binding of GRP to its cognate cell surface receptor, the G protein-coupled receptor (GPCR) [6]. The GRP-GPCRs have the typical structural features of G protein binding seven-transmembrane receptors. The NMB-R cDNA was then cloned from rat oesophagus [7] and from human genomic libraries [8]. In an attempt to search for novel G-protein-coupling receptors from guinea-pig uterus, Gorbulev *et al.* cloned a new subtype of bombesin-like peptide receptor [9] that has the highest amino acid similarity to GRP-R (52%)

and has been designated as bombesin-like peptide receptors subtype-3 (BRS-3). The gene encoded for human homolog of BRS-3 was reported subsequently [10, 11]. In search of receptors for bombesin-related peptides in amphibian, Nagalla *et al.* isolated two clones encoding fragments highly homologous to mammalian GRP-R and one clone encoded for a novel bombesin receptor subtype and named it as BB4 [12]. This receptor has higher affinity for bombesin than GRP and shared only 56% and 70% amino acid identity to the human GRP-R and human BRS-3, respectively. Another subtype of bombesin-like peptide receptor was cloned from chick brain [13]. This subtype, called BRS-3.5, has moderate affinity for bombesin but low affinity for GRP. Distinct from chick GRP-R that is expressed in the brain and gastrointestinal tissues, BRS-3.5 is expressed only in the brain.

All the GRP receptors characterized to date are guanine nucleotide binding protein (G-protein)-coupled, have seven transmembrane domains and activate phospholipase C to increase intracellular concentrations of inositol phosphates, diacyl glycerol and calcium. Among the multiple intracellular signaling pathways that mediate the proliferative effects of GPCRs, a family of related serine-threonine kinases, collectively known as ERKs or MAPKs, appeared to play a central role [14]. The effects of bombesin on cyclooxygenase-2 expression in intestinal cell lines require an increase in Ca^{+2} ; activation of extracellular signal-regulated kinase-1 and -2 and p38MAPK; and increased activation and expression of the transcription factors Elk-1, ATF-2, c-Fos, and c-Jun [15]. We demonstrated that in the central nervous system, BBS/GRP acts at least through a mechanism involving the PKC, MAPK and PKA signaling pathways [16]. Some of the actions of bombesin/GRP upon immune cells seem to involve the activation of protein kinase C [17].

2. General Function of Bombesin Related Peptides (BRP)

The BRP play many physiological roles in addition to the stimulation of gastric acid secretion. The neural effects of

*Address correspondence to this author at the Laboratório de Fisiopatologia Experimental, Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, SC, Brazil, Avenida Universitária 1105, 88806-000; Tel: 55 48 4312641; Fax: 55 48 431 2750; E-mail: piz@unesc.net

GRP-like peptides include changes in animal behavior, suppression of food intake and improvement of learning and memory in rodent models [16, 18-20]. Bombesin and GRP stimulate growth of the gastrointestinal mucosa and pancreas [21]. BRP are growth factors for 3T3 fibroblasts, normal airway epithelial cells [22, 23]. BRPs promote fetal lung development, including lung branching morphogenesis, epithelial and mesenchymal cell proliferation and Type II cell differentiation [24, 25]. During lung development, the first epithelial cells to differentiate are the pulmonary neuroendocrine cells [26], which contain high levels of BLP. BLP can promote growth and maturation of developing fetal lung in humans, nonhuman primates, rats and mice [24, 25, 27]. Levels of GRP receptor (GRPR) and GRP mRNAs peak during the canalicular phase, then fall to much lower levels during normal alveolarization after birth [28].

GRP-like peptides may also provide a protective effect for the GI mucosa during periods of inflammation. In experimental studies, Chu *et al.* demonstrated that the administration of BBS greatly ameliorated the effects of methotrexate on the intestinal mucosa and increased survival of rats given methotrexate [29]. Exogenous bombesin prevents gastric injury induced by ethanol [30] and significantly improves the healing of the gastric mucosa of rats after acetic acid-induced ulcer induction [31]. Colonic damage induced by trinitrobenzene sulfonic acid in rats [32] and burn-induced gut malfunction were also ameliorated by bombesin treatment [33]. Bombesin-induced gastroprotection involves the release of endogenous gastrin [30]. In addition, bombesin improved intestinal barrier function and oxidative stress in rats with experimentally induced jaundice [35] or following partial hepatectomy [35]. Apart from its physiological roles, GRP has been shown to be mitogenic for a number of cancerous tissues [36].

3. GRP and Inflammatory Disease

The evidence for the involvement of neuropeptides in inflammatory diseases has focused predominantly on a proinflammatory role for substance P (SP) [37, 38], as well as an immuno-modulator role for neuropeptide Y [39], the proinflammatory action of neuromedin U [40] and an anti-inflammatory role for VIP [41]. The mechanism of action of these neuropeptides in modulating inflammatory diseases is, at least in part, due to their ability to affect cytokine production. For example, SP increases the production of the proinflammatory cytokines TNF- α , IL-6 and IL-1 β [42], whereas VIP inhibits the production of the proinflammatory cytokines TNF- α , IL-6 and IL-12 and stimulates the production of the anti-inflammatory cytokines IL-10 and IL-1Ra [43].

The number of BLP-producing neuroendocrine (NE) cells in adult lung is extremely low under normal conditions [44,45]. Some pathological conditions such as exposure to tobacco smoke, chronic obstructive pulmonary diseases (COPD) and eosinophilic granuloma have recently been found to be associated with an increase of pulmonary BLP-producing NE cells [46-48]. NE cell hyperplasia with BLP hyperproduction is present in chronic obstructive airway diseases, particularly among cigarette smokers [49-51]. BLP could exert a role in these disease since they are chemotactic for monocytes, increase phagocytosis and superoxide anion production and expression of procoagulant activity by

mononuclear phagocytes and modulate the release of some proinflammatory cytokines by peripheral monocytes and alveolar macrophages [52-55]. Mast cells can function in both acute and chronic inflammation, promoting both innate and acquired immune responses including leukocyte recruitment by chemotaxis and leading to lung injury and fibrosis in later stages [56, 57]. An increase in mast cells in the lung in response to GRP leads to inflammatory response that may have a role in the pathogenesis of bronchopulmonary dysplasia (BPD). Proinflammatory cytokines, adhesion molecules and inflammatory cells including mast cells have been demonstrated in the lung parenchyma of infants with BPD [58, 59]. The concept that GRP-induced mast cell responses might be an early event leading to lung injury in BPD represents a paradigm shift in current understandings of BPD. These observations could be of further relevance because BPD is associated with bronchospasm and inflammation, similar to asthma [60, 61]. In addition, bombesin diminished alveolarization in C57BL/6 mice, but not in outbred Swiss-Webster mice, suggesting that this response depends on the background genes that are as yet unidentified [62]. Second, GRPRKO mice are protected in part against this inhibitory effect of bombesin on alveolarization, indicating that GRPR mediates a significant part of the reduced alveolarization [62]. Similarly, it has been suggested that elevated GRP levels in humans might predict which adult patients will develop smoking related lung diseases, including emphysema [51]. Thus, increased GRPR signaling due to increased BLP levels could be a common denominator for lung diseases with decreased alveolarization, including both BPD and emphysema.

GRP is present in the synovial fluid of joints affected by arthritis and that the pattern of GRP increase differs from that of SP [63]. It appears as if the presence of GRP is particularly related to the early processes of joint involvement. These observations are of interest because GRP has well-known trophic and paracrine effects and chondrocytes have been shown to produce neuropeptides such as GRP [64]. Grimsholm and colleagues [65] have hypothesized that proinflammatory neuropeptides have a key role in the pathogenesis and maintenance of rheumatoid arthritis (RA), and they report that there is a correlation between the synovial concentration of GRP and proinflammatory cytokines and RA disease activity in these patients.

In this context we report for the first time the beneficial effects of the selective GRP receptor antagonist, RC-3095, in a well-established model for experimental sepsis and LPS-induced acute lung injury [66]. RC-3095 modulates the release of proinflammatory cytokines (TNF and IL-1) by activated macrophages, leading to a diminution of inflammatory infiltration and organ dysfunction, thus improving mortality in a clinically relevant model of sepsis. Interestingly, RC-3095 did not modulate the release of the anti-inflammatory IL-10, suggesting that the intracellular pathway modulated by bombesin/GRP is selective to proinflammatory cytokines. Thus we proposed an autocrine/paracrine role of GRP on macrophage activation by sepsis and/or LPS (Fig. 1) leading to a modulation of proinflammatory, but not anti-inflammatory response and this is consistent with the involvement of a new inflammatory pathway relevant to the development of inflammatory diseases.

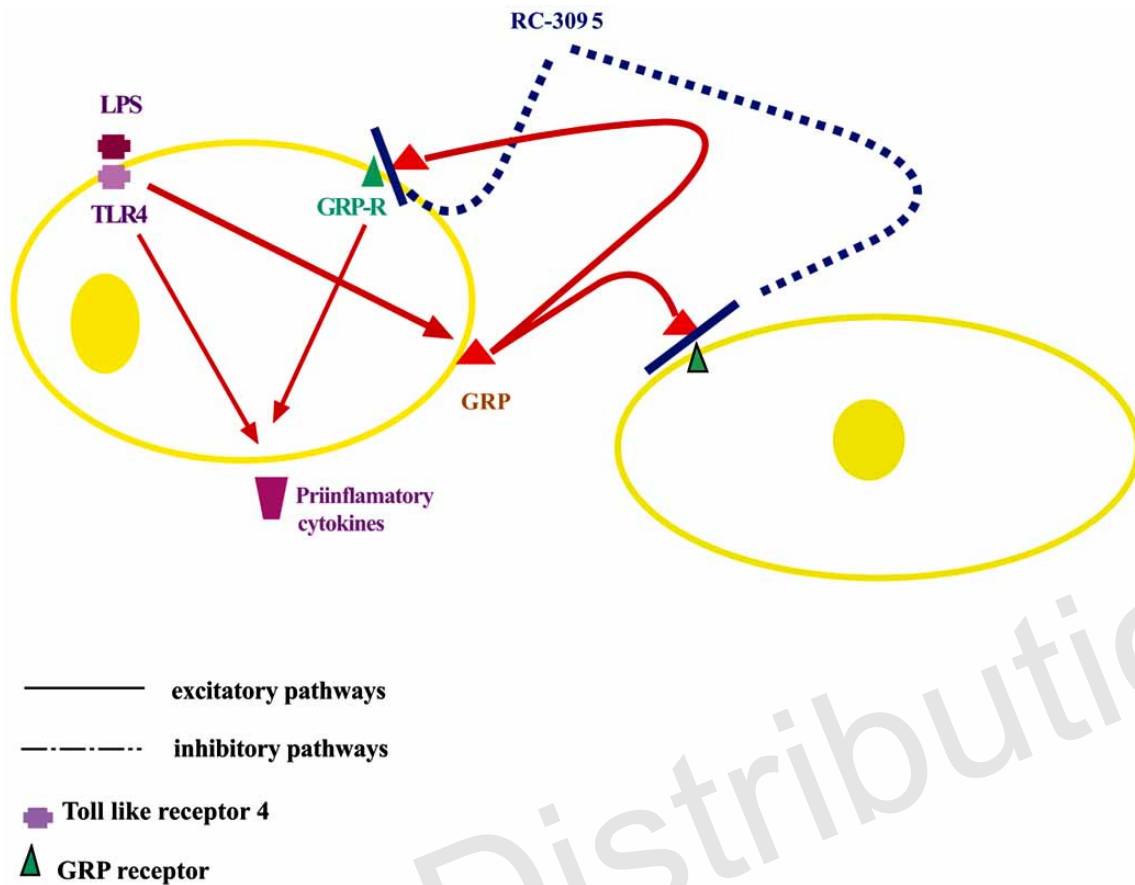


Fig. (1). Putative mechanism on LPS and GRP interaction in macrophages.

ABBREVIATIONS

BLP	=	Bombesin-like peptides
BBS	=	Bombesin
GRP	=	Gastrin-releasing peptide
NMB	=	Neuromedin B
GRP-R	=	Gastrin-releasing peptide receptor
NMB-R	=	Neuromedin B receptor
BRS-3	=	Bombesin-like peptide receptors subtype-3
GPCR	=	G protein – coupled receptor
BB4	=	Bombesin receptor subtype 4
BRS-3.5	=	Bombesin-like peptide receptors subtype-3.5
VIP	=	Vasointestinal Peptide
COPD	=	Chronic obstructive pulmonary disease
NE	=	Neuroendocrine
BPD	=	Bronchopulmonary dysplasia
RA	=	Rheumatoid arthritis
LPS	=	Lipopolysaccharide

REFERENCES

- [1] Anastasi, A.; Erspamer, V.; Bucci, M. *Experientia*, **1971**, *27*, 166.
- [2] Erspamer, V.; Esparmer, G.F.; Inselvini, M. *J. Pharm. Pharmacol.*, **1970**, *22*, 875.
- [3] Erspamer, V.; Erspamer, G.F.; Mazzanti, G.; Edean, R. *Comp. Biochem. Physiol. C*, **1984**, *77*, 99.
- [4] McDonald, T.J.; Nilsson, G.; Vagne, M.; Ghatei, M.; Bloom S.R.; Mutt, V. *Gut*, **1978**, *19*, 767.
- [5] Minamino, N.; Kangawa, K.; Matsuo, H. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1983**, *114*, 541.
- [6] Spindel, E.R.; Giladi, E.; Brehm, P.; Goodman, R.H.; Segerson, T.P. *Mol. Endocrinol.*, **1990**, *4*, 1956.
- [7] Wada, E.; Way, J.; Shapira, H.; Kusano, K.; Lebacqz-Verheyden, A.M.; Coy, D.; Jensen, R.; Battery, J. *J. Neurosci.*, **1991**, *6*, 421.
- [8] Corjay, M.H.; Dobrzanski, D.J.; Way, J.M.; Viallet, J.; Shapira, H.; Worland, P.; Sausville, E.A.; Battey, J.F. *J. Biol. Chem.*, **1991**, *266*, 18771.
- [9] Gorbulev, V.; Akhundova, A.; Grzeschik, K.H.; Fahrenholz, F. *FEBS Lett.*, **1994**, *340*, 260.
- [10] Fathi, Z.; Corjay, M.H.; Shapira, H.; Wada, E.; Benya, R.; Jensen, R.; Viallet, J.; Sausville, E.A.; Battey, J.F. *J. Biol. Chem.*, **1993**, *268*, 5979.
- [11] Gorbulev, V.; Akhundova, A.; Grzeschik, K.H.; Fahrenholtz, F. *FEBS Lett.*, **1994**, *340*, 260.
- [12] Nagalla, S.R.; Barry, B.J.; Creswick, K.C.; Eden, P.; Taylor, J.T.; Spindel, E.D. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1995**, *92*, 6205.
- [13] Iwabuchi, M.; Ui-Tei, K.; Yamada, K.; Matsuda, Y.; Sakai, Y.; Tanaka, K.; Ohki-Hamazaki, H. *Br. J. Pharmacol.*, **2003**, *139*, 555.
- [14] Hellmich, M.R.; Ives, K.L.; Udipi, V.; Soloff, M.S.; Greeley, G.H. Jr.; Christensen, B.N.; Townsend, C.M. Jr. *J. Biol. Chem.*, **1999**, *274*, 23901.
- [15] Guo Y.S.; Hellmich, M.R.; Wen, X.D.; Townsend, C.M. Jr. *J. Biol. Chem.*, **2001**, *276*, 22941.
- [16] Roesler, R.; Luft, T.; Oliveira, S.H.; Farias, C.B.; Almeida, V.R.; Quevedo, J.; Dal Pizzol, F.; Schroder, N.; Izquierdo, I.; Schwartsman, G. *J. neuropharmacology*, **2006**, *51*, 350.
- [17] Hellmich, M.R.; Ives, K.L.; Udipi, V.; Soloff, M.S.; Greeley, G.H. Jr.; Christensen, B.N.; Townsend, C.M. Jr. *J. Biol. Chem.*, **1999**, *274*, 23901.

- [18] Yamada, K.; Wada, E.; Wada, K. *Brain Res.*, **2000**, *870*, 20.
- [19] Yamada, K.; Wada, E.; Wada, K. *Ann. Méd.*, **2000**, *32*, 519.
- [20] Roesler, R.; Meller, C.A.; Kopschina, M.L.; Souza, D.O.; Henriques, J.A.; Schwartzmann, G. *Peptides*, **2003**, *24*, 1069.
- [21] Lehy, T.; Puccio, F.; Chariot, J.; Labeille, D. *Gastroenterology*, **1986**, *90*, 1942.
- [22] Rozenfurt, E.; Sinnett-Smith, J. *Proc. I atl. Acad. Sci. USA*, **1983**, *80*, 2936.
- [23] Li, K.; Nagalla, S.R.; Spindel, E.R. *J. Clin. Invest.*, **1994**, *94*, 1605.
- [24] Sunday, M.E.; Hua, J.; Dai, H.B.; Nusrat, A.; Torday, J.S. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, **1990**, *3*, 199.
- [25] Sunday, M.E.; Hua, J.; Torday, J.; Reyes, B.; Shipp, M.A. *J. Clin. Invest.*, **1992**, *90*, 2517.
- [26] Ten Have-Ophroek, A.A.W. *Exp. Lung Res.*, **1991**, *17*, 111.
- [27] Sunday, M.E.; Hua, J.; Reyes, B.; Masui, H.; Torday, J.S. *Anat. Rec.*, **1993**, *236*, 25.
- [28] King, K.A.; Torday, J.S.; Sunday, M.E. *Proc. I atl. Acad. Sci. USA*, **1995**, *92*, 4357.
- [29] Chu, K.U.; Higashide, S.; Evers, B.M.; Rajaraman, S.; Ishizuka, J.; Townsend, C.M. Jr, Thompson, J.C. *Ann. Surg.*, **1994**, *220*, 570.
- [30] Mercer, D.W.; Cross, J.M.; Chang, L.; Lichtenberger, L.M. *Dig. Dis. Sci.*, **1998**, *43*, 826.
- [31] Gunal, O.; Oktar, B.K.; Ozcinar, E.; Tansuker, D.; Arbak, S.; Yegen, B.C. *Regul. Pept.*, **2002**, *106*, 81.
- [32] Gulluoglu, B.M.; Kurtel, H.; Gulluoglu, M.G.; Aktan, A.O.; Yegen, B.C.; Dizdaroglu, F.; Yalin, R.; Yegen, B.C. *Dig. Dis. Sci.*, **1999**, *44*, 1531.
- [33] Wu, X.W.; Spies, M.; Chappell, V.L.; Herndon, D.N.; Thompson, J.C.; Wolf, S.E. *Shock*, **2002**, *18*, 518.
- [34] Assimakopoulos, S.F.; Scopa, C.D.; Charonis, A.; Spiliopoulou, I.; Georgiou, C.; Nikolopoulou, V.; Vagianos, C.E. *J. Am. Coll. Surg.*, **2004**, *198*, 748.
- [35] Assimakopoulos, S.F.; Alexandris, I.H.; Scopa, C.D.; Mylonas, P.G.; Thomopoulos, K.C.; Georgiou, C.D.; Nikolopoulou, V.N.; Vagianos, C.E. *World J. Gastroenterol.*, **2005**, *11*, 6757.
- [36] Zhou, J.; Chen, J.; Mokotoff, M.; Ball, E.D. *Anticancer Drugs*, **2004**, *15*, 921.
- [37] O'Connor, T.M.; O'Connell, J.; O'Brien, D.I.; Goode, T.; Bredin, C.P.; Shanahan, F. *J. Cell Physiol.*, **2004**, *201*, 167.
- [38] Keeble, J.E.; Brain, S.D. *J. Neurosci. Lett.*, **2004**, *361*, 176.
- [39] Bedoui, S.; Miyake, S.; Straub, R.H.; von Horsten, S.; Yamamura, T. *Trends Immunol.*, **2004**, *25*, 508.
- [40] Moriyama, M.; Sato, T.; Inoue, H.; Fukuyama, S.; Teranishi, H.; Kangawa, K.; Kano, T.; Yoshimura, A.; Kojima, M. *J. Exp. Med.*, **2005**, *202*, 217.
- [41] Niissalo, S.; Hukkanen, M.; Imai, S.; Tornwall, J.; Kontinen, Y.T. *Ann. I. Y. Acad. Sci.*, **2002**, *966*, 384.
- [42] Cuesta, M.C.; Quintero, L.; Pons, H.; Suarez-Roca, H. *J. Neurochem. Int.*, **2002**, *40*, 301.
- [43] Delgado, M.; Pozo, D.; Ganea, D. *Pharmacol. Rev.*, **2004**, *56*, 249.
- [44] Gosney, J.R.; Sissons, M.; Allibone, R. *Thorax*, **1988**, *43*, 878.
- [45] Cutz, E.; Chan, W.; Track, N.S. *Experientia*, **1981**, *37*, 765.
- [46] Aguayo, S.M.; Kane, M.A.; Talmadge, E.K.; Schwarz, M.I.; Grauer, L.; Miller, Y.E. *J. Clin. Invest.*, **1989**, *84*, 1105.
- [47] Gosney, J.R.; Sissons, M.C.J.; Allibone, R.D.; Blakey, A.F. *J. Pathol.*, **1989**, *147*, 127.
- [48] Aguayo, S.M.; Talmadge, E.K.; Waldron, J.A. Jr; Sherrit, K.M.; Kane, M.A.; Miller, Y.E. *J. Clin. Invest.*, **1990**, *86*, 838.
- [49] Tabassian, A.R.; Nylen, E.S.; Linnola, R.I.; Snider, R.H.; Cassidy, M.M.; Becker, K.L. *Am. Rev. Respir. Dis.*, **1989**, *140*, 436.
- [50] Nylen, E.S.; Becker, K.L.; Joshi, P.A.; Snider, R.H.; Schuller, H.M. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, **1990**, *2*, 25.
- [51] Meloni, F.; Bertolotti, R.; Corsico, A.; Di Fazio, P.; Cecchetti, M.; Grassi, G. *Int. J. Tiss. React.*, **1992**, *14*, 195.
- [52] Peck, R. *Ann. I. Y. Acad. Sci.*, **1987**, *496*, 264.
- [53] Meloni, F.; Saporiti, A.; Ballabio, P.; Brocchieri, A.; Grignani, G.; Gialdroni Grassi, G. *Monaldi. Arch. Chest Dis.*, **1995**, *50*, 187.
- [54] Meloni, F.; Ballabio, P.; Bianchi, L.; Mangiarotti, P.; Grassi, G.; Bignamini, A.; Gialdroni Grassi, G. *Respiration*, **1996**, *63*, 28.
- [55] Aguayo, S.M. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **1994**, *149*, 1692.
- [56] Warner, J.A.; Kroegel, C. *Eur. Respir. J.*, **1994**, *7*, 1326.
- [57] Akers, I.A.; Parsons, M.; Hill, M.R.; Hollenberg, M.D.; Sanjar, S.; Laurent, G.J.; McAnulty, R.J. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.*, **2000**, *278*, L193.
- [58] Sunday, M.E.; Shan, L.; Subramaniam, M. *Endocr. Pathol.*, **2004**, *15*, 91.
- [59] Cullen, A.; Van Marter, L.J.; Allred, E.N.; Moore, M.; Parad, R.B.; Sunday, M.E. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **2002**, *165*, 1093.
- [60] Subramaniam, M.; Sugiyama, K.; Coy, D.H.; Kong, Y.; Miller, Y.E.; Weller, P.F.; Wada, K.; Wada, E.; Sunday, M.E. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **2003**, *168*, 601.
- [61] Bader, D.; Ramos, A.D.; Lew, C.D.; Platzker, A.C.; Stabile, M.W.; Keens, T.G. *J. Pediatr.*, **1987**, *110*, 693.
- [62] Ashour, K.; Shan, L.; Lee, J.H.; Schlicher, W.; Wada, K.; Wada, E.; Sunday, M.E. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **2006**, *173*, 1377.
- [63] Westermark T, Rantapaa-Dahlqvist S, Wallberg-Jonsson S, Kjorell U, Forsgren S. *Clin. Exp. Rheumatol.*, **2001**, *19*, 715.
- [64] Hill DJ, McDonald TJ. *Endocrinology*, **1992**, *130*, 2811.
- [65] Grimsholm, O.; Rantapaa-Dahlqvist, S.; Forsgren, S. *Arthritis Res. Ther.*, **2005**, *7*, R416.
- [66] Dal-Pizzol, F.; Di Leone, L.P.; Ritter, C.; Martins, M.R.; Reinke, A.; Pens Gelain, D.; Zanotto-Filho, A.; de Souza, L.F.; Andrades, M.; Barbeiro, D.F.; Bernard, E.A.; Cammarota, M.; Bevilacqua, L.R.; Soriano, F.G.; Cláudio, J.; Moreira, F.; Roesler, R.; Schwartzmann, G. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **2006**, *173*, 84.

PARTE III

Discussão e Conclusões

III.1. DISCUSSÃO

Segundo observações clássicas de Lewis publicadas em 1972 no *New England Journal of Medicine* “É nossa resposta à presença dos microorganismos patogênicos que causa a doença. Nosso arsenal para combater as bactérias é tão poderoso...que nós estamos mais em perigo do que os próprios invasores”. A perda do direcionamento de resposta do hospedeiro aos organismos invasores torna-se a principal característica relacionada à sepse e sua resposta sistêmica caracterizada tradicionalmente como pró-inflamatória e excessiva. O conceito “inflamação excessiva” encontra respaldo em diferentes achados, o que denota a complexidade da definição clínica e o manejo terapêutico da sepse em muitos aspectos ainda não bem definidos o que leva ainda a um aumento na sua incidência nos últimos anos com uma discreta redução na mortalidade (Alberti et al., 2002; Annane et al., 2002; Annane et al., 2003; Brun-Buisson et al., 2004; Dellinger et al., 2004). Portanto, o entendimento sobre os mecanismos celulares e moleculares que contribuem na fisiopatologia de doenças inflamatórias e na disfunção de órgãos e a busca de novas alternativas terapêuticas tornam-se essenciais na redução da mortalidade (Baron et al., 2006; Vincent e Abraham, 2006).

Estudos mostram que a resposta imune pode ser influenciada pelo sistema nervoso onde recentemente nosso grupo mostrou que o neuropeptídeo homólogo da bombesina, o peptídeo liberador de gastrina, encontra-se envolvido na inflamação sistêmica característica da sepse, sendo que o seu antagonista, RC-3095 modulou a liberação de citocinas pró-inflamatórias por macrófagos ativados, levando a diminuição da infiltração inflamatória e

disfunção de órgãos, melhorando dessa forma a mortalidade em modelo clinicamente relevante de sepse e dano agudo pulmonar (Dal-Pizzol et al., 2006).

Nesse contexto, na primeira fase do nosso estudo, avaliamos o efeito protetor de RC-3095 em modelo de inflamação aguda relacionada ao dano pulmonar induzido por carragenina. Sabe-se que a administração aguda de carragenina no espaço pleural leva a pleurisia, caracterizada pela infiltração imediata de neutrófilos e dano pulmonar. Com o infiltrado de neutrófilos, a pleurisia induzida por carragenina é caracterizada pela produção em excesso de espécies reativas de oxigênio bem como outros mediadores derivados de neutrófilos que segundo a literatura estão envolvidos em condições que levam ao dano tecidual por ativarem fatores de transcrição responsáveis pela liberação de citocinas pró-inflamatórias (Guo e Ward, 2007). Assim a resposta inflamatória é o mecanismo predominante envolvido na patogênese no dano pleural causado por carragenina.

Uma vez a efusão pleural é caracterizada por um exsudato, o estágio da inflamação é caracterizado pela presença significativa de neutrófilos onde a predominância é associada já nas primeiras fases da resposta inflamatória e progressão da doença pleural, no entanto o antagonista do GRPR, RC-3095 inibiu a migração celular, o dano tecidual com a diminuição da atividade de lactato desidrogenase e níveis de proteínas no exsudato pleural comparando com o grupo que não recebeu tratamento.

Trabalhos mostram que o mecanismo da migração celular para a cavidade pleural é dependente da ação de citocinas quimiotáticas e ocorre após a sua liberação por células mesoteliais pleurais em resposta ao estímulo

por outras citocinas (Antony et al., 1993). O processo inflamatório causado com administração de carragenina na cavidade pleural é consistente com o aumento de citocinas pro-inflamatórias como IL-1 β e TNF- α (Kroegel e Antony, 1997) o que foi demonstrado adicionalmente no estudo onde camundongos *knockout* do receptor 1 de TNF- α foram resistentes a inflamação aguda induzida por carragenina na cavidade pleural em relação aos camundongos selvagens (Mazzon et al., 2008). Conforme mencionado anteriormente verificamos a ação inflamatória induzida por GRP na sepse e em macrófagos peritoneais induzidos por LPS e observamos que a via induzida por GRPR é seletiva para a ativação de citocinas pró-inflamatórias (Dal-Pizzol et al., 2006). E em paralelo nosso grupo verificou tal efeito em modelo de artrite em ratos (Oliveira et al., 2008). Através destes dados verificamos os níveis de TNF- α e IL-1 β no exsudato pleural de ratos sujeitos ao modelo proposto sob tratamento com RC-3095 onde constatamos a diminuição dos seus níveis com o tratamento.

Outro evento positivo causado por RC-3095 sob o processo inflamatório relacionado à atenuação da liberação de citocinas pode ser a diminuição da concentração de nitrito/nitrato. A indução de iNOS por injeção de LPS em roedores é mediado por TNF- α e IL-1 β (Szabo et al., 1993; Jin et al., 2006) e sabe-se que o aumento na produção de NO por iNOS pode contribuir para o processo inflamatório (Oh-Ishi et al., 1989; Tracey et al., 1995; Cuzzocrea et al., 1999). Evidências, confirmam que inibidores da atividade de iNOS estão relacionados com a redução da pleurisia causada por carragenina (Cuzzocrea et al., 1998) e constatamos uma diminuição na formação de nitrito-nitrato, um metabólito final de NO (Guo e Ward, 2007). Ainda, verificamos a atividade de

RC-3095 na diminuição da enzima mieloperoxidase conhecida como um marcador indireto de leucócitos ativados e na exudação e migração celular o que também foi verificado em modelo de sepse (Dal-Pizzol et al., 2006).

Visto que como uma das funções dos neutrófilos quando reconhecem um patógeno é eliminá-lo, neutrófilos ativados contam com substâncias como EROs que agem sobre a membrana celular dos microorganismos com a finalidade de destruí-los e conseqüentemente evitar a disseminação. No entanto, as EROs também podem levar a injúria em tecidos normais (Yasui e Baba, 2006). Este mecanismo deletério causado por tais moléculas exerce efeito contra importantes componentes celulares devido a sua intensa instabilidade e reatividade e encontram-se associados ao modelo de indução de pleurisia por carragenina (Cuzzocrea et al., 2000; Nardi et al., 2007; Bhattacharyya, Dudeja e Tobacman, 2008; Menegazzi et al., 2008) Nesse contexto, marcadores de peroxidação de lipídios foram encontrados em estudos que avaliam o dano pulmonar induzido por ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxil (OH^\cdot) e peroxinitrito ($ONOO^\cdot$) (Guo e Ward, 2007). Assim, no tecido pulmonar de ratos submetidos à pleurisia, RC-3095 foi importante na diminuição do dano em lipídios e dano em proteínas com o aumento de resíduos de aminoácidos contendo grupos tióis. Essa resposta positiva está relacionada também a diminuição de citocinas anteriormente descritas pois as EROs podem amplificar a resposta inflamatória com a liberação de mediadores inflamatórios através da ativação de NF- κ B e AP-1 (Kirkham e Rahman, 2006; Uffort, Grimm e Ellerhorst, 2009).

Evidências sugerem que NF- κ B exerce importante papel na resposta inflamatória induzida por carragenina onde através da administração de seus

inibidores, inibe-se a resposta inflamatória exacerbada após a administração de carragenina na cavidade pleural em camundongos (Fröde-Saleh e Calixto, 2000). Dessa forma, segundo Levine, a bombesina estimula a ativação de NF- κ B (Levine et al., 2003), o que pode sugerir a associação da diminuição da resposta inflamatória e a atenuação do dano oxidativo em modelo animal de inflamação pleural com o bloqueio de GRPR envolvido na *up-regulation* da ativação de NF- κ B.

Os resultados até agora discutidos podem demonstrar, portanto que o neuropeptídeo GRP encontra-se envolvido na gênese da inflamação pleural e que antagonizando o seu receptor encontramos uma diminuição em parâmetros oxidativos e inflamatórios que segundo a literatura levam ao dano pulmonar (Farley, Wang e Mehta, 2009). Assim o nosso próximo estudo baseou-se na sua ação como efeito modulatório da inflamação a nível sistêmico.

Sabe-se que a inflamação sistêmica é caracterizada por níveis aumentados de citocinas e quimiocinas circulantes e como resultado em níveis aumentados de neutrófilos em órgãos como o pulmão (Abraham, 2003). Estudos mostram que o mecanismo desta relação acontece em animais submetidos à sepse severa ou ao choque endotoxêmico, onde uma das funções principais da imunidade inata realizada por neutrófilos no tecido infectado está alterada, com comprometimento da sua resposta quimiotática e da capacidade em migrar para o foco infeccioso, evento denominado de paralisia ou falência da migração de neutrófilos (Benjamim et al., 2002; Alves-Filho et al., 2006b). Nesse sentido, recentemente foi observado que camundongos deficientes de TLR-4 exibem migração de neutrófilos para a

cavidade peritoneal durante sepse polimicrobiana letal induzida por CLP, interessante tal evento não ocorre em camundongos normais, portanto sugeriu-se o envolvimento de TLR-4 na falência da migração de neutrófilos para o foco infeccioso nos casos mais severos de sepse visto que esse fato ocorre através da ativação sistêmica dos TLRs com a invasão bacteriana em níveis relevantes (Alves-Filho et al., 2006a). Dessa forma, devido seu importante papel na regulação de moléculas envolvidas na resposta inflamatória, receptores TLR principalmente TLR-4 são alvos importantes para o desenvolvimento de novas terapias contra doenças inflamatórias como a sepse (Matsuda e Hattori, 2006).

Assim, no segundo capítulo do presente trabalho tivemos por objetivo investigar o efeito do antagonista de GRP, RC-3095 na sinalização de TLR-4 e esta relação com parâmetros inflamatórios em modelos experimentais *in vitro* e *in vivo* e em pacientes com sepse, bem como avaliar os níveis plasmáticos de GRP em pacientes com SIRS e sepse correlacionando com o seu desfecho clínico.

O estudo das interações entre o sistema imune e nervoso central tem despertado o interesse de inúmeros grupos de pesquisa. Esses sistemas trocam informações, influenciando-se mutuamente, com evidentes implicações fisiológicas e patológicas. Assim como outros neuropeptídeos GRP está ligado a esses dois sistemas, como verificado na modulação como um estimulador ou inibidor da função de linfócitos (Medina et al., 1998b; Medina et al., 1999), fagócitos (De la Fuente et al., 1991) e células NK (Medina et al., 1998a). Adicionalmente, BLPs possuem efeitos estimulatórios na mobilidade, ingestão e produção de superóxido em macrófagos de ratos adultos, potencializando a

liberação de IL-1 por macrófagos alveolares ativados com LPS (Lemaire, 1991; De la Fuente et al., 2000) e em condições inflamatórias como bronquite crônica (Meloni et al., 1992) e fibrose pulmonar (Lemaire, Jones e Khan, 1991) além do aumento nos níveis de GRP em células da linhagem monócito-macrófago (Del Rio e De la Fuente, 1994).

Recentes trabalhos indicam que neuropeptídeos podem ainda regular a resposta de macrófagos para LPS, afetando a expressão de TLR-2 e regulando a sinalização de TLR-4 (Tsatsanis et al., 2006). Nesse caso, devido aos macrófagos secretarem GRP (Genton e Kudsk, 2003) e tais células serem importantes no processo de desenvolvimento de sepse e choque séptico (Shasby e McCray, 2004), as nossas primeiras observações foram em torno da diminuição da expressão de *mRNA* de TLR-4 em cultura de células RAW 264.7 estimuladas por LPS quando tratadas com RC-3095. Estudos mostram que existe um aumento na expressão de TLR-4 durante as fases iniciais de sepse correlacionando-se com a morte em modelo animal de sepse por CLP, portanto a *down-regulation* desses receptores aumenta a sobrevivência em modelo de CLP (Williams et al., 2003) que mostra-se em concordância com os nossos resultados apresentados através da ação de RC-3095. Ainda, considerando que GRP induz a proliferação de mastócitos e quimiotaxia *in vitro*, é detectado em células pulmonares neuroendócrinas sendo implicado na patogênese de doenças pulmonares como um mediador de injúria pulmonar aguda e crônica em displasia broncopulmonar (Subramaniam et al., 2003; Degan et al., 2008) e ainda, relacionando ao seu receptor, foi visto que GRPR está implicado no edema alveolar (Dal-Pizzol et al., 2006), tais informações remetem os resultados observados onde o efeito inibitório de RC-3095 na *up-regulation* de

TLR-4 no tecido pulmonar nos ratos sujeitos a sepse polimicrobiana letal por CLP resulta na atenuação da inflamação pulmonar.

Pouco se sabe ainda a respeito do mecanismo pelo qual acontece a inibição ou estimulação de TLR-4. No entanto pesquisadores mostram que os receptores TLRs podem ser afetados através da ubiquitilação um mecanismo geral para a regulação de funções de receptores de membrana celulares por promover a degradação proteolítica de proteínas, seqüestro de proteínas adaptadoras, e a desativação de quinases através de fosfatases e pela inibição da expressão por citocinas anti-inflamatórias (Han e Ulevitch, 2005; Liew, Xu e Brint, 2005). Tais mecanismos podem associar-se as vias de ativação de GRPR. Sabe-se que o receptor de BN acoplado a proteína G pode fosforilar membros da família Janus quinase/transdutora de sinais e ativadora de transcrição (Jak/STAT) (Pansky et al., 1998). Podemos especular que RC-3095 pode exercer este efeito na expressão de TLR-4 através de STAT6 como STAT6 fosforilada *down-regulate* a expressão de TLR-4 visto que a expressão excessiva de STAT6 aumenta a inibição de promotores de TLR-4 (Fiset et al., 2006). Ainda, STAT6 pode inibir importantes genes inflamatórios, incluindo fator regulatório de interferon-1 (IRF-1) (Ohmori e Hamilton, 1997), TNF- α e IL-12p40 (Major, Fletcher e Hamilton, 2002) e nas células mononucleares, o interferon- γ (IFN- γ), induz o aumento de *mRNA* e expressão na superfície da célula de TLR-4, inibindo a redução de TLR-4 induzida por LPS. Portanto, IFN- γ sensibiliza as células mononucleares para o efeito do LPS, justificando que essa citocina aumenta a expressão de TLR-4 (Cohen, 2002), o que pode ser um *link* entre a relação da inibição de GRPR e a expressão atenuada de TLR-4.

Com o aumento da sinalização de TLR-4 acontece a ativação de importantes vias inflamatórias como verificado na ativação de ERK1/2 em monócitos/macrófagos, via JNK em células RAW (Sugiyama, Muroi e Tanamoto, 2008) e fosfatilinositol 3 quinase (PI3K), que ativa Akt em macrófagos de camundongos (Kim et al., 1996; Monick et al., 2001; Bozinovski et al., 2002; Ojaniemi et al., 2003; Wrann et al., 2007; Laird et al., 2009). Constatamos que o estímulo de células RAW 264.7 com LPS resultou na fosforilação de ERK 1/2, JNK e Akt em 60 minutos após o tratamento com RC-3095. Assim, antagonizando o GRPR pode-se influenciar em vias de sinalização de kinases intracelulares induzida por TLR-4.

Adicionalmente, é bem documentado que fatores de transcrição NF- κ B e AP-1 exercem um importante papel na regulação transcricional induzido por LPS de muitos genes inflamatórios como de citocinas/quimiocinas que contribuem para o desenvolvimento do choque séptico e falência múltipla de órgãos (Guha e Mackman, 2001). Essas observações, estão de acordo com nossos resultados onde células RAW 264.7 estimuladas por LPS a atividade de NF- κ B e AP-1 ligado ao DNA foi diminuído. Sugerimos assim, que a supressão da translocação nuclear de NF- κ B e AP-1 por RC-3095 está associada com a diminuição da expressão de TLR-4 e ativação de MAP kinase.

Segundo Alves-Filho e colaboradores, uma significativa deficiência no recrutamento de neutrófilos durante a sepse severa é caracterizada pelo seqüestro inapropriado dessas células para o pulmão. A migração de neutrófilos prejudicada para os sítios de infecção implica-se na patogênese da sepse, e a magnitude desse evento associa-se à razão da mortalidade (Alves-Filho et al., 2006a). O recrutamento de neutrófilos para o sítio de infecção é

dependente de quimiocinas tais como proteína quimiotática de monócitos -1 (MCP-1) (Chishti et al., 2004), além da ação de citocinas pró-inflamatórias como IL-6 que afetam diretamente a adesão e funções migratórias de neutrófilos (Johnson et al., 1991; Adams e Lloyd, 1997). Como demonstrado no estudo onde MCP-1 e IL-6 são efetores na migração de neutrófilos de 1-2 h após endotoxemia (Wagner e Roth, 1999). No entanto, a falência na migração de neutrófilos não é uma consequência de níveis de mediadores quimiotáticos baixos, mais de altos níveis de mediadores quimiotáticos no foco de infecção (Benjamim, Ferreira e Cunha, 2000; Crosara-Alberto et al., 2002).

A participação de citocinas/quimiocinas na falência de migração de neutrófilos para o foco de infecção pode ser justificada por diferentes estudos como a alta concentração dessas moléculas na circulação de pacientes com sepse (Ozbalkan et al., 2004; ter Meulen et al., 2004); e em modelo animal (Benjamim, Ferreira e Cunha, 2000; Crosara-Alberto et al., 2002; Moreno et al., 2006), a inibição da migração de neutrófilos por diferentes estímulos inflamatórios com a administração intravenosa de TNF- α , IL-8 e IL-2 (Otsuka et al., 1990; Hechtman et al., 1991; Tavares-Murta, Cunha e Ferreira, 1998); aumento da sobrevivência de camundongos B6 a infecção polimicrobiana letal com aumento do recrutamento de neutrófilos e *clearance* bacteriano na cavidade peritoneal comparados com camundongos deficientes dos receptores 1 e 2 de TNF- α (Secher et al., 2009). Dados consistentes, portanto mostram que a resposta exacerbada com a presença de mediadores inflamatórios como citocinas/quimiocinas podem comprometer a ação controlada de neutrófilos e propõe-se que isso se deve em parte ao fato de que tais mediadores exercem sua ação via ligação ao GPCRs (Katanaev, 2001) onde sua ativação contínua

leva a um processo de dessensibilização devido a sua fosforilação por GRK (Fan e Malik, 2003). Recentemente foi observado que a ativação de GRKs está envolvida na dessensibilização de CXCR2 em neutrófilos de pacientes sépticos e camundongos submetidos à sepse severa (Arraes et al., 2006; Alves-Filho et al., 2009). Nesse sentido, ativação sistêmica de TLR-4 resulta na ativação inadequada de neutrófilos por produtos bacterianos e/ou quimiocinas induzidas pela expressão de iNOS, resultando principalmente na dessensibilização de CXCR2 e perda de moléculas de adesão. Em adição, aumento em níveis de proteína de fase aguda no soro induzida por quimiocinas podem também inibir interações neutrófilo-endotélio, desse modo reduzindo a adesão/rolamento e quimiotaxia de neutrófilos e finalmente comprometendo a migração levando possivelmente a uma resposta alterada de neutrófilos contra células de diferentes órgãos (Annane, Bellissant e Cavaillon, 2005).

Durante o choque endotóxico, um massivo número de neutrófilos e outros leucócitos acumulam-se no pulmão, um processo dependente de TLR-4. Certamente, o acúmulo de células no pulmão é também observado em pacientes sépticos (Kerfoot e Kubes, 2005). Novamente, a ativação sistêmica de TLR-4 resulta em um significativo seqüestro de leucócitos para os capilares pulmonares (Welbourn e Young, 1992; Sheridan et al., 1997; Andonegui et al., 2003). Ainda, neuropeptídeos são conhecidos por estimular a produção de citocinas em macrófagos, linfócitos, mastócitos e a substância P é conhecida por influenciar a produção de citocinas pró-inflamatórias induzida por LPS (Dickerson et al., 1998). Arranz e colaboradores mostraram que citocinas pró-inflamatórias podem agir sinergicamente, com componentes de bactérias gram-negativas, *up-regulating* a expressão de TLR-4 e é possível que a

inibição induzida por VIP na *up-regulation* de TLR-4 em modelos inflamatórios ocorre indiretamente via supressão da produção de citocinas pro-inflamatórias (Arranz et al., 2008). Essa questão vem ao encontro de informações que propomos no Capítulo III e anteriormente mencionado, visto que o papel autócrino/parácrino de GRP na ativação de macrófagos por sepse e/ou LPS é seletivo para a modulação de pró-inflamatória, mas não resposta anti-inflamatória conforme a Figura 2.

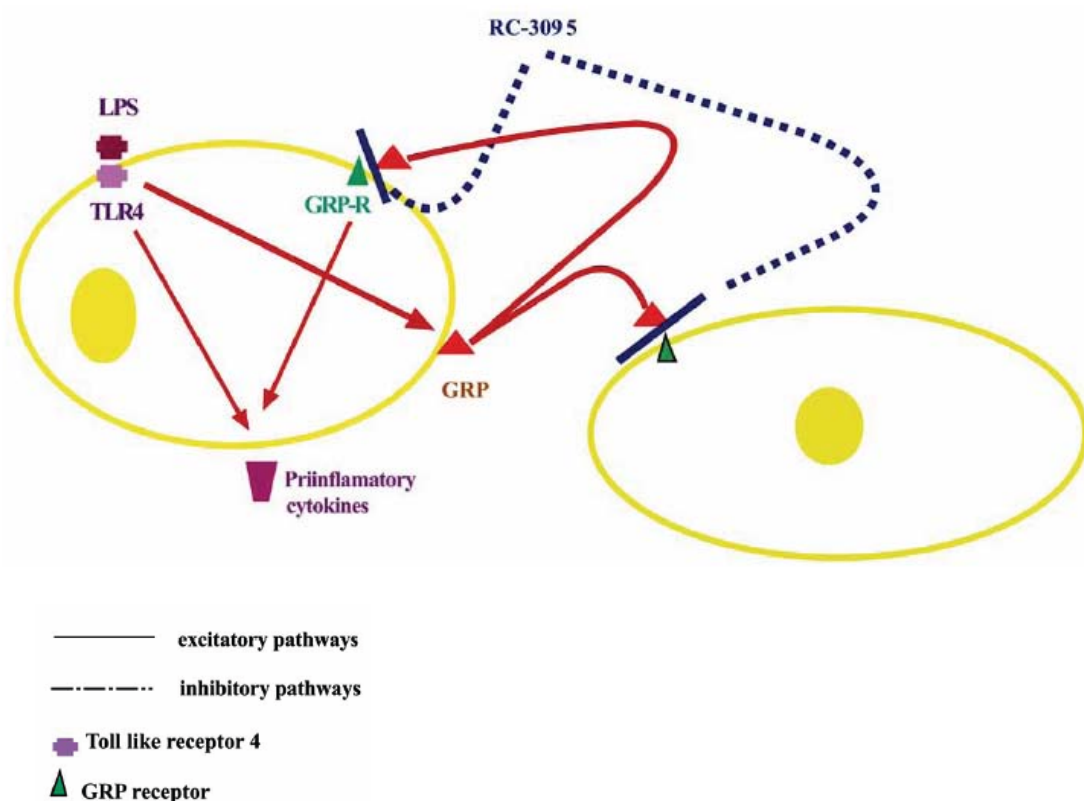


Figura 1. Mecanismo da interação LPS x GRP em macrófagos

De acordo com esses dados, em nosso estudo verificamos que RC-3095 modulou a resposta inflamatória dependente de TLR-4 produzindo uma diminuição nos níveis de MCP-1 e IL-6 em células RAW 264.7, soro e lavado broncoalveolar em ratos CLP. Sabe-se que o tratamento agudo com RC-3095 diminui a migração de células para o pulmão e de acordo com os estudos de

Alves-Filho e colaboradores, onde camundongos normais mais não os deficientes de TLR-4 exibem diminuição na migração de neutrófilos para o foco infeccioso e exibem significativa seqüestro dessas células para o tecido pulmonar durante sepse polimicrobiana letal e isto é conhecido por ser o evento chave no dano agudo pulmonar induzido na sepse com diminuição da morte bacteriana levando a bacteremia (Alves-Filho et al., 2006a). Conseqüentemente percebemos que a ação de RC-3095 na atenuação de TLR-4 em modelo animal de sepse resulta em uma migração normal de neutrófilos, sendo efetivo na atenuação da disseminação bacteriana na circulação e foco infeccioso.

Visto que GRP afeta vários sistemas em mamíferos, incluindo regulação neuroendócrina, secreção gastrointestinal e proliferação celular. Esta presença em concentrações aumentadas tem sido demonstrada em pacientes com doenças inflamatórias e este nível correlaciona-se a razão da sedimentação de eritrócitos e com TNF e IL-6, sugerimos, portanto que tal neuropeptídeo pode estar envolvido na modulação de processos inflamatórios também em humanos (Fagiolo et al., 1993). Em pacientes com sepse RC-3095 revela a deficiência de níveis de IL-6 no plasma, entretanto este resultado não foi encontrado para níveis de IL-10, mostrando adicionalmente a seletividade apresentada na Figura 2. Nossos resultados sugerem ainda que GRP pode estar diferencialmente envolvido em SIRS e sepse onde GRP pode somente prever o desfecho em pacientes sépticos. Finalmente, de acordo com esses resultados obtidos na ultima fase do estudo, sugerimos que GRP aumenta a resposta inflamatória por *up-regulating* TLRs e isto se deve em grande parte explicar as diferenças entre pacientes com sepse e pacientes com SIRS.

III.2. CONCLUSÕES

- O antagonista do GRPR é efetivo na diminuição da inflamação aguda em modelo animal de pleurisia induzido por carragenina e relaciona-se à diminuição de parâmetros de dano oxidativo.
- O antagonista do GRPR diminui a expressão do receptor TLR-4 e de uma forma secundária é efetivo na atenuação da fosforilação de quinases resultando na inibição da translocação dos fatores de transcrição NF- κ B e AP-1 em cultura de macrófagos estimulados por LPS e a nível pulmonar em modelo animal de sepse.
- Níveis de IL-6 e MCP-1 parecem estar associados à diminuição da expressão de TLR-4 através da sua atenuação em cultura de células estimuladas por LPS e a nível sistêmico e pulmonar em modelo animal de sepse polimicrobiana letal.
- O nível plasmático de IL-6 em pacientes com choque séptico atenuado com a infusão de RC-3095 mostra a seletividade da via de ativação do receptor do peptídeo liberador de gastrina para mediadores pró-inflamatórios e não anti-inflamatórios.
- A modulação de citocinas e quimiocinas através do antagonismo de GRPR associa-se a diminuição da inflamação em locais distantes do foco infeccioso limitando a disseminação bacteriana a nível local em modelo animal de sepse polimicrobiana letal estando associada a diminuição da resposta mediada por TLR-4.
- GRP está diferencialmente envolvido em pacientes com SIRS e sepse onde GRP pode somente prever o desfecho em pacientes sépticos e

esta diferença pode estar relacionada ao aumento da resposta inflamatória causado por GRP por *up-regulating* TLRs.

III.3. PERSPECTIVAS

Nosso propósito como continuidade para o estudo até agora apresentado, está relacionado a investigação sobre os efeitos do antagonista do peptídeo liberador de gastrina em camundongos deficientes de TLR-4 submetidos a sepse polimicrobiana na migração neutrofílica para o foco infeccioso avaliando a interação do receptor de quimiocina CXCR2 com todo esse processo. Portanto pretendemos passar pelas seguintes etapas:

- Investigar a ação de RC-3095, em camundongos deficientes de TLR-4 e animais controle sujeitos a sepse severa polimicrobiana, a fim de verificar a migração neutrofílica para o foco infeccioso e em sítios distantes da infecção.
- Testar o rolamento e adesão de leucócitos no mesentério de camundongos deficientes de TLR-4 e animais controle sujeitos a sepse severa polimicrobiana tratados com o antagonista do receptor do peptídeo liberador de gastrina.
- Avaliar através da contagem de bactérias a disseminação bacteriana no foco infeccioso e a nível circulatório em camundongos deficientes de TLR-4 e animais controle sujeitos a sepse severa polimicrobiana, tratados com o antagonista do receptor do peptídeo liberador de gastrina.
- Determinar níveis de citocinas e quimiocinas no foco infeccioso, na circulação sanguínea e no tecido pulmonar de camundongos deficientes de TLR-4 e animais controle sujeitos a sepse severa polimicrobiana tratados com o antagonista do receptor do peptídeo liberador de gastrina.

- Verificar a expressão de CXCR2 na superfície de neutrófilos isolados do sangue de camundongos deficientes de TLR-4 e animais controle sujeitos a sepse severa polimicrobiana tratados com o antagonista do receptor do peptídeo liberador de gastrina.
- Analisar a expressão de GRK-2 em neutrófilos isolados do sangue de camundongos deficientes de TLR-4 e animais controle sujeitos a sepse severa polimicrobiana tratados com o antagonista do receptor do peptídeo liberador de gastrina, a fim de verificar a migração neutrofílica para o foco infeccioso.

Essa abordagem nos proporcionará resultados mais refinados que poderão ser potencialmente úteis para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para a sepse e alie-se a isto o fato de que nenhum grupo nacional ou estrangeiro está se dedicando ao estudo que ora propomos até o momento.

III.4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abraham E. Neutrophils and acute lung injury. *Crit Care Med* 31:195–199, 2003.

Adams DH, Lloyd AR. Chemokines: leucocyte recruitment and activation cytokines. *Lancet* 349:490-495, 1997.

Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 4:499-511, 2004.

Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124: 783-801, 2006.

Albers HE, Liou SY, Stopa EG, Zoeller RT. Interaction of colocalized neuropeptides: functional significance in the circadian timing system. *J Neurosci* 11: 846-851, 1991.

Alexander RW, Upp JR Jr, Poston GJ, Gupta V, Townsend CM Jr, Thompson JC. Effects of bombesin on growth of human small cell lung carcinoma in vivo. *Cancer Res* 48: 1439-1441, 1998.

Alves-Filho JC, Freitas A, Russo M, Cunha FQ. Toll-like receptor 4 signaling leads to neutrophil migration impairment in polymicrobial sepsis. *Crit Care Med* 34:461-470, 2006 a.

Alves-Filho JC, Tavares-Murta BM, Barja-Fidalgo C, Benjamim CF, Basile-Filho A, Arraes SM, Cunha FQ. Neutrophil function in severe sepsis. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* 6:151-158, 2006 b.

Alves-Filho JC, Freitas A, Spiller F, Souto FO, Cunha FQ. The role of neutrophils in severe sepsis. *Shock Supp* 1: S3-S9, 2008.

Alves-Filho JC, Freitas A, Souto FO, Spiller F, Paula-Neto H, Silva JS, Gazzinelli RT, Teixeira MM, Ferreira SH, Cunha FQ. Regulation of chemokine receptor by Toll-like receptor 2 is critical to neutrophil migration and resistance to polymicrobial sepsis. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:4018-4023, 2009.

Anastasi A, Esparmer V, Bucci M. Isolation and structure of bombesin and alytesin, two analogous active peptides from the skin of the European amphibians *Bombina* and *Alytes*. *Experientia* 27:166-167, 1971.

Andonegui G, Bonder CS, Green F, Mullaly SC, Zbytniuk L, Raharjo E, Kuberski P. Endothelium-derived Toll-like receptor-4 is the key molecule in LPS-induced neutrophil sequestration into lungs. *J Clin Invest* 111:1011–1020, 2003.

Anname D, Bellissant E, Cavillon J. Septic shock. *The Lancet* 365:63-78, 2005.

Antony VB, Godbey SW, Kunkel SL, Hott JW, Hartman DL, Burdick MD, Strieter RM. Recruitment of inflammatory cells to the pleura space. Chemotactic cytokines IL-8, and monocyte chemoattractant protein-1 in human pleural fluids. *J Immunol* 151:7216-7223, 1993.

Appelberg R. Neutrophils and intracellular pathogens: beyond phagocytosis and killing. *Trends Microbiol* 15:87-92, 2007.

Arraes SM, Freitas MS, da Silva SV, de Paula Neto HA, Alves-Filho JC, Auxiliadora Martins M, Basile-Filho A, Tavares-Murta BM, Barja-Fidalgo C,

- Cunha FQ. Impaired neutrophil chemotaxis in sepsis associates with GRK expression and inhibition of actin assembly and tyrosine phosphorylation. *Blood* 108:2906-2913, 2006.
- Arranz A, Androulidaki A, Zacharioudaki V, Martinez C, Margioris AN, Gomariz RP, Tsatsanis C. Vasoactive intestinal peptide suppresses toll-like receptor 4 expression in macrophages via Akt1 reducing their responsiveness to lipopolysaccharide. *Mol Immunol* 45:2970-2980, 2008.
- Azevedo LCP, Park M, Schettino GPP. Novel potential therapies for septic shock. *Shock Supp* 1: S60-S66, 2008.
- Baron RM, Baron MJ, Perrella MA. Pathobiology of sepsis: are we still asking the same questions? *Am J Cell Mol Biol* 34:129-134, 2006.
- Batley J.F, Way JM, Corjay MH, Shapira H, Kusano K, Harkins R, Wu JM, Slattery T, Mann E, Feldman RI. Molecular cloning of the bombesin/gastrin-releasing peptide receptor from Swiss 3T3 cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:395-399,1991.
- Bhattacharyya S, Dudeja PK, Tobacman JK. Carrageenan-induced NFkappaB activation depends on distinct pathways mediated by reactive oxygen species and Hsp27 or by Bcl10. *Biochim Biophys Acta* 1780:973-82, 2008.
- Bedoui S, et al. More sympathy for autoimmunity with neuropeptide Y. *Trends Immunol* 25:508-512, 2004.
- Beishuizen A, Vermes I, Haanen C. Endogenous mediators in sepsis and septic shock. *Adv Clin Chem* 33:55-131, 1999.

- Benjamim CF, Ferreira SH, Cunha FQ. Role of nitric oxide in the failure of neutrophil migration in sepsis. *J Infect Dis* 182: 214-223, 2000.
- Benjamim, CF, Silva JS, Fortes ZB, Oliveira MA, Ferreira SH, Cunha FQ. Inhibition of leukocyte rolling by nitric oxide during sepsis leads to reduced migration of active microbicidal neutrophils. *Infect Immun* 70:3602-3610, 2002.
- Beutler B, Poltorak A. Sepsis and evolution of innate immune response. *Crit Care Med* 2001, 29: S2-S6.
- Bjornskov-Bartholdy, Bersani LM, Holst JJ. Identification, characterization and release of GRF gene-associated peptides from the normal porcine and human gastro-intestinal tract. *Regul Pept* 34:197-209, 1991.
- Bold RJ, Kim HJ, Ishizuka J, Townsend CM Jr, Thompson JC. A human gastric cancer cell line possesses a functional receptor for gastrin-releasing peptide. *Cancer Invest* 16:12-17,1998.
- Bologna M, Festuccia C, Muzi P, Biordi L, Ciomei M. Bombesin stimulates growth of human prostatic cancer cells in vitro. *Cancer* 63:1714-1720, 1989.
- Bone RC. Immunologic dissonance: a continuing evolution in our understanding of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS) and the multiple organ dysfunction syndrome (MODS). *Ann Intern Med* 125:680-687, 1996.
- Bone R C, Balk R A, Cerra F B, Dellinger R P, Fein A M, Knaus W A, Schein R M, Sibbald WJ Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the

use of innovative therapies in Sepsis. The ACCP-SCCM consensus conference on sepsis and organ failure. *Chest* 101:1481-1483, 1992.

Bozinovski S, Jones JE, Vlahos R, Hamilton JA, Anderson GP. Granulocyte/macrophage-colony-stimulating factor (GM-CSF) regulates lung innate immunity to lipopolysaccharide through Akt/ERK activation of NF- κ B and AP-1 in vivo. *J Biol Chem* 277: 42808-42814, 2002.

Brogden KA, Guthmiller JM, Salzet M, Zasloff M. The nervous system and innate immunity: the neuropeptide connection. *Nat Immunol* 6: 558–564, 2005.

Brown MK, Carver K, Fisher LA. Bombesin: central nervous system actions to affect the autonomic nervous system. *Ann N Y Acad Sci* 547:174-182, 1988.

Burns DM, Walker B, Gray J, Nelson J. Breast cancer cell-associated endopeptidase EC 24,11 modulates proliferative response to bombesin. *Br J Cancer* 79:214-220, 1999.

Carvalho D, Petronilho F, Vuolo F, Machado RA, Constantino L, Guerrini R, Calo G, Gavioli EC, Streck EL, Dal-Pizzol F. The nociceptin/orphanin FQ-NOP receptor antagonist effects on an animal model of sepsis. *Intensive Care Med* 34: 2284-2290, 2008.

Carvalho PRP, Trotta EA. Avanços no diagnóstico e tratamento da sepse. *J Pediatr (Rio de Janeiro)* 79: S195-S205, 2003.

- Chishti AD, Shenton BK, Kirby JA, Baudouin SV. Neutrophil chemotaxis and receptor expression in clinical septic shock. *Intensive Care Med* 30:605-611, 2004.
- Chu KU, Evers BM, Ishizuka J, Townsend CM Jr, Thompson JC. Role of bombesin on gut mucosal growth. *Ann Surg* 222:94-100, 1995.
- Cinel I, Dellinger RP. Advances in pathogenesis and management of sepsis. *Curr Opin Infect Dis* 20:345-352, 2007.
- Clark SR, Ma AC, Tavener SA, McDonald B, Goodarzi Z, Kelly MM, Patel KD, Chakrabarti S, McAvoy E, Sinclair GD, Keys EM, Allen-Vercoe E, Devinney R, Doig CJ, Green FH, Kubes P. Platelet TLR-4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. *Nat Med* 13: 463-469, 2007.
- Cohen J. The immunopathogenesis of sepsis. *Nature* 420:885-891, 2002.
- Conlon JM, McGregor GP, Wallin G, Grimelius L, Thim L. Molecular forms of katacalcin, calcitonin gene-related peptide and gastrin-releasing peptide, in a human medullary thyroid carcinoma. *Cancer Res* 48:2412-2416, 1988.
- Cornelio DB, Dal-Pizzol F, Roesler R, Schwartzmann G. Targeting the bombesin/gastrin-releasing peptide receptor to treat sepsis. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov* 2: 178-181, 2007.
- Cuttitta F, Carney DN, Mulshine J, Moody TW, Fedorko J, Fischler A, Minna JD. Bombesin-like peptides can function as autocrine growth factors in human small cell lung cancer. *Nature* 316:823-836, 1985.

Cuzzocrea S, McDonald MC, Filipe HM, Costantino G, Mazzon E, Santagati S, Caputi AP, Thiemermann C. Effects of tempol, a membrane-permeable radical scavenger, in a rodent model of carrageenan-induced pleurisy. *Eur J Pharmacol* 390:209-222, 2000.

Cuzzocrea S, Zingarelli B, Costantino G, Caputi AP. Beneficial effects of Mn(III)tetrakis (4-benzoic acid) porphyrin (MnTBAP), a superoxide dismutase mimetic, in carrageenan-induced pleurisy. *Free Rad Biol Med* 26:25-33, 1999.

Cuzzocrea S, Zingarelli B, Hake P, Salzman AL, Szabó C. Antiinflammatory effects of mercaptoethylguanidine, a combined inhibitor of nitric oxide synthase and peroxynitrite scavenger, in carrageenan-induced models of inflammation. *Free Rad Biol Med* 24:450-59, 1998.

Dalmarco EM, Frode TS, Medeiros YS. Effects of methotrexate upon inflammatory parameters induced by carrageenan in the mouse model of pleurisy. *Mediators Inflamm* 11:299-306, 2002.

Dal-Pizzol F. Alternative activated macrophage: a new key for systemic inflammatory response syndrome and sepsis treatment? *Crit Care Med* 32:1971-1972, 2004.

Dal-Pizzol F, Di Leone LP, Ritter C, Martins MR, Reinke A, Pens Gelain D, Zanotto-Filho A, de Souza LF, Andrades M, Barbeiro DF, Bernard EA, Cammarota M, Bevilaqua LR, Soriano FG, Moreira JCF, Roesler R, Schwartzmann G. Gastrin-releasing Peptide Receptor Antagonist Effects on an Animal Model of Sepsis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med* 173:84-90, 2006.

- Damin DC, Santos FS, Heck R, Rosito MA, Meurer L, Kliemann LM, Roesler R, Schwartzmann G. Effects of the Gastrin-Releasing Peptide Antagonist RC-3095 in a Rat Model of Ulcerative Colitis. *Dig Dis Sci*, in press, 2009.
- Davis TP, Crowell S, Taylor J, Clark DL, Coy D, Staley J, Moody TW. Metabolic stability and tumor inhibition of bombesin/GRP receptor antagonists. *Peptides* 13:401-407, 1992.
- Degan S, Lopez GY, Kevill K, Sunday E. Gastrin-releasing peptide, immune responses, and lung disease. *Ann NY Acad Sci* 1144:136–147, 2008.
- Deitch EA. Rodent models of intra-abdominal infection. *Shock* 24:19-23, 2005.
- de la Fuente M, Del Rio M, Ferrandez MD, Hernanz A. Modulation of phagocytic function in murine peritoneal macrophages by bombesin, gastrinreleasing peptide and neuromedin C. *Immunology* 73: 205-11,1991.
- de la Fuente M, Del Rio M, Hernanz A. Stimulation of natural killer and antibody-dependent cellular cytotoxicity activities in mouse leukocytes by bombesin, gastri-releasing peptide and neuromedin C: involvement of cyclic AMP, inositol 1,4,5-trisphosphate and protein kinase C. *J Neuroimmunol* 48:143-150, 1993.
- de la Fuente M, Medina S, Del Rio M, Ferrandez MD, Hernanz A. Effect of aging on the modulation of macrophage functions by neuropeptides. *Life Sci* 67:2125-35, 2000.

Dellinger RP, Levy MM, Carlet JM, Bion J, Parker MM, Jaeschke R, Reinhart K, Angus DC, Brun-Buisson C, Beale R, Calandra T, Dhainaut JF, Gerlach H, Harvey MM, Marini JJ, Marshall J, Ranieri M, Ramsay G, Sevransky J, Thompson BT, Townsend S, Vender JS, Zimmerman JL, Vicent JL. Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock. *Crit Care Med* 36:296-327, 2008.

De Maio A, Torres MB, Reeves RH. Genetic determinants influencing the response to injury, inflammation, and sepsis. *Shock* 23:11-17, 2005.

Del Rio M, De la Fuente M. Chemoattractant capacity of bombesin, gastrin-releasing peptide and neuromedin C is mediated through PKC activation in murine peritoneal leukocytes. *Regul Pept* 49:185-193, 1994.

Del Rio M, Hernanz A, De la Fuente M. Bombesin, gastrin-releasing peptide, and neuromedin C modulate murine lymphocyte proliferation through adherent accessory cells and activate protein kinase C. *Peptides* 15:15-22, 1994.

Dickerson C, Udem B, Bullock B, Winchurch, RA. Neuropeptide regulation of proinflammatory cytokine responses. *J Leukoc Biol* 63:602-605, 1998.

Fagiolo U, Cossarizza A, Scala E, Fanales-Belasio E, Ortolani C, Cozzi E, Monti D, Franceschi C, Paganelli R. Increased cytokine production in mononuclear cells of healthy elderly people. *Eur J Immunol.* 23: 2375-2378, 1993.

- Fan J, Malik AB. Toll-like receptor-4 (TLR-4) signaling augments hemokine-induced neutrophil migration by modulating cell surface expression of chemokine receptors. *Nat Med* 9:315-321, 2003.
- Farley KS, Wang L, Mehta S. Septic pulmonary microvascular endothelial cell injury: role of alveolar macrophage NADPH oxidase. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 296:480-488, 2009.
- Faurschou M, Borregaard N. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microb Infect* 5:1317-1327, 2003.
- Fiset PO, Tulic MK, Skrablin PS, Grover SM, Létuvé S, Mazer BD, Hamid Q. Signal transducer and activator of transcription 6 down-regulates toll-like receptor-4 expression of a monocytic cell line. *Clin Exp Allergy* 36:158-165, 2006.
- Fiuza C, Salcedo M, Clemente G, Tellado JM. Granulocyte colony-stimulating factor improves deficient in vitro neutrophil transendothelial migration in patients with advanced liver disease. *Clin Diagn Lab Immunol* 9:433-439, 2002.
- Friedman G, Silva E, Vicent JL. Has the mortality of septic shock change with time? *Crit Care Med* 26:2078-2086, 1998.
- Fröde-Saleh TS, Calixto JB. Synergistic antiinflammatory effect of NF-kappaB inhibitors and steroidal or non steroidal antiinflammatory drugs in the pleural inflammation induced by carrageenan in mice. *Inflamm Res* 49:330-37, 2000.

Fröde TS, Medeiros YS. Myeloperoxidase and adenosine-deaminase levels in the pleural fluid leakage induced by carrageenan in the mouse model of pleurisy. *Mediators Inflamm* 10:223-227, 2001.

Furze RC, Rankin SM. Neutrophil mobilization and clearance in the bone marrow. *Immunology* 125:281-288,2008.

Fuxe K, Agnati LF, McDonald T, Locatelli V, Hökfelt T, Dalsgaard CJ, Battistini N, Yanaihara N, Mutt V, Cuello AC.

gastrin releasing peptide--bombesin-like immunoreactivity in the nervous system of the rat. Codistribution with substance P-like immunoreactive nerve terminal systems and coexistence with substance P-like immunoreactivity in dorsal root ganglion cell bodies. *Neurosci Lett* 37:17-22,1983.

Gallin JI, Snyderman R. Overview, in *Inflammation - Basic Principles and Clinical Correlates*, Lippincott Williams & Wilkins, 1999.

Genton L, Kudsk KA. Interactions between the enteric nervous system and the immune system: role of neuropeptides and nutrition. *Am J Surg* 186:253–258, 2003.

Ghatei MA, Jung RT, Stevenson JC, Hillyard CJ, Adrian TE, Lee YC, Christofides ND, Sarson DL, Mashiter K, MacIntyre I, Bloom SR. Bombesin: action on gut hormones and calcium in man. *J Clin Endocrinol Metab* 54:980-985, 1982.

- Gonzalez-Rey E, Varela N, Chorny A, Delgado M. Therapeutical approaches of vasoactive intestinal peptide as a pleiotropic immunomodulator. *Curr Pharm Des* 13:1113-1139, 2007.
- Green PG. Gastrin-releasing peptide, substance P and cytokines in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 7:111-113, 2005.
- Grimsholm OS, Rantapää-Dahlqvist S, Forsgren S. Levels of gastrin-releasing peptide and substance P in synovial fluid and serum correlate with levels of cytokines in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 7:416-426, 2005.
- Groot K, Horvath JE, Cai RZ, Schally AV. Development of a radioimmunoassay for a pseudonapeptide bombesin/GRP antagonist with antitumor activity. *Int J Pept Protein Res* 45:561-566, 1995.
- Guha M, Mackman N. LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cel Signal* 13: 85-94, 2001.
- Guo RF, Ward PA. Role of oxidants in lung injury during sepsis. *Antioxid Redox Signal* 9:1991-2002, 2007.
- Hampton MB, Kettle AJ, Winterbourn CC. Inside the neutrophil phagosome: Oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. *Blood* 92:3007–3017, 1998.
- Han J, Ulevitch RJ. Limiting inflammatory responses during activation of innate immunity. *Nat Immunol* 6:1198-1205, 2005.

- Harkness RA. The characteristic cell of acute inflammation. The polymorphonuclear neutrophil leucocyte and its biochemistry. *Molec Aspects Med* 4:191-207, 1981.
- Helen P, Panula P, Yang HY, Hervonen A, Rapoport SI. Location of substance P-, bombesin-gastrin-releasing peptide, [Met5] enkephalin- and [met5] enkephalin-Arg6-Phe7-like immunoreactivities in adult human sympathetic ganglia. *Neuroscience* 12:907-916, 1984.
- Hernanz A. Characterization and distribution of bombesin-like peptides in the rat brain and gastrointestinal tract. *Biochem Cell Biol* 68:1142-1145, 1990.
- Heumann D, Roger T. Initial responses to endotoxins and Gram-negative bacteria. *Clinica Chimica Acta* 323:59–72, 2002.
- Hill DJ, McDonald TJ. Mitogenic action of gastrin-releasing polypeptide on isolated epiphyseal growth plate chondrocytes from the ovine fetus. *Endocrinology* 130:2811-2819, 1992.
- Hollenberg SM, Dumasius A, Easington C, Colilla SA, Neumann A, Parrillo JE. Characterization of a hyperdynamic murine model of resuscitated sepsis using echocardiography. *Am J Respir Crit Care Med* 164:891-895, 2001.
- Honda K, Yanai H, Mizutani T, Negishi H, Shimada N, Suzuki N, Ohba Y, Takaoka A, Yeh WC, Taniguchi T. Role of a transductional/transcriptional processor complex involving MyD88 and IRF-7 in Toll-like receptor signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 15416-15421, 2004.

- Hopkins PA, Sriskanda S. Mammalian Toll-like receptors: to immunity and beyond. *Clin Exp Immunol* 140:395-407, 2005.
- Hotchkiss RS, Karl IE. The pathophysiology and treatment of sepsis. *New Engl J Med* 348:138-150,2003.
- Hubbard WJ, Choudhry M, Schwacha MG, Kerby JD, Rue LW 3rd, Bland KI, Chaudry IH. Cecal ligation and puncture. *Shock* 24: S52-S57, 2005.
- Huttenlocher A, Sandborg RR, Horvitz AF. Adhesion in cell migration. *Curr Opin Cell Biol* 7: 697-706, 1995.
- Janeway CA Jr. How the immune system protects the host from infection. *Microbes Infect* 3:1167-1171, 2001.
- Janeway CA Jr. Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 20:197-216 2002.
- Jin CY, Moon DO, Lee KJ, Kim MO, Lee JD, Choi YH, Park YM, Kim GY. Piceatannol attenuates lipopolysaccharide-induced NF-kappaB activation and NF-kappaB- related proinflammatory mediators in BV2 microglia. *Pharmacol Res* 54:461-67, 2006.
- Johnson JL, Moore EE, Tamura DY, Zallen G, Biffi WL, Silliman CC. Interleukin-6 augments neutrophil cytotoxic potential via selective enhancement of elastase release. *J Surg Res* 76:91-94, 1998.
- Kerfoot SM, Kubes P. Local coordination verses systemic deregulation: complexities in leukocyte recruitment revealed by local and systemic activation of TLR-4 in vivo. *J Leukoc Biol* 77: 862-867, 2005.

- Kim HJ, Evers BM, Guo Y, Banker NA, Hellmich MR, Townsend CM Jr. Bombesin-mediated AP-1 activation in a human gastric cancer (SIIA). *Surgery* 120:130-136, 1996.
- Kirkham P, Rahman I. Oxidative stress in asthma and COPD: antioxidants as a therapeutic strategy. *Pharmacol Ther* 111:476-94, 2006.
- Kroegel C, Antony VB. Immunobiology of pleural inflammation: potential implications for pathogenesis, diagnosis and therapy. *Eur Respir J* 10:2411-18, 1997.
- Laird MH, Rhee SH, Perkins DJ, Medvedev AE, Piao W, Fenton MJ, Vogel SN. TLR-4/MyD88/PI3K interactions regulate TLR-4 signaling. *J Leukoc Biol* 85:966-977, 2009.
- Larsen K, O'Hare MM, Vangsted A, Mikkelsen JD. Gastrin releasing peptide (GRP) is present in a GRP (1-27) form in anterior pituitary cells of the guinea pig. *Peptides* 10:815-818, 1989.
- Lee SW, Hong YS, Chun CM, Moon JD, Kim SJ, Jung IC, Yoon YH, Lee BA, Monn SW, Choi SH, Moon CK. Anti-inflammatory effects of IL-4 and IL-10 on human polymorphonuclear leukocytes. *J Korean Med Sci* 17:7-14, 2002.
- Lemaire I. Bombesin-related peptides modulate interleukin-1 production by alveolar macrophages. *Neuropeptides* 20:217-23, 1991.
- Lemaire I, Jones S, Khan MF. Bombesin-like peptides in alveolar macrophage: increased release in pulmonary inflammation and fibrosis. *Neuropeptides* 20:63-72, 1991.

- Lemaire S, Chouinard L, Mercier P, Day R. Bombesin-like immunoreactivity in bovine adrenal medulla. *Regul Pept* 13:133-146, 1986.
- Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffmann JA. The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 86:973-83, 1996.
- Levine L, Lucci JA, Pazdrak B, Cheng JZ, Guo YS, Townsend CM Jr, Hellmich MR. Bombesin stimulates nuclear factor κ B activation and expression of proangiogenic factors in prostate cancer cells. *Cancer Res* 63:3495-502, 2003.
- Liebow C, Crean DH, Lee MT, Kamer AR, Mang TS, Schally AV. Synergistic effects of bombesin and epidermal growth factor on cancers. *Proc Natl Acad Sci* 91:3804-3808, 1994.
- Liew FYD, Xu EK, Brint LAJ. Negative regulation of Toll-like receptor-mediated immune responses. *Nature Review Immunology* 5: 446-458, 2005.
- Logothetis C, Hoosein N. The inhibition of the paracrine progression of prostate cancer as an approach to early therapy of prostatic carcinoma. *J Cell Biochem Suppl* 16:128-134, 1992.
- Lorenz E, Mira JP, Cornish KL, Arbour NC, And Schwartz DA. A novel polymorphism in the toll-like receptor 2 gene and its potential association with staphylococcal infection. *Infect Immun* 68:6398-401, 2000.
- Mastroianni CM, Lichtner M, Mengoni F, D'Agostino C, Forcina G, D'Ettore G, Santopadre P, Vullo V. Improvement in neutrophil and monocyte function

during highly active antiretroviral treatment of HIV-1-infected patients. *AIDS* 13:883-890, 1999.

Marshall JC, Neutrophils in the pathogenesis of sepsis. *Crit Care Med* 33: S502-S505, 2005.

Matsuda N, Hattori Y. Systemic inflammatory response syndrome (SIRS): molecular pathophysiology and gene therapy. *J Pharmacol Sci* 101:189-198, 2006.

Mazzon E, Esposito E, Di Paola R, Muià C, Crisafulli C, Genovese T. Effect of tumour necrosis factor- α receptor 1 genetic deletion on carrageenan-induced acute inflammation: a comparison with etanercept. *Clin Exp Immunol* 153:136-49, 2008.

McCoy JG, Avery DD. Bombesin: potential integrative peptide for feeding and satiety. *Peptides* 11:595-607, 1990.

McDonald TJ, Jörnvall H, Nilsson G, Vagne M, Ghatei M, Bloom SR, Mutt V. Characterization of a gastrin releasing peptide from porcine non-antral gastric tissue. *Biochem Biophys Res Commun* 90:227-233, 1979.

McDonald TJ, Nilson G, Vagne M, Bloom SR, Mutt V. A gastrin-releasing peptide from the porcine non-antral gastric tissue. *Gut* 19:767-774, 1978.

McKillop JM, McCann JP, Gibbons JR, Johnston CF, Buchanan KD. Gastrin-releasing peptide in normal and neoplastic human lung: measurement and biochemical characterization. *Int J Cancer* 46:591-561, 1990.

- Medina S, Del Rio M, De la Cuadra B, Guayerbas N, De la Fuente M. Age related changes in the modulatory action of gastrin-releasing peptide, neuropeptide Y and sulfated cholecystokinin octapeptide in the proliferation of murine lymphocytes. *Neuropeptides* 33:173-79, 1999.
- Medina S, Del Rio M, Ferrandez MD, Hernanz A, De la Fuente M. Changes with age in the modulation of natural killer activity of murine leukocytes by gastrin-releasing peptide, neuropeptide Y and sulfated cholecystokinin octapeptide. *Neuropeptides* 32: 549-555, 1998 a.
- Medina S, Del Rio M, Victor VM, Hernanz A, De la Fuente M. Changes with ageing in the modulation of murine lymphocyte chemotaxis by CCK-8S, GRP and NPY. *Mech Ageing* 102:249-261, 1998 b.
- Meloni F, Bertolotti R, Corsico A, Di Fazio P, Cechettin M, Gialdroni-Grassi G. Bombesin/gastrin releasing peptide levels of peripheral mononuclear cells, monocytes and alveolar macrophages in chronic bronchitis. *Int J Tissue React* 14:195-201, 1992.
- Menegazzi M, Di Paola R, Mazzon E, Genovese T, Crisafulli C, Dal Bosco M, Zou Z, Suzuki H, Cuzzocrea S. Glycyrrhizin attenuates the development of carrageenan-induced lung injury in mice. *Pharmacol Res* 58:22-31, 2008.
- Meng G, Rutz M, Schiemann M, Metzger J, Grabiec A, Schwandner R, Lippa PB, Ebel F, Busch DH, Bauer S, Wagner H, Kirschning CJ. Antagonistic antibody prevents toll-like receptor-2-driven lethal shock-like syndromes. *J Clin Invest* 113:1473-1481, 2004.

- Minamino N, Kangawa K, Matsuo H. Neuromedin B: a novel bombesin-like peptide identified in porcine spinal cord. *Biochem Biophys Res Commun* 114:541-548, 1983.
- Monick MM, Carter AB, Robeff PK, Flaherty DM, Peterson MW, Hunninghake GW. Lipopolysaccharide activates Akt in human alveolar macrophages resulting in nuclear accumulation and transcriptional activity of beta-catenin. *J Immunol* 166: 4713-4720 2001.
- Narayan S, Guo YS, Townsend CM Jr, Singh P. Specific binding and growth effects of bombesin-related peptides on mouse colon cancer cells in vitro. *Cancer Res* 50:6772-6778, 1990.
- Nardi GM, Siqueira Junior JM, Delle Monache F, Pizzolatti MG, Ckless K, Ribeiro-do-Valle RM. Antioxidant and anti-inflammatory effects of products from *Croton celtidifolius* Bailon on carrageenan-induced pleurisy in rats. *Phytomedicine* 14:115-122, 2007.
- Nathan C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat Rev Immunol* 6:173-182, 2006.
- Nathens AB, Marshall JC. Sepsis, SIRS, and MODS: wat's in a name? *World J Surg* 20:386-391, 1996.
- Nguyen HB, Rivers EP, Abrahamian FM, Moran GJ, Abraham E, Trzeciak S, Huang DT, Osborn T, Stevens D, Talan DA. Severe sepsis and septic shock: review of the literature and emergency department management guidelines. *Ann Emerg Med* 48:28-54, 2006.

- O'Connor TM, O'Connell J, O'Brien DI, Goode T, Bredin CP, Shanahan F. The role of substance P in inflammatory disease. *J Cell Physiol* 201:167-180, 2004.
- Oh-Ishi S, Hayashi I, Hayashi M, Yamaki K, Utsunomiya I. Pharmacological demonstration of inflammatory mediators using experimental inflammatory models: rat pleurisy induced by carrageenin and phorbol myristate acetate. *Dermatologica* 179:68-71, 1989.
- Ojaniemi M, Glumoff V, Harju K, Liljeroos M, Vuori K, Hallman M. Phosphatidylinositol 3-kinase is involved in Toll-like receptor 4-mediated cytokine expression in mouse macrophages. *Eur J Immunol* 33: 597-605, 2003.
- Oliveira PG, Brenol CV, Edelweiss MI, Brenol JCT, Petronilho F, Roesler R, Dal-Pizzol F, Schwartzmann G, Xavier RM. Effects of an antagonist of the bombesin/gastrin-releasing peptide receptor on complete Freund's adjuvant-induced arthritis in rats. *Peptides* 29:1726-1731, 2008.
- Pansky A, Hildebrand P, Heim MH, Eberhard M, Kissel T, Beglinger C. Growth effects of alpha-interferon but not of bombesin or angiotensin II are mediated by activation of STAT proteins. *Eur J Clin Invest* 28:398-406, 1998.
- Panula P, Hadjiconstantinou M, Yang HY, Costa E. Immunohistochemical localization of bombesin/gastrin-releasing peptide and substance P in primary sensory neurons. *J Neurosci* 3:2021-2029, 1983.

- Parekh D, Ishizuka J, Townsend CM Jr, Haber B, Beauchamp RD, Karp G, Kim SW, Rajaraman S, Greeley G Jr, Thompson JC. Characterization of a human pancreatic carcinoid in vitro: morphology, amine and peptide storage, and secretion. *Pancreas* 9:83-90, 1994.
- Pereira MA, Sannomiva P, Leme JG. Inhibition of leukocyte chemotaxis by factor in alloxan-induced diabetic rat plasma. *Diabetes* 36:1307-1314, 1987.
- Pinski J, Yano T, Groot K, Cai RZ, Radulovic S, Schally AV. Endocrine effects of new bombesin/gastrin-releasing peptide antagonists in rats. *Am J Physiol* 263:712-717, 1992 a.
- Pinski J, Yano T, Rekasi Z, Cai RZ, Radulovic S, Schally AV. High potency of a new bombesin antagonist (RC-3095) in inhibiting serum gastrin levels; comparison of different routes of administration. *Regul Pept* 41:185-193, 1992 b.
- Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, Van Huffel C, Du X, Birdwell D, Alejos E, Silva M, Galanos C, Freudenberg M, Ricciardi-Castagnoli P, Layton B, Beutler B. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in TLR-4 gene. *Science* 282:2085-2088, 1998.
- Reddy RC, Standiford TJ. Effects of sepsis on neutrophil chemotaxis. *Current Opinion in Hematology* 17:18-24, 2010.
- Remick DG. Pathophysiology of sepsis. *Am J Pathol* 170:1435-1444, 2007.
- Rios-Santos, F, Alves-Filho JC, Souto FO, Spiller F, Freitas A, Lotufo CM, Soares MB, Dos Santos RR, Teixeira MM, Cunha FQ. Down-regulation of

CXCR2 on neutrophils in severe sepsis is mediated by inducible nitric oxide synthase-derived nitric oxide. *Am J Respir Crit Care Med* 175:490-497, 2007.

Rittirsch D, Hoesel LM, Ward PA. The disconnect between animal models of sepsis and human sepsis. *J Leukoc Biol* 81:137-143, 2007.

Rocha MJA, Oliveira GR, Farias-Corrêa PB. Neurohypophyseal hormone secretion during septic shock. In: Chen FJ (Ed.), 75-94, *New Trends in Brain Research*. New York: Nova Science Publishers, 2006.

Roesler R, Henriques JA, Schwartzmann G. Gastrin-releasing peptide receptor as a molecular target for psychiatric and neurological disorders. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 5:197-204, 2006.

Roesler R, Luft T, Oliveira SH, Farias CB, Almeida VR, Quevedo J, Dal Pizzol F, Schröder N, Izquierdo I, Schwartzmann G. Molecular mechanisms mediating gastrin-releasing peptide receptor modulation of memory consolidation in the hippocampus. *Neuropharmacology* 51:350-357, 2006.

Saleh TS, Calixto JB, Medeiros YS. Effects of anti-inflammatory drugs upon nitrate and myeloperoxidase levels in the mouse pleurisy induced by carrageenan. *Peptides* 20:949-956, 1999.

Saleh TSF, Calixto JB, Medeiros YS. Anti-inflammatory effects of theophylline, cromolyn and salbutamol in a murine model of pleurisy. *Brit. J. Pharmacol* 118:811-819, 1996.

- Saleh TSF, Calixto JB, Medeiros YS. Proinflammatory effects induced by bradykinin in a murine model of pleurisy. *Eur J Pharmacol* 331: 43-52, 1997.
- Sato S, Sugiyama M, Yamamoto M, Watanabe Y, Kawai T, Takeda K, Akira S. Toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor inducing IFN-beta (TRIF) associates with TNF receptor-associated factor 6 and TANK-binding kinase 1, and activates two distinct transcription factors, NF-kappa B and IFN-regulatory factor-3, in the Toll-like receptor signaling. *J Immunol* 171: 4304-4310, 2003.
- Schwartzmann G, DiLeone LP, Horowitz M, Schunemann D, Cancelli A, Pereira AS, Richter M, Souza F, da Rocha AB, Souza FH, Pohlmann P, De Nucci G. A phase I trial of the bombesin/gastrin-releasing peptide (BN/GRP) antagonist RC3095 in patients with advanced solid malignancies. *Invest New Drugs* 24:403-412, 2006.
- Secher T, Vasseur V, Poisson DM, Mitchell JA, Cunha FQ, Alves-Filho JC, Riffel B. Crucial role of TNF receptors 1 and 2 in the control of polymicrobial sepsis. *J Immunol* 182: 7855-7864, 2009.
- Seely AJ, Pascual JL, Christou NV. Science review: Cell membrane expression (connectivity) regulates neutrophil delivery, function and clearance. *Crit Care* 7:291-307, 2003.
- Shasby DM, McCray P. Sepsis and innate immunity. *Am J Respir Crit Care Med* 169: 144-45, 2004.

Sheridan BC, McIntyre RC Jr, Moore EE, Meldrum DR, Agrafojo J, Fullerton DA. Neutrophils mediate pulmonary vasomotor dysfunction in endotoxin-induced acute lung injury. *J Trauma* 42: 391-396, 1997.

Silva E, Pedro MA, Sogayar AC, Mohovic T, Silva CL, Janiszewski M, Cal RG, de Sousa EF, Abe TP, de Andrade J, de Matos JD, Rezende E, Assunção M, Avezum A, Rocha PC, de Matos GF, Bento AM, Corrêa AD, Vieira PC, Knobel E. Brazilian Sepsis Epidemiological Study (BASES study). *Crit Care* 8:251-260, 2004.

Sogayar AM, Machado FR, Rea-Neto A, Dornas A, Grion CM, Lobo SM, Tura BR, Silva CL, Cal RG, Beer I, Michels V, Safi J, Kayath M, Silva E. A multicentre, prospective study to evaluate costs of septic patients in Brazilian intensive care units. *Pharmacoeconomics* 26:425-434, 2008.

Spector WG. The mediation of altered capillary permeability in acute inflammation. *J Pathol Bact* 72:367-380, 1956.

Subramaniam M, Sugiyama K, Coy DH, Kong Y, Miller YE, Weller PF, Wada K, Wada E, Sunday ME. Bombesin-like peptides and mast cell responses: relevance to bronchopulmonary dysplasia? *Am J Respir Crit Care Med* 168:601-611, 2003.

Sufradini AF, Fromm RE, Parker MM, Breener M, Kovacs JA, Wesley RA, Parvilho JE. The cardiovascular response of normal humans to the administration of endotoxin. *N Engl J Med* 321:280-287, 1989.

- Sugiyama K, Muroi M, Tanamoto K. A novel TLR-4-binding peptide that inhibits LPS-induced activation of NF-KappaB and vivo toxicity. *Eur J Pharmacol* 10:152-156, 2008.
- Sunday ME, Kaplan LM, Motoyama E, Chin WW, Spindel ER. Gastrin-releasing peptide (mammalian bombesin) gene expression in health and disease. *Lab Invest* 59:5-24, 1998.
- Szabo C, Wu CC, Gross SS, Thiemermann C, Vane JR. Interleukin-1 contributes to the induction of nitric oxide synthase by endotoxin in vivo. *Eur J Pharmacol* 250:157-160, 1993.
- Tavares-Murta BM, Zaparoli M, Ferreira RB, Silva-Vergara ML, Oliveira CH, Murta EF, Ferreira SH, Cunha FQ. Failure of neutrophil chemotactic function in septic patients. *Crit Care Med* 30:1056-1061, 2002.
- Tokita K, Katsuno T, Hocart SJ, Coy DH, Llinares M, Martinez J, Jensen RT. Molecular basis for selectivity of high affinity peptide antagonists for the gastrin-releasing peptide receptor. *J Biol Chem* 276:36652-36663, 2001.
- Tracey WR, Nakane M, Kuk J, Budzik G, Klinghofer V, Harris R. The nitric oxide synthase inhibitor, l-NG-monomethylarginine, reduces carrageenan-induced pleurisy in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 273:1295-1299, 1995.
- Triantafilou M, Triantafilou K. Lipopolysaccharide recognition: CD14, TLRs and the LPS-activation cluster. *Trends Immunol* 23:301-304, 2002.
- Tsatsanis C, Androulidaki A, Alissafi T, Charalampopoulos I, Dermitzaki E, Roger T, Gravanis A, Margioris AN. Corticotropin-releasing factor and the

urocortins induce the expression of TLR-4 in macrophages via activation of the transcription factors PU.1 and AP-1. *J Immunol* 176:1869-1877, 2006.

Uffort DG, Grimm EA, Ellerhorst JA. NF-kappaB mediates mitogen-activated protein kinase pathway-dependent iNOS expression in human melanoma. *J Invest Dermatol* 129:148-54, 2009.

Vincent JL, Abraham E. The last 100 years of sepsis. *Am J Respir Crit Care Med* 173: 256-263, 2006.

Vincent JL, Korkut HA. Defining sepsis. *Clin Chest Med* 29:585-590, 2008

Xiao Q, Han X, Challis JR, Hill DJ, Spindel ER, Prasad CJ, Akagi K, McDonald TJ. Gastrin-releasing peptide-like immunoreactivity is present in human maternal and fetal placental membranes. *J Clin Endocrinol Metab* 81:3766-3773, 1996.

Wagner JG, Roth R. Neutrophil migration during endotoxemia. *J Leukoc Biol* 66: 10-24, 1999.

Warren HS. Strategies for the treatment of sepsis. *N Engl J Med* 336:952-953, 1997.

Watson S. "Bombesin" The G-protein Linked Receptor. Factsbook, Academic Press Limited, 1994.

Weighardt H, Holzmann B. Role of Toll-like receptor responses for sepsis pathogenesis. *Immunobiology* 212:715-722, 2007.

- Welbourn CR, Young Y. Endotoxin, septic shock and acute lung injury: neutrophils, macrophages and inflammatory mediators. *Br J Surg* 79:998-1003, 1992.
- Wichterman KA, Baue AE, Chaudry IH. Sepsis and septic shock-a review of laboratory models and a proposal. *J Surg Res* 29:189-201, 1980.
- Williams DL, Ha T, Li C, Kalbfleisch JH, Schweitzer J, Vogt W, Browder IW. Modulation of tissue Toll-like receptor 2 and 4 during the early phases of polymicrobial sepsis correlates with mortality. *Crit Care Med* 31:1808-1818, 2003.
- Wrann CD, Tabriz NA, Barkhausen T, Klos A, van Griensven M, Pape HC, Kendoff DO, Guo R, Ward PA, Krettek C, Riedemann NC. The phosphatidylinositol 3-kinase signaling pathway exerts protective effects during sepsis by controlling C5a-mediated activation of innate immune functions. *J Immunol* 178: 5940-5948, 2007.
- Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Hoshino K, Kaisho T, Sanjo H, Takeuchi O, Sugiyama M, Okabe M, Takeda K, And Akira, S. Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science* 301:640-643, 2003.
- Yamamoto S, Dunn CJ, Capasso F, Deporter DA, Willoughby DA, Huskisson EC. Quantitative studies on cellmediated immunity in the pleural cavity of guinea pigs. *J Pathol* 117: 65-73, 1975.
- Yasui K, Baba A. Therapeutic potential of superoxide dismutase (SOD) for resolution of inflammation. *Inflamm Res* 55:359-363, 2006.

Zanon F, Caovilla JJ, Michel RS, Cabeda EV, Ceretta DF, Luckemeyer GD, Beltrame C, Posenatto N. Sepsis na unidade de terapia intensiva: etiologias, fatores, prognósticos e mortalidade. RBTI 20:128-134, 2002.