TATIANA VICTONI

**AVALIAÇÃO DOS MECANISMOS INDUTORES DA
INFLAMAÇÃO PULMONAR DECORRENTE DA
ISQUEMIA E REPERFUSÃO INTESTINAL EM
CAMUNDONGOS GENETICAMENTE SELECIONADOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Farmacologia.

São Paulo

2008

TATIANA VICTONI

**AVALIAÇÃO DOS MECANISMOS INDUTORES DA
INFLAMAÇÃO PULMONAR DECORRENTE DA
ISQUEMIA E REPERFUSÃO INTESTINAL EM
CAMUNDONGOS GENETICAMENTE SELECIONADOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Farmacologia.

Área de concentração: Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. Wothan Tavares de Lima

São Paulo

2008

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

T-ICB
BMF
QV4
V642am
2008

Victoni, Tatiana.

Avaliação dos mecanismos indutores da inflamação pulmonar decorrente da isquemia e reperfusão intestinal (I/R) em animais geneticamente selecionados / Tatiana Victoni. -- São Paulo, 2008.

Orientador: Wothan Tavares de Lima.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Farmacologia. Área de concentração: Farmacologia. Linha de pesquisa: Inflamação pulmonar.

Versão do título para o inglês: Evaluation of the mechanisms underlying the intestinal ischemia / reperfusion induced lung inflammation in genetically selected mice.

Descritores: 1. Inflamação pulmonar 2. Isquemia intestinal 3. Neutrófilo 4. Citocinas I. Tavares de Lima, Wothan II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. III. Título.

ICB/SBIB076/2008

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Tatiana Victoni.

Título da Dissertação: Avaliação dos mecanismos indutores da inflamação pulmonar decorrente da isquemia e reperusão intestinal (I/R) em animais geneticamente selecionados.

Orientador(a): Wothan Tavares de Lima.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a ..... 25 ..... / 06 ..... / 08 .....,

☒ **Aprovado(a)**

☐ **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome: Marcelo de Franco
Instituição: Instituto Butantan

Examinador(a): Assinatura:
Nome: Nils Olon Sampaio Barros
Instituição: ICB-USP

Presidente: Assinatura:
Nome: Wothan Tavares de Lima
Instituição: ICB-USP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 – telefax : (55) (011) 3091.7438
e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº 122 nas fls. 21 do livro 2 para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do(a) Prof.(a) Dr.(a) Wothan Tavares de Lima, Coordenador(a) da Linha de Pesquisa "**Avaliação dos mecanismos indutores da inflamação pulmonar decorrente da isquemia/reperfusão intestinal em camundongos geneticamente selecionados**" do qual participou(aram) o(s) aluno(s): **Tatiana Victoni e os pesquisadores Bernado Boris Jorge Vargaftig, Ricardo Martins de Oliveira Filho, Nancy Starobinas, Olga Martinez Ibañez, Orlando Garcia Ribeiro**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA) em **29.11.2005**.

São Paulo, 30 de novembro de 2005.

Prof. Dr. Wothan Tavares de Lima
Vice-Coordenador em Exercício
CEEA - ICB/USP

Profa. Dra. Patrícia Castelucci
Secretária Suplente da CEEA

Aos meus pais e familiares pelo
incentivo e apoio constante
para a minha formação.

Obrigada!

DEDICO

AGRADECIMENTO

Ao Prof. Dr. Wothian Tvaes de Lima, pela orientação e oportunidade de trabalhar em seu laboratório. Um exemplo de dedicação à pesquisa e competência.

Ao Prof. Dr. Ricardo de Oliveira Filho pela oportunidade de conviver com um cientista brilhante.

A Prof. Dr. Boris Vargafting pela imprescindível colaboração com os meus estudos e pela contribuição neste trabalho.

Ao Prof. Dr. Orlando Ribeiro pelo gentil fornecimento dos animais das linhagens AIR_{max} e AIR_{mim}, além de sua colaboração que muito contribuiu para elaboração deste estudo.

A minha família e ao Fabiano que sempre acreditaram e torceram por mim.

A Adriana Lino Santos pela participação ativa durante todo o trabalho, por sua imensa ajuda em vários momentos dessa jornada e principalmente por sua amizade.

Aos amigos do Laboratório Gabriela, Ana Paula, Fernando, Alexandre, Tassia, Beatriz Clariana, Ana Cristina, Luana e Alessandra pela convivência, amizade e pronta disponibilidade em todos os momentos em que necessitei.

A Helory e Zilma pelo auxílio técnico, convívio e amizade.

Aos amigos do Departamento de Farmacologia do ICB-USP, pelo convívio e amizade. Gostaria muito de citá-los individualmente, mas deixo aqui meu especial agradecimento a todos vocês.

Aos funcionários do Departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas pela competência, dedicação e convívio.

*Aos funcionários da secretaria **Selma e Julieta** pela competência, dedicação e infindáveis resoluções burocráticas.*

*Aos bioteristas, **Marcos e** , pela responsabilidade, dedicação e atenção.*

*Aos amigos, **Paulo Rogerio Torres Neto e Francisco Cordebello** pela atenção nas resoluções burocráticas o meu muito obrigada.*

*Aos meus muitos **amigos da Droga Raia** pela sua alegria contagiante e pela força nesses momentos finais.*

*Ao **CNPq**, pelo indispensável auxílio financeiro para a realização deste trabalho.*

*A **Deus**, a razão primária de tanto ter a agradecer.*

RESUMO

Victoni T. Avaliação dos mecanismos indutores da inflamação pulmonar decorrente da isquemia e reperfusão intestinal (I/R) em animais geneticamente selecionados; [Dissertação]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2008.

Neste estudo caracterizamos a inflamação pulmonar aguda decorrente da I/R intestinal em camundongos geneticamente selecionados para baixa (AIR_{min}) ou alta (AIR_{max}) reatividade inflamatória aguda os quais foram obtidos por Seleção Genética Bidirecional. Paralelamente, camundongos da linhagem Balb/c foram utilizados, como referência dos parâmetros investigados. A isquemia intestinal foi induzida pela obstrução da artéria mesentérica superior (AMS) por 45 min seguida de sua desobstrução. Após 4 h de reperfusão intestinal a inflamação pulmonar foi avaliada por meio da atividade pulmonar de mieloperoxidase (MPO), número de leucócitos (no sangue, na medula óssea e no baço), permeabilidade vascular, dosagem de citocinas (IL-1 β , IL-10, IL-6 e TNF- α) e a produção de nitratos e nitritos em cultura de ex-vivo de tecido pulmonar (explante). A I/R-intestinal induziu aumento da atividade MPO (mieloperoxidase), aumento da permeabilidade vascular pulmonar e neutrofilia nas três linhagens estudadas, com maior intensidade em camundongos AIR_{max} . A celularidade da medula óssea e baço não foi afetada pela I/R intestinal nas linhagens AIR_{min} e AIR_{max} . A I/R intestinal aumentou a atividade de MPO intestinal nas linhagens Balb/c, AIR_{min} e AIR_{max} , porém este parâmetro não diferiu dentro das linhagens estudadas. Por outro lado, o intestino não desenvolveu aumento de extravasamento plasmático. O explante pulmonar de animais AIR_{max} geraram níveis significativamente elevados de nitratos e nitritos após a I/R-intestinal. A quantidade de citocinas produzidas espontaneamente pelo explante pulmonar não diferiu entre as linhagens AIR_{min} e AIR_{max} . Todavia, na vigência de estímulo secundário (lipopolissacarídeo), a produção de IL-1 β e IL-10 foi maior na linhagem AIR_{max} . A taxa de mortalidade após I/R intestinal não difere entre as linhagens AIR_{min} e AIR_{max} , todavia na linhagem AIR_{min} as mortes ocorrem mais precocemente (4h) após a I/R intestinal, em contraste aquela encontrado nos animais de AIR_{max} (12h) Concluindo, nossos dados permitem sugerir que os animais geneticamente selecionados reagem diferentemente após a I/R intestinal, de modo que os animais AIR_{min} mostram uma sensibilidade realçada (nos termos da taxa de mortalidade), e em contrapartida os animais AIR_{max} um maior reatividade (nos termos da resposta inflamatória para I/R). Contudo, nós sugerimos que as alterações genótípicas devido à seleção podem explicar uma exacerbada resposta inflamatória para I/R em camundongos AIR_{max} coexistindo com um perfil mais favorável de letalidade visto que o oposto é observado em animais de AIR_{min} .

Palavras-chave: Isquemia. Intestino. Pulmão. Neutrófilos. Explante. Inflamação. Citocinas. AIR_{max} . AIR_{min} .

ABSTRACT

Victoni T. Evaluation of the mechanisms underlying the lung inflammation following intestinal ischemia/reperfusion (I/R) in genetically selected mice [Master Thesis]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2008.

The aim of this study was to characterize the acute lung inflammation due to intestinal I/R in mice selected for high (AIR_{max}) or low (AIR_{min}) acute inflammatory response by means of bidirectional genetic selection. Balb/c mice were also used as a reference control of the parameters evaluated. Intestinal ischemia was induced by a 45-min clamping of the superior mesenteric artery; the clamping was then released and the lung inflammation was evaluated after a 4-h reperfusion period by measurements of myeloperoxidase (MPO) lung activity, leukocyte number (in blood, bone marrow and spleen), vascular permeability, cytokines (IL-1 β , IL-10, IL-6 and TNF- α) and production of nitrates and nitrites in lung tissue *ex vivo* cultures (explants). Intestinal I/R induced an increase of the lung acute inflammatory reaction as judged by the increase of MPO activity and of vascular permeability and the influx of neutrophils in every animal lineage studied, being the AIR_{max} mice the most reactive ones. However, the cellularity of the bone marrow and spleen was not affected by intestinal I/R in AIR_{max} or AIR_{min} mice. Intestinal I/R caused an increase of MPO activity in the gut of Balb/c, AIR_{max} and AIR_{min} mice, with no differences from each other. On the other hand, no intestinal plasma extravasation was noticed. Nitrites and nitrates production was higher in cultures of AIR_{max} mice lung explants after intestinal I/R. The spontaneous production of cytokines was not different among AIR_{max} and AIR_{min} lung explants, being significantly increased in AIR_{max} samples upon bacterial lipopolysaccharide (LPS) stimulation (IL-1 β e IL-10). The profile of mortality among AIR_{max} and AIR_{min} was not altered by intestinal I/R. However, the mortality rate of injured AIR_{min} mice was found as early as 4 h after intestinal I/R, in contrast with that found in AIR_{max} animals (12 h after). In conclusion, our data suggest that genetically selected AIR_{max} and AIR_{min} mice react differentially to intestinal I/R, so that AIR_{min} mice show enhanced sensitivity (in terms of mortality rate), and their AIR_{max} counterparts show enhanced responsiveness (in terms of inflammatory response to I/R). Overall, we suggest that the genotypic changes due to selection may explain why an exacerbated inflammatory response to I/R in AIR_{max} mice coexists with a more favorable profile of lethality, whereas the opposite is seen in AIR_{min} animals.

Key words: Ischemia. Intestine. Lung. Neutrophils. Explant. Inflammation. Cytokines. AIR_{max}. AIR_{min}.

LISTA DE ABREVIACES

AA: cido araquidnico

AE: azul de Evans

AIR_{max}: Alta reatividade inflamatória aguda

AIR_{min}: Baixa reatividade inflamatória aguda

BSA: albumina de soro bovino

DEMEM: meio de cultura de células proposto por Eagle e modificado por Dulbecco

FLA: fosfolipase A

HMGB-1: fator de transcrio de alta mobilidade de proteína do grupo-1

I/R: isquemia e reperfusão

ICAM: molécula de adesão intercelular

IL: Interleucina

IMOS: insuficiência múltipla de órgãos e sistemas

INF: interferem

LDH: lactato desidrogenase

L-NAME: NW-nitro-L-Arginina-Metil-Ester Cloridrato

LPS: lipopolissacarídeo

MPO: mieloperoxidase

NF-kB: fator de transcrio nuclear *k* B

NO: xido nítrico

NOS: sintase de óxido nítrico

PAF: fator de agregao plaquetária

PBS: soluo salina tamponada com fosfato

PG: prostaglandina

PMN: polimorfonuclear

PV: permeabilidade vascular

SDRA: síndrome do desconforto respiratório agudo

TXB: Tromboxana

TNF: fator de necrose tumoral

VCAM: molécula de adesão vascular

VEGF: fator de crescimento endotelial vascular

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Efeito da I/R intestinal sobre a atividade pulmonar e intestinal de MPO de animais Balb/c, AIR _{min} e AIR _{max}	33
Figura 2. Efeito da I/R intestinal sobre a permeabilidade vascular (PV) no parênquima pulmonar e no intestino de camundongos Balb/c, AIR _{max} e AIR _{min}	35
Figura 3. Efeito da I/R intestinal sobre o número de leucócitos circulantes nas linhagens Balb/cAIR _{max} e AIR _{min}	37
Figura 4. Efeito da I/R intestinal sobre número total de células da medula óssea.....	38
Figura 5. Efeito da I/R intestinal sobre número total de células presentes no baço de animais Balb/c, AIR _{max} e AIR _{min}	39
Figura 6. Produção ex vivo de IL-1 β em explantes de tecido pulmonar de camundongos Balb/c, AIR _{min} e AIR _{max}	41
Figura 7. Produção ex vivo de IL-1 β em explantes de tecido pulmonar de camundongos Balb/c, AIR _{min} e AIR _{max}	42
Figura 8. Produção ex vivo de IL-10 em explantes de tecido pulmonar de camundongos Balb/c, e AIR _{min} e AIR _{max}	44
Figura 9. Produção ex vivo de IL-10 em explantes de tecido pulmonar de camundongos Balb/c, AIR _{min} e AIR _{max}	45
Figura 10. Produção ex vivo de IL-6 em explantes de tecido pulmonar de camundongos Balb/c, AIR _{min} e AIR _{max}	47
Figura 11. Produção ex vivo de IL-6 em explantes de tecido pulmonar de camundongos Balb/c, AIR _{min} e AIR _{max}	48
Figura 12. Produção ex vivo de TNF- α em explantes de tecido pulmonar de camundongos Balb/c, e AIR _{min} e AIR _{max}	50
Figura 13. Produção ex vivo TNF- α em explantes de tecido pulmonar de camundongos Balb/c, AIR _{min} e AIR _{max}	51
Figura 14. Efeito da I/R intestinal sobre a produção de nitritos em explante pulmonar de camundongos Balb/c, AIR _{max} e AIR _{min}	53
Figura 15. Efeito da I/R intestinal sobre a produção de nitritos em explante pulmonar de camundongos Balb/c, AIR _{max}	54
Figura 16. Efeito da isquemia e reperfusão intestinal na sobrevivência dos animais Balb/c, AIR _{min} e AIR _{max}	55
Esquema 1 Delineamento experimental	26
Tabela 1. Mediadores inflamatórios envolvidos na SDRA e suas atividades.....	23

LISTA DE REAGENTES

Cultilab: Soro Bovino Fetal (SBF); São Paulo-SP, Brasil.

Fort Dodge: Cloridrato de Cetamina; Campinas-SP, Brasil.

Köng: Cloridrato de Xilazina; São Paulo-SP, Brasil.

LabSynth: PBS (cloreto de sódio, fosfato de potássio dibásico, fosfato de potássio monobásico) São Paulo-SP, Brasil.

Merck: Azul de Evans, EDTA, Hidrato de Cloral, Água Oxigenada (30 %), Metanol Rio de Janeiro –RJ, Brasil.

Roche: Liqueimine® (heparina sódica); São Paulo-SP, Brasil.

Schering-Plough: Garamicina® (sulfato de gentamicina) Rio de Janeiro –RJ, Brasil.

Sigma: Brometo de hexadecil-trimethyl-amônio, Albumina Bovina (fração V), Azida Sódica, DEMEM, Orto-dianisidina, L-NAME, RPMI 1640, Tripsina, L-glutamina. São Paulo-SP, Brasil.

Vetec: Formamida; Rio de Janeiro –RJ, Brasil.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Inflamação e seu controle.....	14
1.2 Camundongos geneticamente selecionados para resposta inflamatória aguda.....	15
1.3 Isquemia e Reperfusão intestinal.....	18
1.4 Mediadores da inflamação e Isquemia /Reperfusão intestinal.....	19
1.5 Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo (SDRA).....	22

2 JUSTIFICATIVA.....24

3 OBJETIVO.....25

4 MATERIAIS E METODOS.....26

4.1 Delineamento experimental 26

4.2 Animais 27

4.3 Indução da isquemia e reperfusão intestinal (I/R intestinal).....27

4.4 Determinação da atividade de mieloperoxidase (MPO) 27

3.4.1 Ensaio da atividade pulmonar de MPO.....28

4.5 Estudo do aumento de permeabilidade vascular.....28

4.6 Determinação do número de leucócitos.....29

4.6.1 Determinação do número de leucócitos no sangue 29

4.6.1 Determinação do número de leucócitos na medula óssea 29

4.6.2 Determinação número de leucócitos no baço.....29

4.8 Cultura de tecido pulmonar isolado (explante) e estímulo com LPS 30

4.7.1 Quantificação de mediadores inflamatórios.....30

4.7.2 Citocinas.....30

4.7.3 Determinação de Nitratos e Nitritos 31

4.8 Análise estatística	31
5 RESULTADOS	32
5.1 Inflamação pulmonar e I/R intestinal	32
5.2 Efeito da I/R intestinal sobre o extravasamento protéico	34
5.3 Influência da I/R intestinal sobre o número de leucócitos	36
5.3.1 <i>Circulantes</i>	37
5.3.3 <i>Medula óssea</i>	38
5.3.3 <i>Baço</i>	39
5.4 Mediadores inflamatórios gerados em explante pulmonar	40
5.4.3 <i>Interleucinas (IL-1β, IL-6, IL-10, TNF-α)</i>	40
5.4.4 <i>Quantificação de nitratos e nitritos</i>	52
5.5 Curva de sobrevivência	56
6 DISCUSSÃO	57
7 CONCLUSÕES	65
REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS	66

1 INTRODUÇÃO

1.1 Inflamação e seu controle

A exposição de indivíduos a estímulos nocivos determina a reorganização funcional de órgãos e sistemas, cuja consequência pode ser o desencadeamento da resposta inflamatória. Esta resposta é, em sua essência, estereotipada. Nesse contexto, admite-se que seja associada mais à espécie ou ao indivíduo, do que propriamente à natureza do estímulo. Desta constatação surge o conceito de que o organismo mobiliza, na vigência do estímulo agressor, substâncias endógenas que medeiam à resposta inflamatória. Dessa forma, observam-se eventos vasculares e celulares que em conjunto determinam o acúmulo de leucócitos no sítio da inflamação. Nessas condições o organismo aciona mecanismos reguladores de maneira a dimensionar a resposta inflamatória, ofertando base para que o processo de reparo e manutenção da homeostasia seja construído (Lawrence *et al.*, 2002; Tracey *et al.*, 2002; Janeway 2001)

A inflamação é um evento temporalmente organizado e regulado. O controle do processo inflamatório decorre de um fluxo de informação no qual o organismo necessita detectar se determinado estímulo se associa à lesão, infecção ou ambos. Com este nível de informação admite-se que ondas de mediadores são liberadas e concorrem para a resolução (Serhan *et al.*, 2007). Muito embora a resposta inflamatória se desenvolva no sentido de alcançar o reparo tecidual, a perda da coordenação de seus eventos pode causar lesão tecidual persistente. Assim, como dito, os mecanismos que governam a indução da resposta inflamatória agem de forma a identificar se a lesão é ou não acompanhada de infecção. Quando ambos os fenômenos coexistem, é preciso que o organismo rapidamente reaja acionando sistemas limitantes da infecção. Portanto, o curso da inflamação deve ter sinalização no sentido de freá-lo em momentos adequados. A inflamação se auto-controla por meio de verificação constante dos fenômenos que estão em andamento, de maneira a evitar falhas na busca da homeostasia. De fato, cada leucócito que atinge o foco inflamatório somente se torna apto a liberar mediadores pró-inflamatórios após a sua integração com o microambiente. Assim, a geração de mediadores lipídicos com propriedades antiinflamatórias tais como lipoxinas, resolvinas, alguns prostanóides e prostaglandinas ciclopentenonas são controladores da magnitude da inflamação (Serhan *et al.*, 2007; Maderna e Godson, 2005; Maslinkad e Gajwski, 1998). De interesse é notar que o perfil temporal de geração de mediadores, revela que a PGE₂, por exemplo, pode exercer atividade pró ou antiinflamatória (Fukunaga, *et al.*, 2005; Maslinska, 1998). Existem mecanismos que desaceleram o processo de recrutamento e ativação de neutrófilos e o desvia para o acúmulo de

mononucleares no sítio inflamatório. Tais mecanismos, denominados de *catabasis* têm recebido especial atenção nos estudos sobre o controle da inflamação (Bannenberg *et al.*, 2005).

O controle endógeno da inflamação pode ser obtido por meio da redução da síntese e/ou dos efeitos dos mediadores inflamatórios. Na presença de afecções graves, como a observada na inflamação sistêmica, a exacerbação da liberação das citocinas pró-inflamatórias associadas à falha dos mecanismos de defesa poderia ser responsável pela lesão microvascular e de diversos órgãos. Barnes *et al.*, (2000) discute a existência de mecanismos endógenos controladores da inflamação. Ainda, fenótipos inflamatórios observados estão associados a um padrão genético (*background*), idade, sexo e condições microambientais do organismo (microbiota intestinal).

Portanto a constituição genética do hospedeiro pode influenciar na resposta inflamatória, neste sentido o estudo dessa resposta em animais geneticamente selecionados para alta e baixa reatividade inflamatória contribui para o entendimento dos mecanismos associados ao controle da inflamação.

1.2 Camundongos geneticamente selecionados para resposta inflamatória aguda

As linhagens de alta (AIR_{max}) ou baixa (AIR_{min}) reatividade inflamatória aguda foram obtidas por Seleção Genética Bidirecional a partir de uma população geneticamente heterogênea (F0), constituída por cruzamentos equilibrados entre oito linhagens de camundongos isogênicos (A/J, BALB/cJ, C57BL/6J, CBA/J, DBA/2J, P/J, SJL/J e SWR/J), híbridos F1 e segregantes F2, de acordo com o esquema a seguir:

A partir da população F0, foram selecionados animais que apresentaram alta ou baixa reatividade inflamatória aguda (AIR), segundo o número de leucócitos infiltrados e o teor de

proteínas extravasadas em resposta à injeção subcutânea de Biogel no dorso dos animais. O Biogel é um agente flogístico, quimicamente inerte e não imunogênico (Stiffel *et al.*, 1990). Os acasalamentos de animais escolhidos nos extremos de resposta máxima (AIR_{max}) ou mínima (AIR_{min}), foram repetidos em gerações consecutivas, até ser atingido o limite máximo de separação entre as duas linhagens quando o limite da resposta a seleção é alcançada considera-se que estes genes relacionados aos caracteres selecionadores fixaram-se em homozigose em cada linhagem, qual foi detectado ao redor da vigésima geração de acasalamentos seletivos. Observou-se conservação dos fenótipos extremos nas gerações posteriores, mantendo-se entretanto, um fundo genético heterogêneo (Ibañez *et al.*, 1992).

Durante o processo de seleção houve aumento progressivo da diferença fenotípica entre as duas linhagens, que permitiram indicar que na AIR este caráter é quantitativamente regulado. Além disso esta regulação ocorre pela interação aditiva de vários genes, que segregam independentemente, e cujos alelos para efeito de máxima e de mínima reatividade inflamatória foram acumulados progressivamente durante o processo de seleção. Utilizados métodos de genética quantitativa chegou-se a uma estimativa de participação de 9 a 12 loci gênicos independentes (Biozzi, 1998, Ibañez *et al.*, 1992,).

A diferença entre as duas linhagens no número médio de leucócitos migrados ao sítio de injeção do Biogel é de aproximadamente 20 vezes a favor da AIR_{max} , sendo os neutrófilos as células predominantes no exsudato inflamatório. Esta diferença é um fenômeno geral que afeta todos os tecidos vascularizados estudados em resposta aos vários agentes flogísticos utilizados, tais como carragenina, zimosan e bactérias vivas ou inativas (Ibañez *et al.*, 1992). Admite-se que o maior número de neutrófilos encontrado no exsudato inflamatório dos camundongos AIR_{max} é decorrente de três fatores: 1) maior capacidade funcional da medula óssea em produzir neutrófilos maduros; 2) maior produção de fatores quimiotáticos pelas células residentes ou infiltrantes após o estímulo com Biogel e 3) maior resistência a apoptose das células encontradas no exsudato (Ribeiro *et al.*, 2003).

A resposta imunológica específica dos camundongos AIR_{max} e AIR_{min} parece não ter sido afetada pelo processo seletivo, uma vez que estas linhagens produzem níveis equivalentes de anticorpos após o estímulo contra antígenos naturais complexos (eritrócitos, proteínas heterólogas e bactérias inativadas). Igualmente a reação de hipersensibilidade tardia a eritrócitos ou a *Salmonella typhimurium* foram idênticas nas duas linhagens. Por outro lado, a linhagem AIR_{max} é mais resistente do que AIR_{min} à infecção por *Salmonella typhimurium* e por *Listeria* dos monocytogenes. De fato estudos de dose letal 50% (DL_{50}) mostraram que a DL_{50} é 1000 e 100 vezes, respectivamente, maior para camundongos AIR_{max} . Disto resulta a indicação de que esta

linhagem é significativamente mais resistente a infecções por patógenos intracelulares do que a linhagem AIR_{min}. Admite-se que esta maior resistência dos AIR_{max} esta diretamente relacionada à sua capacidade de controlar o crescimento bacteriano no baço, a resposta inflamatória local e a produção de citocinas (Araújo *et al.*, 1998). Dados indicam que nessas linhagens existem diferenças significativas nos mecanismos inflamatórios e imunológicos que compõem o desenvolvimento de doenças auto-imunes. Ainda animais AIR_{max} são mais susceptíveis a artrite, na qual a deficiência de alelos associados ao Slc11a1 (gen relacionado ao transporte de íons de neutrófilos e macrófagos interferindo na sua ativação) está envolvida com a maior/menor incidência de artrite (Peters *et al.*, 2007; Vigar *et al.*, 2000). Ainda estudos do controle genético da inflamação revelam que a linhagem AIR_{max} é mais sensível do que a linhagem AIR_{min} aos efeitos tóxicos do veneno de jararaca, demonstrando uma significativa diferença entre as linhagens em termos de reação inflamatória local. Estes resultados demonstram que fatores genéticos selecionados nas linhagens AIR_{max} e AIR_{min} interferem no controle da reação inflamatório local (Carneiro *et al.*, 2002).

Com respeito ao pulmão, os estudos utilizando estas linhagens indicam que a carcinogênese pulmonar induzida por uretana também discriminou estas duas linhagens. O tratamento com uretana causou, nos animais AIR_{min}, múltiplos focos (4 a 16 por camundongo) a partir do 40º dia após o tratamento. Os focos foram caracterizados histopatologicamente como adenocarcinomas. Por outro lado, os camundongos da linhagem AIR_{max} mostraram-se altamente resistentes a carcinogênese com incidência de 7% (1 em 15 camundongos). Além disso os focos observados eram de menor magnitude aos 100 dias de tratamento e com focos pequenos. De forma geral pôde-se observar Uma associação inversa entre os fenótipos de susceptibilidade a tumorigênese pulmonar e de intensidade da resposta inflamatória aguda foi identificada

1.3 Isquemia e reperfusão intestinal

Conceitualmente, isquemia é a redução do fluxo sanguíneo, usualmente decorrente de obstrução mecânica no sistema arterial. Todavia a isquemia pode ser associada pela queda grave da pressão arterial ou ainda hemorragia. Uma vez instalada, causa diversas alterações do metabolismo, as quais resultam na redução de reservas energéticas, acúmulo de metabólitos tóxicos e eventualmente necrose tecidual (Scarabelli *et al.*, 2002; Sun *et al.*, 1998).

A *reperfusão* tecidual é situação onde o suprimento sanguíneo interrompido pela isquemia é restaurado. Acredita-se que produtos tóxicos gerados durante a isquemia sejam, na vigência da reperfusão, removidos e possam ao ter acesso à circulação, promover importantes alterações no estado funcional do organismo como um todo. De fato, as consequências da isquemia e reperfusão intestinal (I/R- intestinal) não são restritas ao intestino e envolvem a indução de lesão tecidual em órgãos distantes (Sirotković-Skerlev *et al.*, 2006; Berthiaume *et al.*, 1999), onde aquelas no pulmão e a falência múltipla dos órgãos, ocupam lugar de destaque (Halldorsson *et al.*, 2000).

Sob o ponto de vista de grave lesão (geralmente de origem violenta ou acidental) o trauma causa profundas alterações no estado funcional de diversos órgãos, podendo culminar em insuficiência múltiplas de órgãos (IMOS) e sistemas (Huang *et al.*, 1998). Dentre as consequências do trauma o choque hemorrágico traumático é potencial indutor de IMOS. Além do trauma hemorrágico, eventos onde há redução do fluxo sanguíneo territorial, são igualmente indutores de isquemia. Dentre eles destacam-se os de origem funcional (espasmo vascular e hipotensão) e os de origem mecânica (compressão vascular, distensão vascular e diminuição da parede vascular). A condição isquêmica também se desenvolve em quadros clínicos como infarto agudo do miocárdio, acidentes vasculares cerebrais, trombose e embolismo, bem como transplantes de órgãos e tecidos e em manobras cirúrgicas (Maxwell e Lip, 1997).

A inflamação sistêmica causada pela I/R-intestinal caracteriza-se pela geração, em quantidades apreciáveis de citocinas pró-inflamatórias tais como o TNF α , IL-1- β , IL-6, IL-8 e o INF- γ . De forma geral, os efeitos dessas citocinas se relacionam com o aumento da expressão de moléculas de adesão, recrutamento e ativação de células inflamatórias (notadamente neutrófilos), lesão microvascular, aumento do extravasamento plasmático (Hildebrand *et al.*, 2005), que em conjunto contribuem para a disfunção de diversos órgãos (Malangoni *et al.*, 1990). Apesar da resolução da inflamação ser fundamental para integridade do organismo, nosso conhecimento sobre os mecanismos endógenos que governam a resolução natural da resposta do hospedeiro ao

estímulo inflamatório ainda é limitado. Estudos da década de 50 e 60 observaram a existência de mediadores endógenos com propriedade antiinflamatória tais como adrenalina, noradrenalina, serotonina (Spector *et al.*, 1965; Spector e Willoughby, 1961; Spector e Willoughby, 1960) e AMPc (Ottonello *et al.*, 1995). Todavia, uns dos mais potentes agentes antiinflamatórios endógenos são os glicocorticóides (Oshima *et al.*, 2008). Recentes estudos demonstraram a existência de dois grupos de mediadores lipídicos (lipoxinas e prostaglandinas ciclopentenonas) cujas propriedades antiinflamatórias estão bem documentadas (Serhan *et al.*, 2008; Haworth *et al.*, 2007; Lawrence *et al.*, 2002; Levi *et al.*, 2001). Além disso, existem indicações recentes (Serhan *et al.*, 2007) sobre as ações moduladoras das proresolvenias (resolvinas e protectinas). Assim, é razoável supor que mecanismos sejam acionados durante, a I/R intestinal, e representem adaptação estereotipada de maneira a compor a resolução da inflamação. Desta forma, a magnitude da resposta inflamatória após a I/R-intestinal poderia ser resultante vetorial de forças pro e antiinflamatórias geradas. Nesse sentido, a compreensão dos mecanismos que governam estas resultantes moduladores modulando o recrutamento e a ativação (local e a distância) dos neutrófilos e a geração de mediadores pode contribuir para o controle terapêutico dos sítios afetados pela I/R- intestinal. Como mencionado pulmão é um dos órgão afetado pela I/R-intestinal. De fato uma das mais importantes consequências sistêmicas da reperfusão intestinal é o desenvolvimento de lesão pulmonar aguda, a qual em sua forma mais grave determina a síndrome do desconforto respiratório agudo (Uchida *et al.*, 2008; Gandía Martínez *et al.*, 2007; Soeren *et al.*, 2000).

1.4 Mediadores Inflamatórios e I/R intestinal

A magnitude da inflamação sistêmica durante o quadro de I/R-intestinal depende da geração de diversos mediadores. Entre eles a IL-1 β , TNF- α , IL-10, IL-6 e NO (Cavriani *et al.*, 2005; Marchant *et al.*, 1995; Pinsky *et al.*, 1993; Parrilo, *et al.*, 1990), eicosanóides (Mangino *et al.*, 1989) e o PAF (Zhengwu *et al.*, 1999) ocupam lugar de destaque. Existem ainda dados indicando a participação da fosfolipase A₂ (FLA₂) (Koike *et al.*, 2000), endotelina (Anadol *et al.*, 1998) e do sistema complemento (Ikai *et al.*, 1996) na indução e manutenção do quadro inflamatório. Como dito os mediadores inflamatórios causam alterações funcionais no local onde a I/R- intestinal foi desencadeada e também em sítios distantes como, por exemplo, no pulmão, fígado e rim (Yamagashi *et al.*, 2002; Koksoy *et al.*, 2000; Rothenbach *et al.*, 1997). Dentre seus efeitos destacam-se o aumento da expressão de moléculas de adesão, recrutamento de células inflamatórias (neutrófilos, eosinófilos), lesão de células endoteliais e aumento do extravasamento

plasmático. Em conjunto essas alterações contribuem para a disfunção funcional de diversos órgãos (McGuire *et al.*, 2001; Malangoni *et al.*, 1990).

Além dos seus efeitos diretos sobre a atividade funcional celular, esses mediadores também modulam a resposta inflamatória induzindo a geração de outros mediadores, tais como o PAF, o NO, prostanóides e leucotrienos (Honda *et al.*, 2002). Gogos *et al.* (2000), avaliando o perfil plasmático de citocinas inflamatórias e antiinflamatórias em pacientes portadores de sepsis, não observaram diferenças significativas entre os níveis séricos de IL-1 β , IL-6, IL-1ra, TNF- α que pudessem justificar o índice de mortalidade observado naqueles pacientes. Estes autores postulam que a IL-10 exerce efeito antiinflamatório que se relaciona com a gravidade da inflamação sistêmica. Além disso, a relação entre os níveis circulantes de IL-10 e os de TNF- α está associada com a gravidade da sepsis e à morte dos pacientes. De acordo com os autores esses parâmetros podem ser, juntos a outros, indicativos da gravidade da inflamação sistêmica.

Recentes estudos revelam que a IL-6 presente no soro de pacientes pode ser indicador de gravidade e sobrevida de pacientes portadores de pneumonia (Schefold *et al.*, 2008). Além disso dados do nosso grupo sugerem que durante a isquemia intestinal existem mecanismos endógenos que regulam negativamente a geração de IL-6 (Breithaupt-faloppa *et al.*, 2008).

Com respeito ao TNF- α , Esposito *et al.* (2007) observaram que animais *knockout* para o receptor R1 de TNF- α ou tratados previamente a I/R-intestinal com Etanercept® (proteína solúvel que se liga ao TNF- α neutralizando sua ação), reduziram o infiltrado de neutrófilos no intestino. Observações semelhantes foram descritas por Yamamoto *et al.* (2001), com o uso de inibidor de síntese de TNF- α , o composto FR167653. Além disso, Yao *et al.* (1996), observaram elevados níveis de TNF- α no sistema porta e na circulação sistêmica de animais expostos a I/R intestinal. Gaines *et al.* (1999) mostraram que a administração de receptores solúveis para TNF- α reduz a lesão microvascular de animais submetidos a I/R do membro posterior. Todavia o recrutamento pulmonar de neutrófilos não é alterado, sugerindo a existência de mecanismos adicionais responsáveis pela lesão e infiltração pulmonar causada pela I/R no músculo esquelético.

Os eicosanóides e o PAF modulam as alterações locais e sistêmicas observados na I/R intestinal. Campbell e Blikslager (2000) observaram que o bloqueio da síntese de prostanóides previne a lesão intestinal desencadeada pela I/R-intestinal. Wanner *et al.* (1998), demonstraram que a liberação de TNF- α durante a isquemia e reperusão hepática é mediada por prostanóides. Turnage *et al.* (1997), detectaram a liberação de quantidades apreciáveis de TXA₂ em pulmão isolado de animais submetidos a I/R-intestinal. Níveis de PGE₂ também estão elevados no plasma e no pulmão de animais submetidos a I/R-intestinal (Turnage *et al.*, 1997). Ainda o

bloqueio dos receptores do PAF reduz a liberação de TXB_2 , PGI_2 e $\text{PGF}2\alpha$, sugerindo a interação do PAF com prostanóides no choque causado pela I/R- intestinal (Filep *et al.*, 1991). Aliás, o PAF causando agregação plaquetária, adesão de neutrófilos e aumento de permeabilidade vascular se associa à lesão tecidual no pulmão e no intestino causada pela I/R- intestinal (Souza *et al.*, 2003).

O óxido nítrico (NO) também está envolvido com as alterações locais e sistêmicas decorrentes da I/R-intestinal. De fato, o NO exerce ação pró-inflamatória (Ialenti *et al.*, 1992; Miura *et al.*, 1996) e antiinflamatória (Kubes e Granger, 1992; Poss *et al.*, 1995; Guidot *et al.*, 1995). No contexto de sua ação pró-lesiva, a geração de peroxinitrito, resultante da combinação do NO de origem endotelial com superóxido gerado por neutrófilos ativados é um dos mais relevantes exemplos (Eiserich, 1998). Seus efeitos citotóxicos são decorrentes da inativação de canais de cálcio bem como inibição da respiração mitocondrial (Liu *et al.*, 1998).

Em contraste, a prevenção da agregação plaquetária (Radomsky *et al.*, 1990) e de neutrófilos (Kubes *et al.*, 1991) e a capacidade de remover radicais livres (Iwata *et al.*, 1998) estão associados aos possíveis mecanismos responsáveis pelos seus efeitos protetores da mucosa do trato gastrointestinal em modelos experimentais de I/R- intestinal (Kim H e Kim K, 2001). Terada *et al.* (1996), observaram efeito protetor do NO em modelo de I/R-intestinal visto que o tratamento dos animais com inibidor de sua síntese (L-NAME) aumenta o influxo de neutrófilos para o pulmão. Ainda, no contexto da isquemia e reperfusão intestinal, Ward *et al.* (2000), propõem que durante o período de reperfusão intestinal, há declínio da atividade da sintase de NO constitutiva em paralelo a um atraso na atividade da sintase de NO indutível. Como resultado se observa lesão tecidual e pulmonar. Ainda, de acordo com esses autores, com o transcorrer do período de reperfusão intestinal, a atividade de sintase de NO indutível se eleva com conseqüente geração de NO, cujos efeitos se associam mais à promoção da recuperação intestinal e pulmonar do que com a sua lesão. Estudos sobre a participação do NO na lesão pulmonar causada pela I/R-intestinal em ratos, mostrou que a sintase de NO constitutiva é fundamental para a manutenção do animal. De fato o seu bloqueio causou alta taxa de mortalidade em animais submetidos a I/R- intestinal, portanto, a perda do balanço entre as atividades das sintases de NO (cNOS e iNOS) pode ser sugerida como uma das causas da disfunção pulmonar (Cavriani *et al.*, 2004). Vale lembrar que estudos subseqüentes revelaram que o NO e o $\text{TNF-}\alpha$ presentes na linfa modulam a inflamação pulmonar (Cavriani *et al.*, 2005) e que o NO pulmonar medeia a hiporreatividade brônquica em modelo de I/R- intestinal (Coelho *et al.*, 2007).

1.5 Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo (SDRA)

A SDRA é uma síndrome clínica grave caracterizada por lesão pulmonar aguda decorrente de intensa inflamação pulmonar onde há hipoxemia grave (Bernard *et al.*, 1999; Artigas *et al.*, 1999). Em termos de diagnóstico, a SDRA representa a forma mais grave da lesão pulmonar aguda, e se caracteriza pela relação $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ igual ou inferior a 200 mmHg. Em essência, os mecanismos subjacentes ao desencadeamento da SDRA estão circunscritos à lesão do epitélio alveolar e do endotélio capilar. Os pulmões são particularmente vulneráveis a lesões inflamatórias, porque os mediadores são liberados na circulação e os pulmões recebem a totalidade do débito cardíaco. Como consequência, neutrófilos são, atraídos, tornado-se ativados, liberando mediadores inflamatórios, que lesam diretamente o epitélio alveolar e o endotélio vascular propagando o processo inflamatório. Ainda a SDRA pode ser acompanhada de manifestações sistêmicas e falência de outros órgãos, incluindo o sistema nervoso central, rins, fígado, sistema hematopoiético e cardiovascular. Admite-se que esta síndrome seja o principal componente da falência múltipla dos órgãos e sistemas, observada em situações como, sepsis, choque hemorrágico, pancreatite aguda, trauma e na I/R-intestinal. A lesão do epitélio capilar pode ocorrer por diferentes mediadores inflamatórios. Recentes estudos têm mostrado que vários mediadores inflamatórios têm um papel chave na patogenia da SDRA. A tabela apresentada na página seguinte sintetiza alguns dos mediadores inflamatórios que participam da SDRA.

Tabela 1. Mediadores inflamatórios envolvidos na SDRA e suas atividades

Mediadores inflamatórios	Atividade
TNF- α	Pró-inflamatória; ativação de neutrófilos.
IL-1 β	Pró-inflamatória; ativação de neutrófilos.
IL-6	Ativação/crescimento de leucócitos; proliferação de células mielóides progenitoras; resposta de fase aguda.
IL-10	Antiinflamatória; inibe liberação de citocinas pró-inflamatórias.
TGF- β	Resolução do processo lesivo tecidual; antiinflamatória.
GM-CSF	Defesa do hospedeiro; crescimento de componentes da hematopoese.
PAF	Ativação de plaquetas, neutrófilos; quimiotaxia.
ICAM-1	Adesão de neutrófilos.
C5a	Quimioatração de neutrófilos; efeito dual (pró/antiinflamatório).
Substância P	Pró-inflamatório.
Quimiocinas	Ativação de leucócitos e quimiotaxia
VEGF	Atividade funcional de células endoteliais; angiogênese, permeabilidade vascular.
IGF-I	Fator de crescimento derivado de macrófagos; pro-fibrótico.
KGF	Fator de crescimento epitelial; reparo pulmonar
Espécies reativas de oxigênio	Modulação do tônus vascular, ação antimicrobiana.

2 JUSTIFICATIVA

Tomando os dados em conjunto e considerando que SDRA é caracterizada por hipoxemia grave acompanhada de acúmulo de neutrófilos e extravasamento de proteínas, é de interesse estudar a lesão pulmonar aguda decorrente da I/R intestinal nas linhagens AIR_{max} e AIR_{mim}, haja vista que a base o fenotípico escolhido para a seleção destas foi a resposta inflamatória aguda.

3 OBJETIVO

- a) Caracterizar a inflamação pulmonar aguda decorrente da I/R intestinal em camundongos das linhagens AIR_{max} e AIR_{min}. A linhagem Balb/c foi utilizada como controle por ser uma das linhagem de referencia na formação da população F0 inicial.
- b) Investigar as repercussões sistêmicas da I/R intestinal notadamente sobre o perfil de leucócitos circulantes bem como no número total de células da medula óssea e do baço desses animais.
- c) Quantificar mediadores inflamatórios gerados pelo pulmão após a I/R intestinal.
- d) Avaliar a influência da I/R intestinal sobre a geração pulmonar de mediadores inflamatórios em decorrência de um segundo estímulo inflamatório pulmonar local.

4 MATERIAL E METODOS

4.1 Delineamento experimental

Esquema 1. Delineamento dos experimentos realizados. Os animais das linhagens Balb/c AIR_{min} e AIR_{max} foram submetidos a isquemia de 45 minutos seguida da reperusão de 4h, a seguir os parâmetros da atividade de MPO , permeabilidade vascular , contagem de leucócitos , explante pulmonar e proporção de sobrevivência foram avaliados.

4.2 Animais

Foram utilizados camundongos machos geneticamente selecionados para alta ou baixa reatividade inflamatória aguda, AIR_{max} e AIR_{min} (com 8 semanas de idade), provenientes do Biotério do Instituto Butantan e camundongos machos Balb/c provenientes do Biotério do Departamento Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) da Universidade de São Paulo (USP).

Os animais foram mantidos em condições de temperatura e umidade controladas e ciclo claro-escuro de 12 h, iniciando às 6 h. Os animais foram mantidos em suas gaiolas moradias (6/gaiola) com livre acesso à água e alimentação. Os procedimentos experimentais realizados foram conduzidos com a aprovação da Comissão de Ética em Experimentação Animal do ICB/USP (protocolo N° 122/05).

4.3 Indução da isquemia e reperfusão intestinal (I/R intestinal)

Os animais foram anestesiados por via intraperitonal com Quetamina/Xilazina (20 mg/kg –100 mg/kg) e após laparotomia mediana e desvicerização a isquemia intestinal foi induzida pelo pinçamento da artéria mesentérica superior por 45 min. O pinçamento foi realizado com pinça vascular de micro-cirurgia “Vascu satt” n° 1001-531, (Scalan Internat, Minn 55107, USA). Durante o período de 45 min da isquemia a incisão abdominal foi coberta com um plástico transparente para minimizar perdas de líquido e calor. Decorrido o tempo desejado de isquemia, a pinça vascular foi retirada e a incisão mediana fechada com sutura contínua com fio de náilon monofilamentar. Após 4 h de reperfusão intestinal os animais foram novamente anestesiados e mortos por dessangramento pela aorta abdominal. Um outro grupo constituído de animais não manipulados (basal) e o grupo falsamente manipulados, (falso-operado), onde a laparotomia mediana e a desvicerização foram realizadas porém a isquemia não foi induzida foram incorporados aos estudos.

4.4 Determinação da atividade de mieloperoxidase (MPO)

Decorrido o tempo desejado da I/R-intestinal (ver item 3.2) os animais foram anestesiados com excesso de Quetamina/Xilazina e dessangrados pela secção da aorta abdominal. A cavidade torácica foi aberta e o leito vascular pulmonar perfundido com solução

salina tamponada com fosfatos (PBS), heparinizado em fluxo de 10 ml/min através de uma cânula inserida na artéria pulmonar. O tecido pulmonar e intestinal foram coletados e lavados com PBS e seco em papel de filtro. Em seguida cada amostra foi colocada em tubos plásticos contendo 1 ml de brometo de hexa trimetil amonio (HTAB, 0,5%), e homogeneizadas em Politron (Brinckman) durante 40 s. As amostras foram centrifugadas a 25.000 x g durante 15 min a 4°C. O sobrenadante obtido foi utilizado para determinar a atividade de MPO.

4.4.1 Ensaio da atividade pulmonar e intestinal de MPO

O ensaio de atividade de MPO pulmonar foi conduzido adicionando 10 µl da amostra (duplicata) em placas plásticas (96 poços), contendo 200 µl de tampão contendo 39 ml de tampão fosfato pH 6.0; 200 µl de H₂O₂ (0,1 %), 2 ml de Orto-dianisidina (1,3 %). Decorridos 5 min, a reação foi paralisada por meio da adição de 50 µl de solução de azida sódica (1,3%). A leitura da densidade óptica foi realizada em leitor de ELISA (Bio-Tek Instruments) em comprimento de onda de 450 nm.

4.4.2 Estudo do aumento de permeabilidade vascular

A quantificação do aumento de permeabilidade vascular no pulmão e no intestino foi realizada indiretamente pela técnica de determinação da concentração do corante azul de Evans (AE) extravasado no parênquima pulmonar e no intestino. Para tanto 25 mg/kg do corante diluídos em PBS foram injetados por via intravenosa 30 min antes do tempo de reperfusão intestinal ser completado. Decorrido o tempo desejado de reperfusão intestinal, os animais foram mortos sob anestesia, por dessangramento da aorta abdominal. A seguir o leito vascular pulmonar foi perfundido pela artéria pulmonar com PBS. Os fragmentos de intestino foram limpos de seus conteúdos e lavado em PBS. A seguir os fragmentos de tecidos (pulmonar e intestinal) foram pesados. Um fragmento de cada tecido foi separadamente colocado em formamida (4 ml/g de peso úmido tecidual, 20° C, 24 h), enquanto a outra porção foi mantida em estufa para determinação do peso seco. A densidade óptica (DO) foi obtida em leitor de ELISA (Bio-Tek Instruments®) em comprimento de onda 620 nm. A concentração de AE das amostras foi determinada cotejando os valores de DO a uma curva padrão de azul de Evans e os valores expressos em µg de AE/g de peso seco de tecido.

4. 6 Determinação do número de leucócitos

4.6.1 Determinação do número de leucócitos no sangue

Alíquotas de sangue (10 µl) da veia caudal foram coletadas em pipeta automática em líquido de Türk (3%), e contagem total foi realizada em câmara de Neubauer. Para a contagem diferencial dos leucócitos circulantes as lamínas foram coradas pelo método May-Grünwald-Giemsa modificado segundo Rosenfeld (1947) e a seguir contadas 100 células.

4.6.1 Determinação do número de leucócitos na medula óssea

Após a I/R-intestinal os animais foram anestesiados com Quetamina/Xilazina e (20 mg/kg – 100 mg/kg) e dessangrados (secção da aorta abdominal). Um fragmento de aproximadamente 1 cm do fêmur esquerdo dos foi retirado, lavado em PBS e seco em papel de filtro. Utilizando uma pinça do tipo dente-de-rato, o fragmento do fêmur foi mantido sobre um Eppendorf (2ml). A seguir introduziu-se no canal medular do fêmur uma agulha (0,80 x 25 mm) acoplada a uma seringa de polipropileno contendo 1 ml de PBS quando, então o fragmento femural foi perfundido. Alíquotas (90µl) desta amostra do lavado femural foram diluídas em cristal violeta (0,2%) dissolvido em ácido acético (30%). Desta solução uma alíquota (10 µl) foi diluída em 90 µl de PBS e processada para contagem total em câmara de Neubauer em microscopia óptica comum.

4.6.2 Determinação número de leucócitos no baço

Seguido o tempo de estudo determinado, os animais foram anestesiados com Quetamina/Xilazina (20 mg/kg – 100 mg/kg) e dessangrados (secção da aorta abdominal). Após laparotomia o baço foi removido, dissecado de tecidos aderentes e colocado em placa de Petri contendo 10 ml de meio de cultura (RPMI 1640) e acrescido de 500 µl de EDTA (10%). A seguir procedeu-se à dissociação celular do órgão com auxílio de duas agulhas (0,80 x 25 mm) dobradas em forma de L e acopladas a seringas plásticas. A suspensão obtida foi transferida para um tubo Falcon® (50 ml), onde foi homogeneizada com auxílio de pipetas do tipo Pasteur de polipropileno e, após 3 min, 8 ml do sobrenadante foram transferidos para um outro tubo Falcon® (15 ml). A seguir a amostra foi centrifugada por 10 min a 400 g. O sobrenadante foi

desprezado, o botão celular obtido foi ressuspensão em 3 ml de líquido de Gey's para lisar o excesso de hemácias e, após 3 min, foram adicionados 7 ml de PBS. A suspensão foi então centrifugada por 10 min a 400 g. Este procedimento foi repetido e o botão celular final obtido foi ressuspensão em 1 ml de PBS. Aliquotas das amostras (90 µl) foram diluídas em 10 µl de cristal violeta (0,2%) dissolvidas em ácido acético (30%). Desta diluição, 10 µl foram acrescidos de 90 µl de PBS e processados para contagem total em câmara de Neubauer em microscopia óptica comum. Os resultados foram expressos em número de células x 10⁶/ml.

4.8 Cultura de tecido pulmonar isolado (explante) e estímulo com LPS

A cultura de fragmentos do parênquima pulmonar dos animais foi realizada de acordo com o estabelecido por Proust *et al.* (2003). Para tanto, após o tempo desejado de I/R-intestinal os animais foram anestesiados, dessangrados, o leito vascular perfundido com PBS em fluxo de 10 ml/min através de uma cânula inserida na artéria pulmonar. Fragmentos de igual peso de lóbulo pulmonar foram obtidos e incubados por 4 e 24 h em placas plásticas de 24 poços a 37 °C e em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ em meio DMEM acrescido de 1 % de L-glutamina e gentamicina (10 µg/ml). Em estudos paralelos as culturas foram incubadas com LPS de *Salmonella abortus equi* (1µg /ml) por 4 h e 24 horas. A seguir os sobrenadantes foram coletados e armazenados em freezer - 80°C.

4.8.1 Quantificação de mediadores inflamatórios.

4.8.2 Citocinas por ensaio imunoenzimático

Aliquotas dos sobrenadantes de cultura de explantes de pulmão foram processadas para a quantificação das citocinas interleucinas (IL)1β, IL6, IL10 e de TNF-α. Para tanto, foram utilizados “kits” comerciais OPTEIA® (BD, Biosciences) utilizando as instruções do fabricante. Os limites de detecção estão entre 4 pg/ml a 10.000 pg/ml para as interleucinas e 15 pg/ml a 10.000 pg/ml para o TNF-α.

4.8.3 Determinação de nitratos e nitritos

A geração de NO foi indiretamente mensurada pela quantificação de nitritos (NO_x^-) nas amostras de cultura de explante pulmonar. Para tanto, amostras de culturas de explante de pulmão dos animais foram tratadas com nitrato redutase (1,6 U/ml) para redução de nitratos a nitritos. A concentração de nitritos nas amostras foi determinada utilizando o método de Griess (Wu *et al.*, 2007). Em síntese, em cada poço de uma microplaca de 96 poços, contendo 100 μl de amostra do sobrenadante de explante pulmonar foram adicionados, concentração final, NADPH (100 μM), FAD (5 μM) e nitrato redutase (50 $\mu\text{M}/\text{ml}$). Após incubação (1 h) a 37°C, adicionou-se piruvato (6 mM) e LDH (13,5 U/ml). Após 30 min de reação (37°C), adicionou-se 50 μl do reagente de Griess (sulfanilamida, 2 % e naftiletilamida, 0,2% em solução H_3PO_4 5%). Decorridos 10 min, a densidade óptica (550 nm) foi determinada em leitor de ELISA (Bio-Tek Instruments®). Os resultados de densidade óptica foram comparados aos de uma curva padrão (0,5-200 μM) igualmente submetida ao processo de redução de nitratos. Os valores foram expressos em μM de nitritos (NO_x^-).

4.9 Análise estatística

Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) seguida do teste Newman-Keuls para amostras não pareadas. As análises estatísticas foram conduzidas utilizando GraphPad Software V. 4, GraphPad InStat-TM (2005). Os resultados foram expressos como a média $\pm$ erro padrão da média (EPM). Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

5 RESULTADOS

5.1 Inflamação pulmonar e I/R intestinal

A Figura 1 representa a atividade de MPO no pulmão (painel A) e no intestino (painel B) em camundongos Balb/c, AIR_{min} e AIR_{max} submetidos à I/R intestinal. Como controles foram utilizados animais falso-operados e não manipulados (basal). Os resultados indicaram que a I/R-intestinal determinou aumento significativo na atividade pulmonar e intestinal de MPO em todos os grupos de animais estudados (Balb/c, AIR_{min} e AIR_{max}) quando comparada com a observada nos respectivos grupos falso-operados e basal. O tecido pulmonar dos camundongos AIR_{max} submetidos à I/R intestinal apresentou atividade de MPO significativamente maior do que a encontrada nos animais AIR_{min} e Balb/c. Por outro lado pulmões de animais Balb/c e AIR_{min} desenvolveram similar atividade de MPO pulmonar.

A I/R intestinal induziu aumento da atividade de MPO no intestino de forma similar nas três linhagens estudadas quando comparadas com a observada nos respectivos grupos falso-operados (painel B).

Figura 1. Efeito da I/R intestinal sobre a atividade pulmonar e intestinal de MPO de animais Balb/c, AIR_{min} e AIR_{max}. Os animais foram submetidos à isquemia intestinal de 45 minutos e reperusão de 4 horas. Os grupos consistiram de animais não manipulados (basal), falso-operados e submetidos à I/R intestinal. Os dados representam a média $\pm$ EPM de 5-10 animais. * $p < 0,05$ em relação ao grupo AIR_{min} e Balb/c; $\phi < 0,05$ em relação ao respectivo grupo falso operado.

5.2 Efeito da I/R-intestinal sobre o extravasamento plasmático

Como pode ser observado na figura 2, a I/R intestinal induziu aumento significativo no extravasamento do corante AE no pulmão (painel A) de camundongos Balb/c, AIR_{min} e AIR_{max}, quando comparado ao observado nos seus respectivos grupos controles. Ainda, podemos observar que camundongos AIR_{max} apresentaram aumento significativo no extravasamento plasmático quando comparado com o dos animais do grupo AIR_{min} e Balb/c. Em contraste, o extravasamento do corante AE no intestino não foi afetado pela I/R intestinal em nenhum dos grupos estudados (painel B).

Figura 2. Efeito da I/R intestinal sobre a permeabilidade vascular (PV) no parênquima pulmonar e no intestino de camundongos Balb/c, e AIR_{min} e AIR_{max}. Os animais foram submetidos à isquemia intestinal de 45 minutos e reperusão de 4h. Os dados representam a média $\pm$ EPM de 5-10 animais. Os grupos consistiram de animais não manipulados (basal), falso-operados e submetidos à isquemia e reperusão. A quantificação de absorvância foi feita em leitor ELISA 620 nm.* $p < 0,05$ em relação ao grupo AIR_{min} e Balb/c; ϕ $p < 0,05$ em relação respectivo grupo falso operado.

5.3 Influência da I/R intestinal no número de leucócitos

5.3.1 Circulantes

Os resultados representados na figura 3 indicam o número total de leucócitos (painel A) de mononucleares (Painel B) e de neutrófilos (painel C) presentes no sangue de camundongos Balb/c, AIR_{min} e AIR_{max} após a I/R intestinal. A I/R intestinal induziu aumento significativo no número total dessas células nos animais AIR_{max} em relação ao grupo basal e falso-operado e em relação aos camundongos Balb/c e AIR_{min} submetidos à I/R-intestinal. Observa-se elevação no número de neutrófilos (painel C) nos animais AIR_{max} quando comparado com os camundongos Balb/c e AIR_{min} submetidos à I/R intestinal. Ainda, a I/R intestinal causou aumento significativo número de neutrófilos circulantes em camundongos AIR_{min} e Balb/c em comparação ao seu respectivo grupo controle, sendo que o número de neutrófilos dos camundongos AIR_{min} é maior do que encontrados nos camundongos Balb/c submetidos à I/R intestinal (painel C). O número de mononucleares circulantes não foi alterado pela I/R intestinal em nenhum dos grupos estudados (painel B).

Figura 3. Efeito da I/R intestinal sobre o número de leucócitos circulantes nas linhagens Balb/c, AIR_{min} e AIR_{max}. Os animais foram submetidos à isquemia intestinal de 45 minutos e perfusão de 4h. Os dados representam a média $\pm$ EPM de 5-10 animais. Os grupos consistiram de animais não manipulados (basal), falso-operados e submetidos à isquemia e perfusão. ϕ $p < 0,05$ em relação ao grupo respectivo grupo falso operado; * $p < 0,05$ em relação ao grupo AIR_{min} e Balb/c ; ϵ $p < 0,05$ em relação ao grupo Balb/c.

5.3.2 Medula óssea

Os dados representados na figura 4 indicam que a I/R intestinal não alterou significativamente o número total de células presente no lavado da medula óssea do fêmur dos camundongos Balb/c, AIR_{min} e AIR_{max}.

Figura 4. Efeito da I/R intestinal sobre número total de células da medula óssea. Camundongos das linhagens Balb/c, AIR_{min} e AIR_{max} foram submetidos à I/R intestinal. Os grupos consistiram de animais não manipulados (Basal), falso operado e submetidos à I/R intestinal. Os dados representam a média $\pm$ EPM de 5-10 animais.

5.3.3 Baço

A figura 5 revela que a I/R intestinal aumentou significativamente o número de células no baço de camundongos da linhagem Balb/c, em relação ao observado no grupo falso-operado e basal. Todavia a I/R intestinal não alterou o número de células no baço dos camundongos das linhagens AIR_{min} e AIR_{max} .

Figura 5. Efeito da I/R intestinal sobre número total de células presentes no baço de animais Balb/c, AIR_{min} e AIR_{max} . Os grupos consistiram de animais não manipulados (Basal), falsos operados e submetidos à I/R intestinal. Os dados representam média $\pm$ EPM de 5-10 animais. *p < 0,05 em relação ao grupo AIR_{max} e AIR_{min} ; φ p < 0,05 em relação aos respectivos grupos falsos operados.

5.4 Mediadores inflamatórios gerados em explantes pulmonar

a) Interleucina 1 β

Os dados obtidos na figura 6 (painel A) mostram que a I/R intestinal causou aumento significativo na liberação espontânea de IL-1 β em explante pulmonar, com 4h de incubação, de camundongos AIR_{min} e AIR_{max}, quando comparada com a dos grupos falso-operado e basal. Apenas na linhagem AIR_{max} houve aumento no grupo I/R intestinal após estímulo com LPS (painel C) em relação as linhagens Balb/c e AIR_{min} submetidas à I/R intestinal.

No painel B observa-se que a I/R intestinal não causou alteração na liberação de IL1- β em explante pulmonar de 24 h em nenhuma das linhagens estudadas. Entretanto, em camundongos Balb/c o nível de IL1- β após a I/R intestinal é significativamente maior do que o observado em animais AIR_{min} e AIR_{max} após estimulação com LPS. Ainda em culturas com 24h após o estímulo com LPS o nível de IL- β do grupo I/R intestinal da linhagem Balb/c esta aumentada em relação aos respectivos grupos falso-operados e basal (Painel D).

A análise comparativa da geração de IL-1 β pelo explante pulmonar antes (espontâneo) e após (estimulado) a incubação com LPS está representado na figura 7. Como pode ser observado o estímulo com LPS exacerbou a geração de IL-1 β em explante pulmonar (4h) de camundongos AIR_{max} submetidos à I/R intestinal (Painel E). No período de 24h o explante pulmonar de camundongos Balb/c, o estímulo com LPS induziu o aumento significativo de IL-1 β no grupo I/R intestinal (painel B)

Figura 6. Produção ex vivo de IL-1 β em explantes de tecido pulmonar de camundongos Balb/c, AIR_{min} e AIR_{max}. Os animais foram submetidos à isquemia intestinal de 45 min. e reperfusão de 4 h. Os grupos consistiram de animais não manipulados (basal), falsos-operados e submetidos à isquemia e reperfusão. O explante de pulmão foi cultivado em DMEM por 4h e 24h e estimulados ou não com LPS 1 μ l/ml. Os dados representam a média $\pm$ EPM 3-10 animais. * p < 0,05 em relação ao grupo AIR_{min} e Balb/c; ϵ p < 0,05 em relação ao grupo AIR_{min} e AIR_{max}; ϕ p < 0,05 em relação ao grupo respectivo grupo falso operado.

Figura 7. Produção ex vivo de IL-1 β em explantes de tecido pulmonar de camundongos Balb/c, AIRmin e AIRmax. Os animais foram submetidos à isquemia intestinal de 45 min. e reperusão de 4 h. Os grupos consistiram de animais não manipulados (basal), falsos-operados e submetidos à isquemia e reperusão. O explante de pulmão foi cultivado em DMEM por 4h e 24h e estimulados com LPS 1 μ l/ml. Os dados representam a média $\pm$ EPM 3-10 animais. α $p < 0.05$ em relação ao respectivo grupo não estimulado.

b) Interleucina 10

Como pode ser observado na figura 8, a I/R intestinal não causou alteração na liberação de IL-10 em explante pulmonar de 4h, em nenhuma das linhagens estudadas tanto espontaneamente (Painel A), quanto após o estímulo com LPS (painel C). O mesmo perfil pode ser observado em explante pulmonar na 24h de incubação sem estímulo (painel B). Por outro lado, observamos aumento significativo dos níveis de IL-10 em explante pulmonar de camundongos Balb/c após a I/R-intestinal em relação aos observados em camundongos AIR_{min} e AIR_{max} (painel B). A estimulação com LPS aumentou significativamente os níveis de IL-10, em explante (24h) de camundongos Balb/c em relação aos grupos controle (falso-operado e basal) também em relação aos explantes das linhagens AIR_{min} e AIR_{max} (painel D).

Na figura 9, temos a análise comparativa entre explante pulmonar antes (espontâneo) e após (estimulado) a incubação com LPS. O estímulo com LPS exacerbou a geração de IL-10 em explante pulmonar (4h) de camundongos AIR_{max} nos grupos falso-operado e I/R intestinal (painel E) e em explante pulmonares (24h) dos camundongos Balb/c submetidos à I/R intestinal (painel B).

Figura 8. Produção ex vivo de IL-10 em explantes de tecido pulmonar de camundongos Balb/c, e AIR_{min} e AIR_{max}. Os animais foram submetidos à isquemia intestinal de 45 min. e reperusão de 4 h. Os grupos consistiram de animais não manipulados (basal), falso-operados e submetidos à isquemia e reperusão. O explante de pulmão foi cultivado em DMEN por 24 h e 4 h e estimulados com LPS 1μ/ml. Os dados representam a média ± EPM 3-10 animais. * p < 0,05 em relação AIR_{max} e AIR_{min}; φ p < 0,05 em relação aos respectivos grupos falsos operados.

Figura 9. Produção ex vivo de IL-10 em explantes de tecido pulmonar de camundongos Balb/c, AIR_{min} e AIR_{max}. Os grupos consistiram de animais não manipulados (basal), falso-operados e submetidos à isquemia e reperfusão. O explante de pulmão foi cultivado em DMEM por 4h e 24h estimulados ou não com LPS (1μg/ml). Os dados representam a média ± EPM 3-10 animais. α p< em relação ao respectivo grupo não estimulado.

c) Interleucina 6

Os dados na figura 10 (painéis A e B) mostram que a I/R intestinal não alterou significativamente a produção de IL-6 em culturas de explante pulmonar nas linhagens estudadas tanto em 4h quanto em 24h de incubação. No entanto explante (24 h) estimulados com LPS (painel D) tiveram significativo aumento na geração de IL-6 após a I/R intestinal na linhagem Balb/c em relação aos grupos controle e aos valores obtidos nas linhagens AIR_{min} e AIR_{max}, cujos valores não alteram em relação aos grupos basal e falso-operado.

O estímulo com LPS (figura 11) exacerbou a geração de IL-6 em explantes pulmonares (24h) dos camundongos Balb/c após a I/R intestinal.

Os dados de explante pulmonar de 4h devem ser analisados com cautela uma vez que os valores obtidos ultrapassaram os valores limites da curva.

Figura 10. Produção ex vivo de IL-6 em explantes de tecido pulmonar de camundongos Balb/c, AIR_{min} e AIR_{max}. Os grupos consistiram de animais não manipulados (basal), falso-operados e submetidos à isquemia e reperfusão. O explante de pulmão foi cultivado em DMEM por 4 h e 24h estimulados ou não com LPS (1µg/ml). Os dados representam a média ± EPM 3-10 animais.* p <0,05 em relação ao grupo AIR_{max} e AIR_{min}; φ p< 0,05 em relação ao respectivo grupo falso operado.

Figura 11. Produção ex vivo de IL-6 em explantes de tecido pulmonar de camundongos Balb/c, AIR_{min} e AIR_{max}. Os grupos consistiram de animais não manipulados (basal), falso-operados e submetidos à isquemia e reperfusão. O explante de pulmão foi cultivado em DMEM por 24h e 4h estimulados ou não com LPS (1µg/ml). Os dados representam a média ± EPM 3-10 animais. α p< em relação ao respectivo grupo não estimulado.

d) TNF- α

Os dados representados na figura 12 mostram que a I/R intestinal aumentou a produção de TNF- α em explante pulmonar de 4h em animais Balb/c e AIR_{max} (painel A), em relação aos seus respectivos grupos falso-operado e basal. Em explante pulmonares (24h) após I/R-intestinal não se observa alteração na liberação espontânea de TNF- α de camundongos AIR_{max} e AIR_{min} quando comparada a liberação observada em animais do grupo basal e falso-operado. Todavia os níveis basais de TNF- α em explantes pulmonares de camundongos Balb/c foram significativamente elevados em comparação com as linhagens AIR_{min} e AIR_{max} (painel B). Nos painéis C e D, estão indicando que a estimulação com LPS (4h e 24h) dos explantes pulmonares não alterou os níveis de TNF- α entre as linhagens estudadas após a I/R intestinal.

A figura 13 mostra a análise comparativa da geração de TNF- α espontaneamente e após estimulação com LPS. O estímulo com LPS exacerbou a geração de TNF- α nos grupos submetido à I/R-intestinal da linhagens Balb/c tanto em explante de 4h quanto 24h (painel A e B). Ainda podemos observar que o estímulo com LPS aumento os níveis de TNF nos grupos falso-operados da linhagem AIR_{max} em explante pulmonar 4 horas(painel E).

Figura 12. Produção ex vivo de TNF- α em explantes de tecido pulmonar de camundongos Balb/c, e AIR_{min} e AIR_{max}. Os grupos consistiram de animais não manipulados (basal), falso operados e submetidos à isquemia e reperfusão. O explante de pulmão foi cultivado em DMEM por 24 h e 4 horas e estimulados com LPS 1 μ g/ml. Os dados representam a média $\pm$ EPM 3-10 animais. * $p < 0,05$ em relação ao grupo AIR_{max}; ϕ $p < 0,05$ em relação ao grupo respectivo grupo falso operado. α $p <$ em relação ao respectivo grupo não estimulado.

Figura 13. Produção ex vivo TNF- α em explantes de tecido pulmonar de camundongos Balb/c, AIR_{min} e AIR_{max}. Os grupos consistiram de animais não manipulados (basal), falso-operados e submetidos à isquemia e reperusão. O explante de pulmão foi cultivado em DMEM por 4h e 24h estimulados ou não com LPS (1 μ g/ml). Os dados representam a média $\pm$ EPM 3-10 animais. α p < em relação ao respectivo grupo não estimulado.

5.4.2 *Quantificação de nitratos e nitritos*

A concentração de nitratos e nitritos gerados espontaneamente em explante pulmonar está representada na Figura 14 (painel A). Como pode ser observado a, I/R-intestinal induziu aumento significativo de nitratos e nitritos em camundongos Balb/c e AIR_{max} quando comparados com a liberação observada em seus respectivos grupos falso-operado e basal. Ainda, a produção de nitratos e nitritos na linhagem AIR_{max} é significativamente maior quando comparada com a linhagem Balb/c. No painel B podemos observar que no grupo submetido à I/R-intestinal, a estimulação com LPS dos explantes pulmonares aumentou significativamente a liberação de nitratos e nitritos nas linhagens Balb/c e AIR_{max} e não afetou o explantes da linhagem AIR_{min}. A estimulação com LPS exacerbou a geração de nitratos e nitritos nos explantes pulmonares da linhagem Balb/c de maneira ser esta superior à produzida pela linhagem AIR_{max}.

A liberação de nitratos e nitritos foi significativamente aumentada no explante pulmonar (4h e 24h) estimuladas com LPS, nas linhagens Balb/c e AIR_{max} submetidas à I/Rintestinal quando comparadas com os níveis obtidos espontaneamente (Figura 15 painéis A e C).

Figura 14. Efeito da I/R intestinal sobre a produção de nitrato e nitritos em explante pulmonar de camundongos Balb/c, AIR_{max} e AIR_{min}. Os grupos consistiram de animais não manipulados (basal), falsos operados submetidos a I/R intestinal. O explante de pulmão foi cultivado em DMEM por 24 h e estimulados com LPS 1μg/ml. Os dados representam a média ± EPM de 3-10 animais. * p < 0,05 em relação ao grupo Balb/c e AIR_{min}, φ p < 0,05 em relação ao respectivo grupo falso operado.

Figura 15. Efeito da I/R intestinal sobre a produção de nitritos em explante pulmonar de camundongos Balb/c, AIR_{max} e AIR_{min}. Os grupos consistiram de animais não manipulados (basal), falsos operados submetidos a I/R intestinal. O explante de pulmão foi cultivado em DMEM por 24 h e

estimulados com LPS 1 µg/ml. Os dados representam a média ± EPM de 3-10 animais. α p <0,05 em relação ao respectivo grupo não estimulado.

5.5 Curva de sobrevivência

A Figura 16 representa a taxa de sobrevivência dos camundongos submetidos a I/R intestinal. A análise da sobrevivência revelou que camundongos AIR_{min} e AIR_{max} apresentaram uma taxa de 85% de sobrevivência ao longo do período de 6 dias (144 h). Observa-se que em ambas as linhagens houve redução da sobrevivência nas 12 primeiras horas que sucedem a indução da I/R-intestinal, e que esta se manteve estável até o período final da análise. Todavia, camundongos AIR_{min} têm um índice de mortalidade nas primeiras 4 h após a I/R intestinal enquanto camundongos AIR_{max} tornam-se 12^a h subsequentes à I/R intestinal. Em contraste camundongos Balb/c apresentaram um perfil de sobrevivência similar ao AIR_{max} nas primeiras 12 h. Por outro lado, a taxa de sobrevivência desses animais decaiu até atingir valores mínimos (20 %) nas 48 h após a indução da I/R intestinal, permanecendo constante até o final das 144 h analisadas. Animais do grupo falso operado das linhagens estudadas não apresentaram mortalidade durante o período (dados não mostrados).

Figura 16. Efeito da isquemia e reperfusão intestinal na sobrevivência dos animais Balb/c, AIRmin e AIRmax. Os animais foram submetidos à isquemia intestinal de 45 minutos e reperfusão de 150 h. Os grupos consistiram submetidos à isquemia e reperfusão. Os dados representam a média $\pm$ EPM 5- 10 animais.

6 DISCUSSÃO

Camundongos AIR_{min} e AIR_{max} constituem um interessante modelo para o estudo de componentes genéticos que regulam a resposta inflamatória, uma vez que a resposta inflamatória tem caráter poligênico. Estes animais por serem geneticamente selecionadas carregam potenciais variações genéticas, por vezes ausentes em linhagens isogênicas. Neste sentido, o estudo da resposta inflamatória em animais não isogênicos, mas geneticamente selecionados pode contribuir para o entendimento dos mecanismos associados ao controle da inflamação.

Neste estudo investigamos as repercussões pulmonares causadas pela I/R intestinal em camundongos das linhagens AIR_{max} e AIR_{min} . Paralelamente, camundongos Balb/c também foram utilizados como uma linhagem de referência nos parâmetros investigados.

O modelo de I/R intestinal foi escolhido em virtude da relevância clínica de estudos isquêmicos e também pelo fato de a I/R intestinal ser indutora de potente e explosiva reação inflamatória sistêmica.

A I/R intestinal induz inflamação pulmonar com intenso infiltrado de neutrófilos e aumento de permeabilidade vascular, além de desencadear um processo inflamatório sistêmico no qual se detecta a presença de mediadores inflamatórios no soro. Na clínica, condições graves de inflamação pulmonar podem evoluir para SDRA e falência múltipla de órgãos (Puneet *et al.*, 2005; Bhatai *et al.*, 2004; Shem *et al.*, 2003).

Neste estudo a indução da I/R-intestinal causou recrutamento pulmonar de neutrófilos nos camundongos geneticamente selecionados o qual se alinha a resultados obtidos em outros roedores submetidos à I/R-intestinal (Cavriani *et al.*, 2007; Souza *et al.*, 2005). Nossos dados obtidos sobre o recrutamento pulmonar de neutrófilos e sobre o aumento de permeabilidade vascular nas linhagens selecionadas permitem reconhecer que os camundongos das linhagens AIR_{max} e AIR_{min} , submetidos a I/R intestinal, desencadearam distinta magnitude de inflamação pulmonar, isto é, a linhagem AIR_{max} é mais reativa que a linhagem AIR_{min} . Tal perfil inflamatório é similar àquele observado nessas linhagens para outros estímulos inflamatórios como carragenina, zimosam e como

visto no presente estudo para I/R intestinal. De acordo com Ibañez *et al.* (1992) a diferença entre as linhagens AIR_{max} e AIR_{min} no que diz respeito ao controle genético da inflamação, pode envolver cerca de 11 loci gênicos. Estes dados são interessantes, pois podem indicar que a seleção obtida para alta e baixa resposta inflamatória não afetou os aspectos estereotipados da inflamação. Em outras palavras independentemente do estímulo a linhagem AIR_{max} e a linhagem AIR_{min} respondem de forma diferente. Disso resulta a sugestão de mecanismos intrínsecos para indução da resposta inflamatória estão presentes nas linhagens AIR_{max} e AIR_{min}. Assim a combinação de genes responsáveis pelo fenótipo inflamatório das linhagens AIR_{max} e AIR_{min} poderia afetar a quantidade e o tipo de mediadores inflamatórios no sítio da inflamação, justificando as diferenças observadas entre as duas linhagens em relação ao recrutamento celular e no aumento da permeabilidade vascular pulmonar.

Vale lembrar que, o tráfego de neutrófilos, a sua recirculação (*homing*), a produção e diferenciação celular na medula óssea, poderiam contribuir para as características fenotípicas inflamatórias dessas linhagens. Como dito um aspecto que caracteriza a linhagem AIR_{max} é a presença de alto número de neutrófilos num sítio inflamatório (Ribeiro *et al.*, 2003). Tal característica pode justificar a diferente resposta inflamatória pulmonar entre as linhagens. De fato observamos diferença na atividade pulmonar de MPO e diferente aumento de permeabilidade vascular pulmonar entre as duas linhagens. Estes fatos sugerem que a maior resposta inflamatória nos animais AIR_{max} decorre da ação de mecanismos de amplificação do processo inflamatório. Por outro lado, esse parâmetros analisados no pulmão (atividade de MPO e permeabilidade vascular) na linhagem AIR_{min} foram similares aos quantificados nos camundongos Balb/c. É interessante notar que a linhagem AIR_{min} não respondeu para seleção por acasalamento, já que a resposta inflamatória aguda, desencadeada com estímulo do Biogel, não diminuiu em comparação com a observada na população fundadora. Dessa observação conduzem ao conceito de que para a sobrevivência da espécie é necessário um mínimo de resposta inflamatória que não pode ser diminuída (Ibañez *et al.* 1992). Por outro lado a resposta inflamatória não será protetora se não for mantida dentro de certos limites.

Dado que a I/R intestinal recrutou neutrófilos para o pulmão decidimos investigar o perfil de leucócitos circulantes nestas linhagens. Nossos dados revelaram que somente a linhagem AIR_{max} desenvolveu significativo aumento deste parâmetro após a I/R intestinal. Apesar disso, as três linhagens apresentaram elevação de neutrófilos circulantes como consequência sistêmica da I/R intestinal. Entretanto, não observamos alterações significativas do número total de células na medula óssea e no baço, que pudessem justificar o aumento de leucócitos circulantes ou recrutamento aumentado de neutrófilos para o pulmão dos animais AIR_{max}. Se estes animais (da linhagem AIR_{max}) dispõem de mecanismos de interação leucócito- endotélio que facilitam a transmigração endotelial nossos dados não permitem indicar.

Estudos mostram que as células da medula óssea dos animais AIR_{min}, quando estimuladas *in vitro* com citocinas granulopoéticas, desenvolvem uma resposta significativamente menor na diferenciação e proliferação de PMN, quando comparada aos animais AIR_{max}, sugerindo, portanto que a medula óssea dos animais AIR_{max} é mais reativa. Considerando nossos estudos podemos supor que a I/R-intestinal estimule uma maior produção e diferenciação de neutrófilos na medula óssea dos animais AIR_{max}, fato que levaria ao maior número de neutrófilos circulantes e conseqüentemente para o recrutamento destes neutrófilos no pulmão. Visto que os níveis de CD38 (enzima de membrana expressa em linfócitos T e em células hematopoiéticas) estão elevados na linhagem AIR_{max} e que a sinalização de linfócitos T, migração de neutrófilos e proliferação celular são mediados pelo CD38. É razoável inferir que na seleção genética das linhagens AIR_{max} possa ter ocorrido desvio funcional ou qualitativo de algum promotor de CD38, de maneira a justificar o recrutamento diferencial de neutrófilos para o pulmão sem, contudo alterar o número total de células da medula óssea e no baço. A resistência de neutrófilos à apoptose é também uma característica das linhagem AIR_{max}, fato que poderia contribuir para o aumento do número total de células circulantes e mais tardiamente se relacionar com o aumento da atividade de MPO pulmonar detectado nessa linhagem (Malavasi *et al.*, 2006; Ribeiro *et al.*, 2003; Mehta *et al.*, 1996).

Sabe-se que produtos liberados por neutrófilos se associam à indução de aumento da permeabilidade vascular (Grace *et al.*, 1994) e, portanto, é razoável supor que se observe

também aumento do extravasamento protéico pulmonar na linhagem AIR_{max} quando comparada a linhagem AIR_{min}. Por outro lado os dados sobre a lesão intestinal são interessantes, haja vista que a linhagem AIR_{max} apresentou recrutamento celular pulmonar e elevado número de neutrófilos circulantes, mas não atingiu valores de MPO intestinal que a diferencie dos valores observados na linhagens AIR_{min}. Há de ressaltar que a permeabilidade intestinal após a I/R intestinal, não foi alterada em nenhuma das linhagens estudadas. Assim, nossos dados poderiam indicar a existência de mecanismos distintos que regulam o influxo de neutrófilos ao sítio pulmonar e aqueles associados à indução do aumento de permeabilidade intestinal. Tais fatos contrastam com dados descritos em ratos (Deitch *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 1998) e em camundongos (Souza *et al.*, 2004) em modelo de I/R intestinal.

É sabido que o intestino sob lesão gera mediadores inflamatórios que lançados na circulação (sistêmica/linfática) atingem o pulmão, deflagrando efeitos lesivos locais e sistêmicos (Deitch *et al.*, 1999; Cavriani *et al.*, 2005; Coelho *et al.*, 2007). Cavriani *et al.* (2005) sugerem que o pulmão é o órgão que modula a inflamação sistêmica, sendo relevante alvo de estudo para a compreensão dos mecanismos reguladores da falência múltipla dos órgãos, após evento isquêmico no intestino. Diversos estudos evidenciam a importância dos mediadores pro e antiinflamatórios na patogenia da lesão pulmonar aguda (Puneet *et al.*, 2005; Bhatia *et al.*, 2004; Souza *et al.*, 2004 Goodman *et al.*, 2003; Krishnadasan *et al.*, 2003)

Visto que a I/R intestinal afetou diferencialmente a resposta inflamatória pulmonar, fomos investigar se tais repercussões pulmonares poderiam interferir com a geração de mediadores em duas situações: na ausência e na presença de um segundo estímulo inflamatório introduzido diretamente no compartimento pulmonar. Nossos estudos foram conduzidos utilizando o explante pulmonar visto que neste modelo de lesão pulmonar aguda as células inflamatórias recrutadas permanecem aderidas ao parênquima pulmonar. A técnica de cultura de tecido pulmonar permite avaliar a capacidade do tecido pulmonar em produzir continuamente mediadores inflamatórios. Essa informação é relevante, pois dá à percepção da interação de células residentes com as células recrutadas ao pulmão após a I/R intestinal, e mais como este sistema responde a um segundo estímulo inflamatório local.

Nossos resultados indicaram que explante de pulmão de animais AIR_{min} e AIR_{max} gerou espontaneamente IL-1 β após 4h de cultura. É importante lembrar que explante de pulmão na linhagem Balb/c não apresentou geração de IL-1 β . Por outro lado 24h após o explante pulmonar de ambas linhagens (AIR_{min}, AIR_{max}) não geram espontaneamente IL-1 β . Seja como for não há nesta citocina um perfil diferencial de geração entre as linhagens AIR_{min} e AIR_{max}.

A estimulação da cultura de fragmentos pulmonares de animais AIR_{max} mostrou-se mais susceptível ao LPS, como evidenciado na exacerbação da geração de IL-1 β . De interesse é mostra que apesar dos explantes pulmonares de camundongos Balb/c com 4h (estimulado ou não) e 24 (não estimulado) não geraram IL-1 β , mas após 24h a estimulação com LPS foi eficaz em aumentar a geração desta citocina. O fato de apenas o explante pulmonar oriundos de animais sob I/R intestinal teve este aumento, pode-se sugerir um efeito “*primning*” desenvolvido no pulmão pela I/R intestinal. É interessante que para IL-1 β essa sensibilidade ao segundo estímulo não é visível na 24h de explante nas linhagens AIR_{min} e AIR_{max}.

Em relação IL-10 não observamos alterações na produção desta tanto espontânea quanto após o estímulo com LPS após 4h de incubação. Entretanto após 24h um estímulo secundário com LPS esta citocina parece ser mais reativa na linhagem Balb/c. Uma inferência que pode ser feita e sobre as conseqüências para o controle da resposta inflamatória, na falta de níveis alterados de IL-10 os quais poderiam estar associados ao padrão diferencial de resposta inflamatória pulmonar após a I/R intestinal nas linhagens AIR_{min} e AIR_{max}.

Com respeito ao TNF- α nossos estudos mostraram que esta citocina foi liberada espontaneamente pelos explantes pulmonares dos camundongos Balb/c e AIR_{max} com 4h. A produção de TNF- α espontânea por camundongos AIR_{max}, mas não por camundongo AIR_{min}, pode ser decorrente da liberação de células estimuladas pela I/R intestinal. Estudos de Trezena *et al.* (2000) revelaram que explantes de vias aéreas superiores (traquéia proximal e distal) estimuladas com antígeno apresentam padrão distinto de liberação de TNF- α . Sabe-se que mastócitos, além de gerar TNF- α também armazenam esta citocina em grânulos. Assim eventualmente mastócitos de camundongos AIR_{max} poderiam diferir dos

mastócitos dos camundongos AIR_{min}. Vale ressaltar que existem estudos mostrando o envolvimento dessas células na I/R intestinal (Hei *et al.*, 2007)

Em linhas gerais nossos resultados com 24h de explante pulmonar de animais AIR_{min}, AIR_{max} e Balb/c, revelaram que não há geração espontânea de IL-1 β , IL-6, TNF- α e IL-10. Uma possível justificativa para explicar tal ausência de aumento espontâneo dessas citocinas é o tempo de incubação a que estas preparações foram submetidas. Eventualmente o período de 24h tenha sido excessivo para detectar níveis significativos de citocinas. De fato observamos aumento significativo pelo explante pulmonar de 4h de IL-1 β nas linhagens selecionadas e de TNF- α nas linhagens AIR_{max} e Balb/c após a I/R-intestinal.

Embora não tenhamos quantificado as citocinas no soro dos animais após I/R intestinal nossos dados estão de acordo com os observados na literatura, sugerindo que o TNF- α e a IL1- β têm papel na inflamação pulmonar desencadeada pela I/R intestinal, porém no microambiente pulmonar a produção espontânea destas citocinas não é diferente entre a linhagens AIR_{max} e AIR_{min}. Dados mostram que outro estímulo inflamatórios que não a I/R-intestinal leva a diferente produção destas citocinas entre as linhagens Di Pace *et al.* (2006) observam maior presença de RNAm para IL-1 β , IFN- γ , IL-6 e TNF- α , no infiltrado inflamatório do colon, em modelos de colite aguada induzida por dextrana. Ainda Castoli *et al.* (2006) mostram *in vitro* uma maior produção em cultura de células do baço pelos camundongos AIR_{max} de IFN- γ , IL-6 e TNF- α , mas não de IL-10, em relação aos animais AIR_{min}. Contudo, Yanira (1996) não observou diferenças na produção IL-1 β e TNF- α no exsudato inflamatório entre estas as linhagens após o estímulo com Biogel.

Nossos dados sobre a geração de mediadores inflamatórios em explante pulmonar após o estímulo com LPS, revelaram níveis elevados de IL-1 β , IL-6, IL-10 e TNF- α nos tecidos pulmonares da linhagem Balb/c em relação aos explantes pulmonares não estimulados. O mesmo não foi observado em ambas às linhagens geneticamente selecionadas no período de 24 h. É interessante que animais Balb/c são mais sensíveis aos efeitos do LPS (Araújo *et al.*, 1998), justificando de alguma forma, a exacerbação da geração de mediadores inflamatórios após o estímulo com LPS. Por outro lado, observamos um aumento significativo na produção de IL-1 β e IL-10 nas amostras de explante

pulmonar de 4h das linhagens AIR_{max} após o estímulo com LPS, portanto estes resultados mostram uma maior resposta da linhagem AIR_{max} após o estímulo secundário como o LPS. Estes resultados poderiam sugerir que a linhagem AIR_{max} é mais sensível a variações ambientais na medida em que tenha ocorrido um estímulo inflamatório prévio.

Está bem estabelecido que o NO participa dos eventos inflamatórios pulmonares e sistêmicos decorrentes da I/R intestinal (Eposito *et al.*, 2007; Cerqueira *et al.*, 2005; Cavriani *et al.*, 2004). Assim, além das citocinas avaliamos também a geração de nitratos e nitritos, um indicativo da produção de NO, em sobrenadantes dos explantes pulmonares. A geração espontânea de nitratos e nitritos foi significativamente elevada no pulmão das linhagens AIR_{max} e Balb/c. A natureza funcional da sua participação na I/R intestinal ainda é alvo de discussão. Nesse contexto, Ward *et al.* (2000), indicaram que na I/R intestinal, o aumento da atividade de iNOS se associa preferencialmente à promoção da recuperação intestinal e pulmonar e não à lesão. Cavriani *et al.* (2004) demonstram que o bloqueio seletivo de iNOS protege o pulmão contra o aumento da permeabilidade vascular induzida pela I/R intestinal em ratos e que a cNOS é fundamental para a sobrevivência do animal. Resultados similares foram observados em estudo que avaliaram o perfil de extravasamento protéico plasmático intestinal decorrente da I/R intestinal após o bloqueio da cNOS e da iNOS (Terada *et al.*, 1998). O NO está envolvido não somente com a manutenção de tônus vascular e da musculatura lisa não vascular, mas também exerce importante papel no controle do recrutamento celular (Becker *et al.*, 2000). Considerando a natureza do sistema enzimático que o sintetiza (constitutiva e indutiva) é razoável supor que esta geração em pulmões medeia a homeostasia. Assim em condições onde ocorre o excesso de geração de NO é possível ocorrer perda do controle da inflamação.

Nossos resultados evidenciaram maior geração de nitratos e nitritos em explante pulmonar das linhagens Balb/c e AIR_{max} depois de estimuladas com LPS. Assim, embora não tenhamos dados que permitam identificar quais NOS (constitutiva e/ou indutiva) estão envolvidas na geração de NO pulmonar, estudos associando as diferenças fenotípicas das linhagens com a sua expressão pulmonar de NOS são de interesse. Ainda, com relação à geração de NO, o aumento de nitratos e nitritos observado no explante pulmonar da linhagem AIR_{max} pode ser conseqüente também ao acúmulo de neutrófilos recrutados, ou

ainda de macrófagos alveolares residentes. É interessante que após a I/R intestinal observa-se hiporreatividade brônquica em ratos (Coelho *et al.*, 2007) a qual é modulada pela geração de NO. Nesse sentido a geração de nitratos e nitritos pelos camundongos AIR_{max} e Balb/c pode representar comparativamente aos AIR_{min} a capacidade do organismo em controlar a resposta inflamatória. Por outro lado numa condição onde ocorre um segundo estímulo o controle da resposta pode ser perdida na medida em que a geração de NO ficasse muito acima ou abaixo daquelas condições compatíveis com a homeostasia.

Quanto à letalidade da I/R intestinal nossos dados revelaram que apesar da resposta inflamatória pulmonar dos animais AIR_{max} ser significativamente maior (recrutamento de neutrófilos e aumento da permeabilidade vascular pulmonar), aparentemente este fato não se relaciona com letalidade decorrente da I/R intestinal, uma vez que não há diferença entre o índice de sobrevivência entre as linhagens AIR_{min} e AIR_{max}. A susceptibilidade da linhagem Balb/c à I/R-intestinal poderia ser relacionada a sua sensibilidade ao LPS. De fato, alguns autores indicam que a I/R intestinal causa translocação de bactérias para corrente sanguínea (Aller *et al.*, 2007; Valesco, 2006) e isto a longo das horas, levaria a uma maior letalidade para a linhagem Balb/c. Deste modo é razoável supor que mecanismos protetores da linhagem AIR_{max} estejam envolvidos com o índice de sobrevivência uma vez que a mortalidade desta linhagem se inicia com 12 h após a I/R intestinal e na linhagem AIR_{min} com apenas 4 h. É possível que a I/R intestinal aumente a produção da IL-1 β nas duas linhagens, entretanto a produção de TNF- α é aumentada em quantidades apreciáveis apenas na linhagem AIR_{max}, assim como sugestão estas citocinas desencadeariam um maior recrutamento de neutrófilos para o pulmão e conseqüentemente, aumento da permeabilidade vascular de maior intensidade, o que levaria maior lesão pulmonar na linhagem AIR_{max}. Com o decorrer da reperusão intestinal o NO produzido pelos animais AIR_{max}, exercera seus efeitos protetores (Eposito *et al.*, 2007; Goodmam *et al.*, 2003) controlando a magnitude da resposta inflamatória e conseqüentemente aumentando o tempo de sobrevida desta linhagem. Ainda, os níveis de IL-10 na linhagem AIR_{max} ficam mais exacerbados após um estímulo secundário (LPS), fortalecendo uma ação protetora diferenciada na linhagem AIR_{max}. À luz do controle da resposta inflamatória como resposta adaptativa do organismo sugerimos que a linhagem

AIR_{max}, como modelo, representaria o controle, gerando uma resposta inflamatória com magnitude compatível com a obtenção da homeostasia. Por outro lado, a linhagem AIR_{min} poderia representar inflamação de menor magnitude com perda na qualidade da obtenção da homeostasia. Camundongos Balb/c poderiam se situar numa posição intermediária, na qual dependendo do estímulo haveria o direcionamento da natureza da resposta inflamatória. No geral nossos dados, podem sugerir potencial envolvimento do NO, TNF- α e IL-10 gerados no pulmão no controle da inflamação pulmonar secundária a I/R intestinal na linhagem AIR_{max} e que a menor geração desses mediadores pode levar a linhagem AIR_{min} a ser menos reativa ao controle das repercussões pulmonares decorrentes de um segundo estímulo após a I/R intestinal.

Com os resultados nos inferimos que a maior lesão pulmonar aguda na linhagem AIR_{max} não parece estar relacionada com a quantidade de citocinas produzidas espontaneamente no microambiente (pulmão), mas na vigência de um estímulo secundário, a IL-1 β , IL-10 e o NO a produção destas citocinas é maior na linhagem AIR_{max}. É possível que alterações genótípicas decorrentes da seleção das linhagens possam explicar a resposta inflamatória pulmonar diferencial dos AIR_{max} em relação aos AIR_{min} desencadeada pela I/R-intestinal.

Por fim os dados apresentados neste estudo mostram que após evento isquêmico intestinal o pulmão de camundongos AIR_{max} desenvolvem reação inflamatória de maior magnitude e que a geração de mediadores pelo pulmão após o segundo estímulo se associa à obtenção de homeostasia e sobrevida dos animais.

8 CONCLUSÕES

- 1- A I/R intestinal induziu aumento do número de neutrófilos e de extravasamento protéico pulmonar nas linhagens Balb/c, AIR_{min} e AIR_{max}
- 2- Tanto o recrutamento de neutrófilos para o pulmão quanto o extravasamento plasmático pulmonar após a I/R intestinal foi de maior magnitude para os animais da linhagem AIR_{max}.
- 3- A I/R intestinal causou migração de neutrófilos no intestino das linhagens Balb/c, AIR_{min} e AIR_{max}. Por outro lado o intestino não desenvolveu extravasamento plasmático após a I/R intestinal.
- 4- A I/R intestinal determinou neutrofilia em todas as linhagens estudadas, todavia a linhagem AIR_{max} exacerbou a neutrofilia.
- 5- A celularidade dos órgãos hematopoiéticos não foi afetada pela I/R intestinal nas linhagens AIR_{min} e AIR_{max}.
- 6- Após a indução da I/R intestinal parece haver maior sensibilidade dos pulmões de animais da linhagem AIR_{max} em gerar NO, IL-1 β e IL-10 por efeito de um segundo estímulo inflamatório.
- 7- O estudo da letalidade das linhagem parece sugerir que camundongos AIR_{max} são mais eficazes em controlar a resposta inflamatória do que os camundongos AIR_{min} e Balb/c.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS*

Adcock IM. Molecular mechanisms of glucocorticosteroid actions. *Pulm Pharmacol Ther.* 2000;13(3):115-26.

Agrawal DK, Kavanaugh AF. Cell adhesion molecules in allergic disease. In: Townley RG, Agrawal DK, editors. *The Immunopharmacology of Allergic Diseases*. New York: Marcel Dekker; 1996. p. 99-118.

Aller MA, Arias JL, Cruz A, Arias J. Inflammation: a way to understanding the evolution of portal hypertension. *Theor Biol Med Model.* 2007;13:4:44.

Anadol AZ, Bayram O, Dursun A, Ercan S. Role of endogenous endothelin peptides in intestinal ischemia-reperfusion injury in rats. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 1998; 59(4):279-83.

Andrejaitiene J. Acute respiratory distress syndrome. *Medicina.* 2003; 39(11):1044-56.

Araujo LM, Ribeiro OG, Siqueira M, De Franco M, Starobinas N, Massa S, Cabrera WH, Mouton Artigas A. Current definitions of acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. *Intensive Care Med.* 2000; 26(7):1019.

Bannenberg GL, Chiang N, Ariel A, Arita M, Tjonahen E, Gotlinger KH, Hong S, Serhan CN. Molecular circuits of resolution: formation and actions of resolvins and protectins. *J Immunol.* 2005; 174(7):4345-55.

Barnes PJ. Endogenous inhibitory mechanisms in asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000;161(2):176-81.

Bhatia M, Moochhala S. Role of inflammatory mediators in the pathophysiology of acute respiratory distress syndrome. *J Pathol.* 2004; 202(2):145-56.

Bernard GR. Research in sepsis and acute respiratory distress syndrome: are we changing course? *Crit Care Med.* 1999; 27(2):434-6.

Becker BF, Heindl B, Kupatt C, Zahler S. Endothelial function and hemostasis. *Z Kardiol.* 2000; 89(3):160-7.

---

* De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. Available from: <http://www.icmje.org> [2004 May 06].

Berthiaume Y, Lesur O, Dagenais A. Treatment of adult respiratory distress syndrome: plea for rescue therapy of the alveolar epithelium. *Thorax*. 1999; 54(2):150-60.

Biozzi G, Ribeiro OG, Saran A, Araujo ML, Maria DA, De Franco M, Cabrera WK, Sant'anna OA, Massa S, Covelli V, Mouton D, Neveu T, Siqueira M, Ibanez OM. Effect of genetic modification of acute inflammatory responsiveness on tumorigenesis in the mouse. *Carcinogenesis*. 1998; 19(2):337-46.

Borjesson A, Norlin A, Wang X, Andersson R, Folkesson HG. TNF-alpha stimulates alveolar liquid clearance during intestinal ischemia-reperfusion in rats. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2000; 278(1):L3-12.

Breithaupt-faloppa AC, Vitoretti IB, Coelho FR, Franco AIS, Domingos HV, Oliveira-Filho RM, Sudo-Hayashi LS, Vargaftig BB, de Lima WT. Nitric Oxide mediates lung vascular permeability and lymph-borne IL-6 after an intestinal ischemic insult. *Shock*. 2008; 00:060

Campbell NB, Blikslager AT. The role of cyclooxygenase inhibitors in repair of ischaemic-injured jejunal mucosa in the horse. *Equine Vet J Suppl*. 2000; (32):59-64.

Carden D, Xiao F, Moak C, Willis BH, Robinson-Jackson S, Alexander S. Neutrophil elastase promotes lung microvascular injury and proteolysis of endothelial cadherins. *Am J Physiol*. 1998; 275(2):H385-92.

Carrick JB, Martins O Jr, Snider CC, Means ND, Enderson BL, Frame SB, Morris SA, Karlstad MD. The effect of LPS on cytokine synthesis and lung neutrophil influx after hepatic ischemia/reperfusion injury in the rat. *J Surg Res*. 2007; 68(1):16-23.

Carneiro AS, Ribeiro OG, De Franco M, Cabrera WH, Vorraro F, Siqueira M, Ibanez OM, Starobinas N. Local inflammatory reaction induced by Bothrops jararaca venom differs in mice selected for acute inflammatory response. *Toxicon*. 2002; 40(11):1571-9.

Castoldi L, Golim MA, Filho OG, Romagnoli GG, Ibañez OC, Kaneno R. Enhanced natural killer activity and production of pro-inflammatory cytokines in mice selected for high acute inflammatory response (AIRmax). *Immunology*. 2006; 120(3):372-9.

Cavriani G, Domingos HV, Oliveira-Filho RM, Sudo-Hayashi LS, Vargaftig BB, de Lima WT. Lymphatic thoracic duct ligation modulates the serum levels of IL-1beta and IL-10 after intestinal ischemia/reperfusion in rats with the involvement of tumor necrosis factor alpha and nitric oxide. *Shock*. 2007; 27(2):209-13.

Cavriani G, Domingos HV, Soares AL, Trezena AG, Ligeiro-Oliveira AP, Oliveira-Filho R M, Sudo-Hayashi LS, Tavares De Lima W. Lymphatic system as a path underlying the spread

of lung and gut injury after intestinal ischemia/reperfusion in rats. *Shock*. 2005; 23:330-6.

Cavriani G, Oliveira-Filho RM, Trezena A G, Da Silva Z. L, Domingos HV, Arruda MJ, Jancar S, Tavares De Lima W. Lung microvascular permeability and recruitment are differently regulated by nitric oxide in a rat model of intestinal ischemia-reperfusion. *Eur. J. Pharmacol*. 2004; 494 (23): 241-249.

Cerqueira NF, Hussni CA, Yoshida WB. Pathophysiology of mesenteric ischemia/reperfusion. *Acta Cir Bras*. 2005;Jul-Aug 20(4):336-43.

Coelho FR, Cavriani G, Soares AL, Teixeira SA, Almeida PC, Sudo-Hayashi LS, Muscará MN, Oliveira-Filho RM, Vargaftig BB, Tavares-de-Lima W. Lymphatic-borne IL-1 β and the inducible isoform of nitric oxide synthase trigger the bronchial hyporesponsiveness after intestinal ischemia/reperfusion in rats. *Shock*. 2007;28(6):694-9.

Defaux JP, Thonier F, Baroggi N, Etienne A, Braquet P. Involvement of platelet-activating factor (PAF) in endotoxin- or ischaemia-induced intestinal hyperpermeability in the rat. *J Lipid Mediat*. 1993; 7(1):11-21.

Deitch EA, Feketeova E, Lu Q, Zaets S, Berezina TL, Machiedo GW, Hauser CJ, Livingston DH, Xu DZ. Resistance of the female, as opposed to the male, intestine to I/R-mediated injury is associated with increased resistance to gut-induced distant organ injury. *Shock*. 2008; 29(1):78-83.

Deitch EA, Goodman ER. Prevention of multiple organ failure. *Surg Clin North Am*. 1999 ; 79(6):1471-88.

Di Pace RF, Massa S, Ribeiro OG, Cabrera WH, De Franco M, Starobinas N, Seman M, Ibañez OC. Inverse genetic predisposition to colon versus lung carcinogenesis in mouse lines selected based on acute inflammatory responsiveness. *Carcinogenesis*. 2006; 27(8):1517-25.

Esposito E, Mazzon E, Muia C, Meli R, Sessa E, Cuzzocrea S. Splanchnic ischemia and reperfusion injury is reduced by genetic or pharmacological inhibition of TNF- α . *J Leukoc Biol*. 2007.81(4):1032-43.

Eiserich JP, Patel RP, O'Donnell VB. Pathophysiology of nitric oxide and related species: free radical reactions and modification of biomolecules. *Mol Aspects Med*. 1998; 19(4-5):221-357.

Filep JG, Braquet P, Mozes T. Interactions between platelet-activating factor and prostanóides during mesenteric ischemia-reperfusion-induced shock in the anesthetized dog. *Circ Shock*. 1991; 35 (1): 1-8.

Fontes B, Isquemia/reperfusão intestinal-sequestro pulmonar e hepático do neutrófilo ativado. Tese (Livre Docência) - Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 54 ;1995.

Ford-Hutchinson AW, Bray MA, Doig MV, Shipley ME, Smith MJ. Leukotriene B, a potent chemokinetic and aggregating substance released from polymorphonuclear leukocytes. *Nature*. Jul 1980; 17;286(5770).

Friedman G, Jankowski S, Marchant A, Goldman M, Kahn RJ, Vincent JL. Blood interleukin 10 levels parallel the severity of septic shock. *J Crit Care*. 1997;12(4):183-97.

Fukunaga K, Kohli P, Bonnans C, Fredenburgh LE, Levy BD. Cyclooxygenase 2 plays a pivotal role in the resolution of acute lung injury. *J Immunol*. 2005; 174(8):5033-9.

Grace PA. Ischemia-reperfusion injury. *Br J Surg*. 1994; 81(5):637-47.

Gaines GC, Welborn MB 3rd, Moldawer LL, Huber TS, Harward TR, Seeger JM. Attenuation of skeletal muscle ischemia/reperfusion injury by inhibition of tumor necrosis factor. *J Vasc Surg*. 1999; 29(2):370-6.

Gandía Martínez F, Duque Medina JL, Andaluz Ojeda D, Iñigo Martínez G. Postoperative acute respiratory distress syndrome after lung resection. *Arch Bronconeumol*. 2007; 43:623-7.

Gogos CA, Drosou E, Bassaris HP, Skoutelis A. Pro- versus anti-inflammatory cytokine profile in patients with severe sepsis: a marker for prognosis and future therapeutic options. *J Infect Dis*. 2000; 181(1):176-80.

Goldblum SE, Wu KM, Jay M. Lung myeloperoxidase as a measure of pulmonary leukostasis in rabbits. *J Appl Physiol*. 1985; 59(6):1978-85.

Grisham MB, Hernandez LA, Granger DN. Xanthine oxidase and neutrophil infiltration in intestinal ischemia. *Am J Physiol*. 1986; 251:G567-74.

Guidot DM, Repine MJ, Hybertson BM, Repine JE. Inhaled nitric oxide prevents neutrophil-mediated, oxygen radical-dependent leak in isolated rat lungs. *Am J Physiol*. 1995; 225-9.

Halldorsson AO, Kronon MT, Allen BS, Rahman S, Wang. Lowering reperfusion pressure reduces the injury after pulmonary ischemia. *Ann Thorac Surg.* , 2000; 69(1):198-203.

Hasleton PS, Roberts TE. Adult respiratory distress syndrome - an update .*Histopathology.* 1999; 34:285-94.

Hildebrand F, Pape HC, van Griensven M, Meier S, Hasenkamp S, Krettek C, Stuhmann M. Genetic predisposition for a compromised immune system after multiple trauma. *Shock.* 2005; 24(6):518-22.

Hoek RM, Ruuls SR, Murphy CA, Wright GJ, Goddard R, Zurawski SM, Blom B, Homola ME, Streit WJ, Brown MH, Barclay AN, Sedgwick JD. Down-regulation of the macrophage lineage through interaction with OX2 (CD200). *Science.* 2000; 290(5497):1768-71.

Honda Z, Ishii S, Shimizu T. Platelet-activating factor receptor. *J Biochem (Tokyo).* 2002; 131(6):773-9

Horohov DW, Beadle RE, Mouch S, Pourciau SS. Temporal regulation of cytokine mRNA expression in equine recurrent airway obstruction. *Vet Immunol Immunopathol.* 2005; 18; 108(1-2):237-45.

Huang YS, Yang ZC, Liu XS, Chen FM, He BB, Li A, Crowther RS. Serial experimental and clinical studies on the pathogenesis of multiple organ dysfunction syndrome (MODS) in severe burns. *Burns.* 1998;24(8):706-16.

Hudson LD, Milberg JA, Anardi D, Maunder RJ. Clinical risks for development of the acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med.* 1995; 151:293-301.

Hudson, L. D.; Steinberg, K. P. Epidemiology of acute lung injury and ARDS. *Chest.* 1999;116 (1):82-64.

Frangogiannis NG, Shimoni S, Chang SM, Ren G, Dewald O, Gersch C, Shan K, Aggeli C, Reardon M. Active interstitial remodeling: an important process in the hibernating human myocardium. *J Am Coll Cardiol.* 2002; 39(9):1468-74.

Haworth O, Levy BD. Endogenous lipid mediators in the resolution of airway inflammation. *Eur Respir J.* 2007; 30(5):980-92.

Hei ZQ, Gan XL, Luo GJ, Li SR, Cai J. Pretreatment of cromolyn sodium prior to reperfusion attenuates early reperfusion injury after the small intestine ischemia in rats. *World J Gastroenterol.* 2007; 14;13(38):5139-46.

Ialenti A, Ianaro A, Moncada S, Di Rosa M. Modulation of acute inflammation by endogenous nitric oxide. *Eur J Pharmacol.* 1992; 11;211(2):177-82.

Ibañez OM, Stiffel C, Ribeiro OG, Cabrera WK, Massa S, de Franco M, Sant'Anna OA, Decreusefond C, Mouton D, Siqueira M, Genetics of nonspecific immunity: I. Bidirectional selective breeding of lines of mice endowed with maximal or minimal inflammatory responsiveness. *Eur Immunol.* 1992; 22(10):2555-63.

Ikai M, Itoh M, Joh T, Yokoyama Y, Okada N, Okada H. Complement plays an essential role in shock following intestinal ischaemia in rats. *Clin Exp Immunol.* 1996; 106(1):156-9.

Iwata F, Joh T, Yokoyama Y, Itoh M. Role of endogenous nitric oxide in ischaemia-reperfusion injury of rat gastric mucosa. *J Gastroenterol Hepatol.* 1998; 13(10):997-1001

Kato T, Kitagawa S. Regulation of neutrophil functions by proinflammatory cytokines. *Int J Hematol.* 2006; 84(3):205-9.

Janeway CA. How the immune system protects the host from infection. *Microbes Infect.* 2001; 3(13):1167-71.

Kim H, Hwan Kim K. Role of nitric oxide and mucus in ischemia/reperfusion-induced gastric mucosal injury in rats. *Pharmacology.* 2001; 62(4):200-7.

Koike K, Yamamoto Y, Hori Y, Ono T. Group IIA phospholipase A2 mediates lung injury in intestinal ischemia-reperfusion. *Ann Surg.* 2000; 232(1):90-7.

Koike, K.; Moore, E. E.; Moore, F. A.; Carl, V. S.; Pitman, J. M.; Banerjee, A. Phospholipase A2 Inhibition decouples lung injury from gut ischemia-reperfusion. *Surgery.* 1992; 112:173-180.

Koksoy C, Kuzu MA, Ergun H, Demirpence E, Zulfikaroglu B. Intestinal ischemia and reperfusion impairs vasomotor functions of pulmonary vascular bed. *Ann Surg.* 2000; 231(1):105-11.

Krishnadasan B, Naidu B, Rosengart M, Farr AL, Barnes A, Verrier ED, Mulligan MS. Decreased lung ischemia-reperfusion injury in rats after preoperative administration of cyclosporine and tacrolimus. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2002; 123(4):756-67.

Kubes P. The role of adhesion molecules and nitric oxide in intestinal and hepatic ischemia/reperfusion. *Hepatology.* 1999 Jun; 46 Suppl 2:1458-63.

Kubes P, Suzuki M, Granger DN. Nitric oxide microcirculation and inflammation: Kubes modulation of leukocyte-endothelial cell adhesion. *J Leukoc Biol.* 1994; 55(5):662-75.

Lawrence T, Willoughby DA, Gilroy DW. Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2002; 2(10):787-95.

Levi M. Pathogenesis and treatment of disseminated intravascular coagulation in the septic patient. *J Crit Care*. 2001; 16(4):167-77.

Lesur O, Bgerthiaume Y, Blaise G, Damas P, Deland E, Guimond J. G, Michel R. P. Acute respiratory distress syndrome: 30 years later. *Can Respir*. 1999; 6 (1): 71-86.

Lewandowski K, Lewandowski M. Epidemiology of ARDS. *Minerva Anesthesiol*. 2006; 72(6):473-7.

Li Q, Verma IM. NF-kappaB regulation in the immune system. *Nat Rev Immunol*. 2002;2(10):725-34.

Liu SH, Lai JL, Lin RH, Lin MJ, Lin-Shiau SY. Involvement of nitric oxide in the in vivo effects of lipopolysaccharide on the contractile and electrical properties of mouse diaphragm. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol*. 1997; 356(4):500-4.

Maderna P, Godson C Taking insult from injury: lipoxins and lipoxin receptor agonists and phagocytosis of apoptotic cells. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2005;73(3-4):179-87.

Malangoni MA, Livingston DH, Sonnenfeld G, Polk HC Jr, Interferon gamma and tumor necrosis factor alpha. Use in gram-negative infection after shock. *Arch. Surg*. 1990; 125 (4): 444-446.

Mangino MJ, Anderson CB, Murphy MK, Brunt E, Turk J. Mucosal arachidonate metabolism and intestinal ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol*. 1989; 257:G299-307.

Mangino MJ, Mangino JE, Kotadia B, Sielczak M. Effects of the 5-lipoxygenase inhibitor A-64077 on intestinal hypothermic organ preservation injury. *J Pharmacol Exp Ther*. 1997; 281(2):950-6.

Marchant A, Alegre ML, Hakim A, Pierard G, Marecaux G, Friedman G, De Groote D, Kahn RJ, Vincent JL, Goldman M. Clinical and biological significance of interleukin-10 plasma levels in patients with septic shock. *J Clin Immunol*. 1995;15(5):266-73.

Martin M, Salim A, Murray J, Demetriades D, Belzberg H, Rhee P. The decreasing incidence and mortality of acute respiratory distress syndrome after injury: a 5-year observational study. *J Trauma*. 2005; 59(5):1107-13.

Maria DA, Manenti G, Galbiati F, Ribeiro OG, Cabrera WH, Barrera RG, Pettinicchio A, De Franco M, Starobinas N, Siqueira M, Dragani TA, Ibanez OM. Pulmonary adenoma

susceptibility 1 (Pas1) locus affects inflammatory response. *Oncogene*. 2003; 23;22(3):426-32.

Marchant A, Alegre ML, Hakim A, Pierard G, Marecaux G, Friedman G, De Groote D, Kahn RJ, Vincent JL, Goldman M. Clinical and biological significance of interleukin-10 plasma levels in patients with septic shock. *J Clin Immunol*. 1995; 15(5):266-73.

Maslinska D, Gajewski M. Some aspects of the inflammatory process. *Folia Neuropathol*. 1998; 36(4):199-204.

Malavasi F, Deaglio S, Ferrero E, Funaro A, Sancho J, Ausiello CM, Ortolan E, Vaisitti T, Zubiaur M, Fedele G, Aydin S, Tibaldi EV, Durelli I, Lusso R, Cozzo F, Horenstein AL. CD38 and CD157 as receptors of the immune system: a bridge between innate and adaptive immunity. *Mol Med*. 2006; 12(11-12):334-41.

Maxwell SR, LIP GY. Free radicals and antioxidants in cardiovascular disease. *Br. J. Clin. Pharmacol*. 1997; 44: 307-17,.

Mehta K, Shahid U, Malavasi F. Human CD38, a cell-surface protein with multiple functions. *FASEB J*. 1996;10(12):1408-17.

McGuire TR, Bociek GR, Pavletic SZ, Hock L, Lynch J, Schneider J, Hoie EB, Tarantolo S, Haire WD. Organ dysfunction following stem cell transplantation: relationship to plasma cytokine concentrations. *Bone Marrow Transplant*. 2001; 28(9):889-93.

Mizumoto N, Kumamoto T, Robson SC, Sevigny J, Matsue H, Enjyoji K, Takashima A. CD39 is the dominant Langerhans cell-associated ecto-NTPDase: modulatory roles in inflammation and immune responsiveness. *Nat Med*. 2002; 8(4):358-65.

Miura M, Ichinose M, Kageyama N, Tomaki M, Takahashi T, Ishikawa J, Ohuchi Y, Oyake T, Endoh N, Shirato K. Endogenous nitric oxide modifies antigen-induced microvascular leakage in sensitized guinea pig airways. *J Allergy Clin Immunol*. 1996 ; 98(1):144-51.

Moore EE, Moore FA, Franciose RJ, Kim FJ, Biffl WL, Banerjee A. The postischemic gut serves as a priming bed for circulating neutrophils that provoke multiple organ failure. *J Trauma*. 1994; 37(6):881-7.

Moncada S, Higgs A, Furchgott R. International Union of Pharmacology Nomenclature in Nitric Oxide Research. *Pharmacol Rev*. 1997; 49(2):137-42.

Nagase T, Ishii S, Kume K, Uozumi N, Izumi T, Ouchi Y, Shimizu T. Platelet-activating factor mediates acid-induced lung injury in genetically engineered mice. *J. Clin. Invest*. 1999; 104:1071-1076.

- Nathan C. Points of control in inflammation. *Nature*. 2002; 19-26; 420(6917):846-52.
- Nichols TC. NF-kappaB and reperfusion injury. *Drug News Perspectr*. 2004; 17(2):99-104.
- Oshima H, Tanaka I. Mechanisms of anti-inflammatory actions of glucocorticoids *Nippon Rinsho*. 2008; 66(1):77-82.
- Ottonello L, Morone MP, Dapino P, Dallegri F. Tumour necrosis factor alpha-induced oxidative burst in neutrophils adherent to fibronectin: effects of cyclic AMP-elevating agents. *Br J Haematol*. 1995; 91(3):566-70.
- Parrillo JE, Parker MM, Natanson C, Suffredini AF, Danner RL, Cunnion RE, Ognibene FP. Septic shock in humans. Advances in the understanding of pathogenesis, cardiovascular dysfunction, and therapy. *Ann Intern Med*. 1990;113(3):227-42.
- Peters LC, Jensen JR, Borrego A, Cabrera WH, Baker N, Starobinas N, Ribeiro OG, Ibanez OM, De Franco M. Slc11a1 (formerly NRAMPI) gene modulates both acute inflammatory reactions and pristane-induced arthritis in mice. *Genes Immun*. 2007; 8(1):51-6.
- Pinsky MR, Vincent JL, Deviere J, Alegre M, Kahn RJ, Dupont E. Serum cytokine levels in human septic shock. Relation to multiple-system organ failure and mortality. *Chest*. 1993; 103(2):565-75.
- Pober JS. Activation and injury of endothelial cells by cytokines. *Pathol Biol (Paris)*. 1998; 46(3):159-63.
- Poss WB, Timmons OD, Farrukh IS, Hoidal JR, Michael JR. Inhaled nitric oxide prevents the increase in 1995;79(3):886-91.
- Proust B, Nahori MA, Ruffie C, Lefort J, Vargaftig BB. Persistence of bronchopulmonary hyper-reactivity and eosinophilic lung inflammation after anti-IL-5 or -IL-13 treatment in allergic BALB/c and IL-4Ralpha knockout mice. *Clin Exp Allergy*. 2003; 33(1):119-31.
- Pruitt JH, Welborn MB, Edwards PD, Harward TR, Seeger JW, Martin TD, Smith C, Kenney JA, Wesdorp RI, Meijer S, Cuesta MA, Abouhanze A, Copeland EM 3rd, Giri J, Sims JE, Moldawer LL, Oldenburg HS. Increased soluble interleukin-1 type II receptor concentrations in postoperative patients and in patients with sepsis syndrome. *Blood*. 1996; 15;87(8):3282-8.
- Puneet P, Moolchhala S, Bhatia M. Chemokines in acute respiratory distress syndrome. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2005; 288(1):L3-15.

Radomski MW, Palmer RM, Moncada S. Glucocorticoids inhibit the expression of an inducible, but not the constitutive, nitric oxide synthase in vascular endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990; 87(24):10043-7.

Reis MH, Ibanez OM, Cabrera WH, Ribeiro OG, Mouton D, Siqueira M, Couderc J. T-helper functions in lines of mice selected for high or low antibody production (Selection III): modulation by anti-CD4⁺ monoclonal antibody. *Immunology*. 1992; 75(1):80-5.

Ribeiro OG, Cabrera WH, Maria DA, De Franco M, Massa S, Di Pace RF, de Souza VR, Starobinas N, Semen M, Ibanez OM. Genetic selection for high acute inflammatory response confers resistance to lung carcinogenesis in the mouse. *Exp Lung Res*. 2005; 31(1):105-16.

Ribeiro, O. G.; Adriouch, S.; Pechberty, S.; Cabrera, W. H.; Morisser, J.; Ibañez, O. M.; Seman, M. Convergent alteration of granulopoiesis, chemotactic activity, and neutrophil apoptosis during mouse selection for high acute inflammatory response. *J Leukoc Biol*. 2003;74(4):497-506.

Ricciardolo FL, Nijkamp FP, Folkerts G. Nitric oxide synthase (NOS) as therapeutic target for asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Curr Drug Targets*. 2006; 7(6):721-35.

Rothenbach P, Turnage RH, Iglesias J, Riva A, Bartula L, Myers SI Downstream effects of splanchnic ischemia-reperfusion injury on renal function and eicosanoid release. *J Appl Physiol*. 1997; 83(2):530-6.

Scarabelli TM, Stephanou A, Pasini E, Comini L, Raddino R, Knight R.A, Latchman DS. Different signaling pathways induced apoptosis in endothelial cells and cardiac myocytes during ischemia/ reperfusion injury. *Circ Res*. 2002; 90 (6): 745-8.

Serhan CN. Phase of Inflammation: Novel Endogenous Anti-Inflammatory and Proresolving Lipid Mediators and Pathways. *Annu Rev Immunol*. 2007; 23;25:101-137.

Serhan CN, Yacoubian S, Yang R. Anti-inflammatory and proresolving lipid mediators. *Annu Rev Pathol*. 2008;3:279-312.

Serhan CN. Novel omega -- 3-derived local mediators in anti-inflammation and resolution. *Pharmacol Ther*. 2005;105(1):7-21.

Serhan CN. A search for endogenous mechanisms of anti-inflammation uncovers novel chemical mediators: missing links to resolution. *Histochem Cell Biol*. 2004; 122(4):305-21.

Sirotković-Skerlev M, Plestina S, Bilić I, Kovac Z. Pathophysiology of ischaemia-reperfusion injury. *Lijec Vjesn*. 2006; 128(3-4):87-95.

Schefold JC, Hasper D, von Haehling S, Meisel C, Reinke P, Schlosser HG. Interleukin-6 serum level assessment using a new qualitative point-of-care test in sepsis: a comparison with elisa measurements. Clin Biochem. 2008; 20.

Sorkine P, Setton A, Halpern P, Miller A, Rudick V, Marmor S, Klausner JM, Goldman G. Soluble tumor necrosis factor receptors reduce bowel ischemia-induced lung permeability and neutrophil sequestration. Crit Care Med. 1995; 23(8):1377-81.

Souza DG, Teixeira MM. The balance between the production of tumor necrosis factor- α and interleukin-10 determines tissue injury and lethality during intestinal ischemia and reperfusion. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2005;100Suppl 1:59-66.

Souza DG, Vieira AT, Soares AC, Pinho V, Nicoli JR, Vieira LQ, Teixeira MM. The essential role of the intestinal microbiota in facilitating acute inflammatory responses. J Immunol. 2004; 15(6):4137-46.

Souza, D. G.; Guabiraba, R.; Pinho, V.; Bristow, A.; Poole, S.; Teixeira, M. M. IL-1-driven endogenous IL-10 production protects against the systemic and local acute inflammatory response following intestinal reperfusion injury. J Immunol. 2003; 170:4759-66.

Souza DG, Soares AC, Pinho V, Torloni H, Reis LF, Teixeira MM, Dias AA. Increased mortality and inflammation in tumor necrosis factor-stimulated gene-14 transgenic mice after ischemia and reperfusion injury. Am J Pathol. 2002;160(5):1755-65. Erratum in: Am J Pathol. 2003; 162(1):359.

Spector WG, Willoughby DA. Suppression of increased capillary permeability in injury by monoamine oxidase inhibitors. Nature. 1960;186:162-3.

Spector WG, Walters MN, Willoughby DA. The origin of the mononuclear cells in inflammatory exudates induced by fibrinogen. J Pathol Bacteriol. 1965; 90(1):181-92.

Stiffel C, Ibanez OM, Ribeiro OG, Decreusefond C, Mouton D, Siqueira M, Biozzi G. Genetics of acute inflammation: inflammatory reactions in inbred lines of mice and in their interline crosses. Exp Clin Immunogenet. 1990; 7(4):221-33.

Sun, Z.; Wang, X.; Deng, X.; Lasson, A.; Wallen, R.; Hallberg, E.; Andersson, R. The influence of intestinal ischemia and reperfusion on bidirectional intestinal barrier permeability, cellular membrane integrity, proteinase inhibitors, and cell death in rats. Shock. 1998; 10: 203-12.

Takayama, M; Ishibashi, M; Ishii, H; Kuraki, T; Nishida, T; Yoshida, M. Effects of neutrophil elastase inhibitor (ONO-5046) on lung injury after intestinal ischemia-reperfusion. J. Appl. Physiol. 2001;91: 1800-1807.

Terada LS, Mahr NN, Jacobson ED. Nitric oxide decreases lung injury after intestinal ischemia. *J Appl Physiol.* 1996; 81(6):2456-60.

Trezena AG, da Silva ZL, Oliveira-Filho RM, Damazo AS, Straus AH, Takahashi HK, Oliani SM, de Lima WT. Differential regulation of the release of tumor necrosis factor- α and of eicosanoids by mast cells in rat airways after antigen challenge. *Inflamm.* 2000;12(4):237-46

Tinker AC, Wallace AV. Selective inhibitors of inducible nitric oxide synthase: potential agents for the treatment of inflammatory diseases 2006; *Curr Top Med Chem.* 1998; 10: 203-12.

Toledo-Pereyra LH, Toledo AH, Walsh J, Lopez-Neblina F. Molecular signaling pathways in ischemia/reperfusion. *Exp Clin Transplant.* 2004; 2(1):174-7.

Turnage RH, Wright JK, Iglesias J, LaNoue JL, Nguyen H, Kim L, Myers S Intestinal reperfusion induced pulmonary edema is related to increased pulmonary inducible nitric oxide synthase activity. *Surgery.* 1998; 124:457- 462.

Turnage RH, LaNoue JL, Kadesky KM, Meng Y, Myers S. I. Thromboxane A2 mediates increase pulmonary microvascular permeability after intestinal reperfusion. *J. Appl. Physiol.* 1997; 82: 592-98.

Turnage, R. H.; Kadesky, K. M.; Bartula, L.; Myers, S. I. Pulmonary thromboxane release following intestinal reperfusion. *J. Surg. Res.* 1995;58 (6): 552-7.

Tracey, K. The inflammatory reflex. *Nature.* 2002; 19-26;420(6917):853-9.

Uchida T, Makita K. Acute lung injury and alveolar epithelial fun. *Masui.* 2008; J;57(1):51-9.

Van der Woude CJ, Kleibeuker JH, Jansen PL, Moshage H. Chronic inflammation, apoptosis and (pre-)malignant lesions in the gastro-intestinal tract. *Apoptosis.* 2004; 9(2):123-30.

Van Putte BP, Kesecioglu J, Hendriks JM, Persy VP, van Marck E, Van Schil PE, De Broe ME. Cellular infiltrates and injury evaluation in a rat model of warm pulmonary ischemia-reperfusion. *Crit Care.* 2005; 9(1):R1-8.

Van Soeren, M. H.; Diehl-Jones, W. L.; Maykut, R. J.; Haddara, W. M. Pathophysiology and

implications for treatment of acute respiratory distress syndrome. AACN Clin Issues 2000;11 (2): 179-97.

Van Zee KJ, Kohno T, Fischer E, Rock CS, Moldawer LL, Lowry SF. Tumor necrosis factor soluble receptors circulate during experimental and clinical inflammation and can protect against excessive tumor necrosis factor alpha in vitro and in vivo. Proc Natl Acad Sci U S A. 1992; 89(11):4845-9.

Vedder NB, Winn RK, Rice CL, Chi E Y, Arfors KE, Harlan J. M. A monoclonal antibody to the adherence-promoting leukocytes glycoprotein, CD18, reduces organ injury and improves survival from hemorrhagic shock and resuscitation in rabbits. J. Clin. Invest. 1988;81: 93944.

Vigar ND, Cabrera WH, Araujo LM, Ribeiro OG, Ogata TR, Siqueira M, Ibanez OM, De Franco M. Pristane-induced arthritis in mice selected for maximal or minimal acute inflammatory reaction. Eur J Immunol. 2000; 30(2):431-7.

Wang W, Smail N, Wang P, Chaudry IH. Increased gut permeability after hemorrhage is associated with upregulation of local and systemic IL-6. J Surg Res. 1998;79(1):39-46.

Waisman D, Brod V, Dickstein R, Abramovich A, Rotschild A, Bitterman H. Effects of inhaled nitric oxide on lung injury after intestinal ischemia-reperfusion in rats. Shock. 2005; 23(2):150-5 .

Wanner GA, Muller P, Ertel W, Busch CJ, Menger MD, Messmer K. Differential effect of cyclooxygenase metabolites on proinflammatory cytokine release by Kupffer cells after liver ischemia and reperfusion. Am J Surg. 1998; 175(2):146-51.

Wagner FM, Weber AT, Ploetze K, Schubert F, Pfeiffer S, Albrecht S, Schueler S. D Do vitamins C and E attenuate the effects of reactive oxygen species during pulmonary reperfusion and thereby prevent injury? Ann Thorac Surg. 2002; 74(3):811-7.

Wagner JG, Harkema JR, Roth RA. Pulmonary leukostasis and the inhibition of airway neutrophil recruitment are early events in the endotoxemic rat. Shock. 2002; 17 (2):151-158

Ward C, Wong TH, Murray J, Rahman I, Haslett C, Chilvers ER, Rossi AG. Induction of human neutrophil apoptosis by nitric oxide donors: evidence for a caspase-dependent, cyclic-GMP-independent, mechanism. Biochem Pharmacol. 2000; 1;59(3):305-14.

Ward DT, Lawson SA, Gallagher CM, Conner WC, Shea-Donohue T. Sustained nitric oxide production via l-arginine administration ameliorates effects of intestinal ischemia-reperfusion. J Surg. 2000; Res. 89(1):13-9.

Welling, K. L. Acute respiratory distress syndrome. Pathogenesis and therapy of acute pulmonary failure. *Ugeskr Laeger*. 1996;158 (25): 3593-3600.

Wheeler AP, Christman B, Swindell B. Lung dysfunction in sepsis: impact of ibuprofen. *Am. J. Respr. Crit. Care Med*.1998; 157: A115.

Win N, Montgomery J, Sage D, Street M, Duncan J, Lucas G. Recurrent transfusion-related acute lung injury. *Transfusion*. 2001; 41(11):1421-5.

Wu S, Ruan Y, Yin M, Lai W. Research on the Age-Related Changes in the Nitric Oxide Pathway in the Arteries of Rats and the Intervention Effect of Dehydroepiandrosterone. *Gerontology*.2007; 20;53(4):234-237.

Yamamoto H, Sugitani A, Kitada H, Arima T, Nishiyama Ki, Motoyama K, Shiiba M, Kawano R, Morisaki T, Nakafusa Y, Tanaka M. Effect of FR167653 on pancreatic ischemia-reperfusion injury in dogs. *Surgery*. 2001; 129(3):309-17.

Yamagishi Y, Horie Y, Kato S, Kajihara M, Tamai H, Granger DN, Ishii H. Related Articles, Ethanol modulates gut ischemia/reperfusion-induced liver injury in rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2002; 282(4):G640-6.

Yanira LR. Aspectos da resposta inflamatória aguda em linhagens de camundongos selecionados para com Reatividade máxima (AIR_{max}) e mínima (AIR_{min}) obtidas por seleção bidirecional [tese (Mestrado em Imunologia)]. São Paulo (Brasil): Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 1996.

Yao YM, Bahrami S, Redl H, Schlag G. Monoclonal antibody to tumor necrosis factor- α attenuates hemodynamic dysfunction secondary to intestinal ischemia/reperfusion in rats. *Crit Care Med*. 1996; 24(9):1547-53.

Zingarelli B, Yang Z, Hake PW, Denenberg A, Wong HR. Absence of endogenous interleukin 10 enhances early stress response during post-ischaemic injury in mice intestine. *Gut*. 2001; 48(5):610-22.