LUANA BEATRIZ VITORETTI

**Estudo de mecanismos reguladores da inflamação
pulmonar tardia após isquemia e reperfusão
intestinal em ratos**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para obtenção de Título de Doutor em Ciências.

**São Paulo
2014**

LUANA BEATRIZ VITORETTI

**Estudo de mecanismos reguladores da inflamação
pulmonar tardia após isquemia e reperfusão
intestinal em ratos**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para obtenção de Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Farmacologia
Orientador: Wothan Tavares de Lima

Versão original

**São Paulo
2014**

Autorizo a reprodução e divulgação parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

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

reprodução não autorizada pelo autor

Vitoretti, Luana Beatriz.

Estudo de mecanismos reguladores da inflamação pulmonar tardia após isquemia e reperfusão intestinal em ratos / Luana Beatriz Vitoretti. -- São Paulo, 2014.

Orientador: Prof. Dr. Wothan Tavares de Lima.

Tese (Doutorado) – 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: Study of regulatory mechanisms of late lung inflammation after intestinal ischemia and reperfusion in rats.

1. Isquemia e reperfusão 2. Sistema imune 3. Inflamação pulmonar
4. Sinais de perigo 5. Rato I. Lima, Prof. Dr. Wothan Tavares de II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia III. Título.

ICB/SBIB0140/2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Luana Beatriz Vitoretti.

Título da Tese: Estudo de mecanismos reguladores da inflamação pulmonar tardia após isquemia e reperfusão intestinal em ratos.

Orientador(a): Prof. Dr. Wothan Tavares de Lima.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

☐ **Aprovado(a)**

☐ **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

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 – e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **066** nas fls. **104** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) **Wothan Tavares de Lima**, Coordenador(a) da Linha de pesquisa *"Estudo de mecanismos reguladores da inflamação pulmonar tardia após isquemia e reperfusão intestinal em ratos"* do qual participam os(as) alunos **Luana Beatriz Vitoretti, Jônatas de Almeida Bertoni, Evelyn Thaís Fontozzi, Beatriz Golegã Acceturi** e os pesquisadores **Niels Olsen Saraiva Câmara, Ricardo Martins de Oliveira Filho, Ana Cristina Breithaupt Faloppa**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) em **17.05.2011, com validade de 3 anos.**

São Paulo, 23 de maio de 2011.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEUA - ICB/USP

Prof. Dr. ARIEL MARIANO SILBER
Secretário
CEUA - 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 e-mail: cep@icb.usp.br

Of.CEUA. 042.14

São Paulo, 12 de maio de 2014.

REF.: Protocolo nº 066/11.

"Estudo de mecanismos reguladores da inflamação pulmonar tardia após isquemia e reperfusão intestinal em ratos"

Prezado Professor,

Informo que a sua licença para uso de animais em experimentação, constante no protocolo em epígrafe, **foi prorrogada até 17.05.2017.**

Reitero que havendo alteração de metodologia e inserção de novos alunos ao projeto de pesquisa vinculado à referida licença a CEUA/ICB deverá ser informada.

Cordialmente,

Prof. Dr. ANDERSON DE SÁ NUNES
Vice-Coordenador - CEUA-ICB/ /USP

Ilmo.Sr.
Prof. Dr. Wothan Tavares de Lima
Departamento de Farmacologia
Instituto de Ciências Biomédicas - USP

A Cida. Minha mãe, amiga e confidente. Meu maior exemplo de força, sabedoria e garra. A você minha eterna gratidão.

A minha irmã Letícia, que veio a este mundo para nos ensinar a conviver com as diferenças e a superar as dificuldades.

Ao meu marido Jorge pelo amor, carinho, incentivo e apoio em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Wothan pela orientação, ensinamentos, compreensão e pela amizade. Muito obrigada pela oportunidade e anos de convívio.

Ao Prof. Ricardo pelas correções, revisões, ensinamentos e apoio. Que o seu conhecimento e paixão pelo ensino da Farmacologia possam inspirar várias gerações de alunos.

Ao João, meu compadre! Um amigo especial, companheiro de todas as horas. Obrigada por toda ajuda e colaboração neste trabalho.

A Beatriz, minha quase irmã, pela amizade, auxílio, colaborações e baladinhas!

A Adriana, Helory e Zilma pela amizade, auxílio, ensinamentos e harmonioso convívio.

A Ana Paula pela confiança e oportunidade, mas também pela amizade.

A Elke, Débora, Daniela, Renata, Cleyton, Jean, Denis e todos os outros amigos pelas horas de descontração e alívio do estresse.

Ao meu pai Wagner, meu irmão Leandro, minha sogra Cida e minhas cunhadas Sabryna e Camila pela ajuda, apoio e carinho.

A Nany, Nina, Mel e Cindy pelo amor incondicional e companheirismo. Sinto tanta falta de vocês!

Ao Manuel pela dedicação, atenção e cuidados com os animais.

Aos amigos e funcionários do Departamento de Farmacologia pelo convívio e amizade.

Aos membros da banca examinadora pela atenção dispensada na leitura deste trabalho.

A FAPESP e ao CNPq pelo indispensável auxílio financeiro (2011/50522-8 - 477558/2011-9).

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Fisiopatologia da Inflamação Experimental do Departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB/USP), na vigência de auxílios concedidos pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Processo 2011/50522-8 e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) - Projeto Universal, Processo 477558/2011-9.

RESUMO

VITORETTI, L.B. **Estudo de mecanismos reguladores da inflamação pulmonar tardia após isquemia e reperfusão intestinal em ratos.** 2014. 99 f. Tese (Doutorado em Farmacologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Estudos revelam que citocinas e interleucinas geradas no intestino durante o estresse provocado pela I/R intestinal são disseminadas sistemicamente e promovem lesão pulmonar aguda (LPA), que em casos mais graves evolui para a síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA). A resposta inflamatória causada pela I/R intestinal é complexa e diversos estudos consideram o envolvimento da resposta imune nos mecanismos orquestradores da lesão tecidual. De fato, insultos iniciais graves, como na I/R intestinal, podem acarretar deterioração do sistema imune causando um quadro de imunossupressão. Estudos conduzidos durante o mestrado demonstraram que a inflamação pulmonar se altera ao longo dos dias de reperfusão intestinal, sendo que este fenômeno pode estar relacionado com uma infecção desencadeada por um quadro de imunossupressão. Por estas evidências, no presente estudo, investigamos se a inflamação pulmonar observada após vários dias de reperfusão intestinal está relacionada com alterações no sistema imune. Para tanto, ratos machos Wistar anestesiados foram submetidos a obstrução da artéria mesentérica superior por 45 min e a 2 h, 3, 5 ou 20 dias de reperfusão. Após estes períodos, avaliamos a presença de bactérias nos linfonodos mesentéricos e no baço, bem como analisamos se haviam alterações na capacidade fagocítica de células do sistema imune, como neutrófilos e macrófagos. Também determinamos os níveis de mediadores inflamatórios em cultura de macrófagos, de pulmão (explante) e no soro. Bem como a produção de nitritos, de corticosterona, LDH e os chamados sinais de perigo (HMGB-1, ácido úrico, AMPc). Paralelamente, avaliamos a resistência e a elastância do sistema pulmonar ao longo dos períodos de reperfusão intestinal estudados. Tomados em conjunto nossos dados demonstraram que após 5 dias de reperfusão intestinal, encontramos algumas enterobactérias nos linfonodos mesentéricos e que os neutrófilos circulantes estão mais ativos no que diz respeito ao combate a patógenos, ao passo que macrófagos e neutrófilos da cavidade peritoneal não. Neste mesmo período de reperfusão, encontramos aumento de IL-1 β , TNF- α , IL-17, IL-4 e diminuição de IL-10 no explante pulmonar e aumento de IL-1 β , IFN- γ e LDH no soro. Por outro lado, parâmetros como os níveis de nitritos, corticosterona, HMGB-1, ácido úrico, AMPc, bem como a mecânica respiratória, não se alteraram após 5 dias de reperfusão intestinal. Com base no exposto, podemos concluir que os resultados apresentados apontam para a isquemia e reperfusão intestinal como promotora de modificação temporais no organismo. Neste contexto, observamos alterações nos mecanismos regulatórios da inflamação e do sistema imune após 5 dias de reperfusão intestinal. Estas modificações contribuem para a inflamação pulmonar e sistêmica, mas não alteram a função mecânica pulmonar.

Palavras-chave: Isquemia e reperfusão intestinal. Inflamação pulmonar. Sistema imune. Sinais de perigo. Rato.

ABSTRACT

VITORETTI, L.B. **Study of regulatory mechanisms of late lung inflammation after intestinal ischemia and reperfusion in rats.** 2014. 99 p. Thesis (Pharmacology PhD Degree) – Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo, Sao Paulo, 2014.

Studies show that cytokines and interleukins generated in the gut during the stress caused by intestinal I/ R are disseminated systemically and promote acute lung injury (ALI), which in severe cases can progress to acute respiratory distress syndrome (ARDS). The inflammatory response to intestinal I/ R is complex and many studies consider the involvement of the immune system in the mechanisms of tissue injury. In fact, severe initial injury, as in intestinal I/R, may cause deterioration of the immune system leading to immunosuppression. Our previous studies demonstrated that pulmonary inflammation changes over the days of reperfusion, and this phenomenon may be related to an infection due to failure in the immune system. For these evidences, in the present study we investigate if the pulmonary inflammation observed after several days of reperfusion is related to changes in the immune system. Male Wistar rats were subjected to occlusion of the superior mesenteric artery for 45 min and reperfused for 2 h , 3, 5 or 20 days. After these periods, we evaluated the bacterial presence in mesenteric lymph nodes and spleen, as well as we analyzed the phagocytic capacity of immune cells such as neutrophils and macrophages. We also determined the levels of inflammatory mediators in cultured macrophages and lung (explants) and in serum. As well as the levels of nitrite, corticosterone, LDH, and the production of danger signals (HMGB -1, uric acid and cAMP). In parallel, we evaluated the resistance and elastance of the pulmonary system during the periods of reperfusion studied. Taken together our data demonstrated that after 5 days of reperfusion, we can observe some enterobacteraceae in mesenteric lymph nodes and that circulating neutrophils are more effective against pathogens, whereas macrophages and neutrophils from the peritoneal cavity are not . During this period of reperfusion , we observed increase of IL-1 β , TNF- α , IL-17, IL -4 and decrease of IL-10 in lung explant. On the other hand, in serum we found increase of IL-1 β , IFN- γ and LDH . Furthermore, parameters such as the levels of nitrites, HMGB -1, uric acid, cAMP, as well as respiratory function, did not change after 5 days of reperfusion. Based on the foregoing, we can conclude that the results indicate the intestinal ischemia and reperfusion as a promoter of temporal modification. In this context, we observed alterations in regulatory mechanisms of inflammation and immune system after 5 days of reperfusion. These changes contribute to pulmonary and systemic inflammation, but not alter pulmonary mechanical function.

Key words: Intestinal ischemia and reperfusion. Lung inflammation. Immune system. Danger signals. Rat.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) em homogenatos de pulmão	45
Figura 2 - Efeito da I/R intestinal sobre a permeabilidade vascular (PV) pulmonar e intestinal	47
Figura 3 - Número de unidades formadoras de colônias (UFC) bacterianas em amostras de linfonodos mesentéricos e baço	49
Figura 4 - Efeito da I/R intestinal sobre a capacidade fagocítica e burst oxidativo de macrófagos e neutrófilos recuperados do lavado peritoneal	52
Figura 5 - Efeito da I/R intestinal sobre a capacidade fagocítica e o burst oxidativo de monócitos e neutrófilos circulantes	54
Figura 6 - Quantificação de IL-10 em sobrenadante de cultura de macrófagos recuperados do lavado peritoneal.....	56
Figura 7 - Quantificação de TNF- α em sobrenadante de cultura de macrófagos recuperados do lavado peritoneal.....	58
Figura 8 - Quantificação de IL-1 β , TNF- α , IL-17A, IL-6, IFN- γ , IL-10 e IL-4 em sobrenadante de explante pulmonar	61
Figura 9 - Quantificação de IL-1 β , IFN- γ , IL-10, IL-12 e TNF- α em amostras de soro	63
Figura 10 - Quantificação de nitritos (NO ₂) em amostras de explante pulmonar	64
Figura 11 - Quantificação de HMGB-1, AMPc e ácido úrico em amostras de soro	65
Figura 12 - Quantificação de LDH em amostras de soro	66
Figura 13 - Quantificação de corticosterona em amostras de soro.....	67
Figura 14 - Efeito da I/R intestinal sobre a resistência pulmonar	69
Figura 15 - Efeito da I/R intestinal sobre a elastância do tecido pulmonar.....	70

LISTA DE TABELA

Tabela 1 - Identificação bioquímica das bactérias encontradas em amostras de linfonodos mesentéricos (A) e baço (B)	50
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

AE - Azul de Evans

AMPc - Monofosfato cíclico de adenosina

AMS - Artéria mesentérica superior

AP-1 - *activator protein-1*

APCs - Células apresentadoras de antígeno

ATP - Trifosfato de Adenosina

cNOS - Óxido nítrico-sintase constitutiva

CO₂ - Gás carbônico

CREB - *Cyclic adenosine monophosphate Response Element Binding protein*

D.O. - Densidade Óptica

DAMPs - Padrões moleculares associados ao perigo

DCFH - *Dichlorodihydrofluorescein diacetate*

DCs - Células dendríticas

DMEM - Dulbecco's Modified Eagle's Medium

E.P.M. - Erro padrão da média

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

EGF - Fator de crescimento epidermal

ELISA - *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*

e-NOS - Óxido nítrico-sintase endotelial

E_{RS} - Elastância pulmonar

EUA - Estados Unidos da América

Fig. - Figura

h - hora

H₂O₂ - Peróxido de Hidrogênio

HLA - *Human Leukocyte Antigen*

HMGB1 - *High-Mobility Group Box-1*

HSPs - *Heat-Shock Proteins*

HTAB - Brometo de hexadeciltrimetilamônio

i.m. - via intramuscular

i.n. - via intranasal

i.p. - via intraperitoneal

i.v. - via intravenosa

I/R - Isquemia e Reperfusão

ICAM - Molécula de adesão intracelular

ICB - Instituto de Ciências Biomédicas

IFNs - Interferons

IL - Interleucina

i-NOS - Óxido nítrico-sintase induzida

LBA - Lavado broncoalveolar

LDH - Lactato desidrogenase

LFA-1 - *Lymphocyte function-associated antigen 1*

LPA - Lesão pulmonar aguda

LPS - Lipopolissacarídeo

LT - Leucotrieno

MAC-1 - *Macrophage -1 antigen*

MCh - Metacolina

MHC - Complexo principal de histocompatibilidade

min - minuto

MMP: Metaloproteinase de Matriz

MPO- Enzima Mieloperoxidase

NADPH - Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina

NF-κB - Fator nuclear kappa B

NK - Células natural killer

NO - Óxido nítrico

NOS - óxido nítrico-sintase

O₂ - oxigênio

°C - graus Celsius

PAF - Platelet-Activating Factor

PAMPs - Padrões moleculares associados a patógenos

PaO₂ - pressão arterial de oxigênio

PBS - *Phosphate Buffered Saline*

PECAM - *Platelet/Endothelial Cell Adhesion Molecule*

PEEP - Pressão positiva no final da expiração

PG - Prostaglandina

PI - Iodeto de propídeo

PLC - Fosfolipase C

PMA - Forbol 12-miristato 13-acetato

P-selectina: Selectina Plaquetária

PV - Permeabilidade Vascular

RON/ERNs - Espécies reativas de nitrogênio

ROS/EROs - Espécies reativas de oxigênio

RPM - Rotações por minuto

R_{RS} - Resistência do sistema respiratório

s - Segundo

s.c. - Via subcutânea

SAPI - *Staphylococcus aureus* marcada com iodeto de propídeo

SDRA - Síndrome do desconforto respiratório agudo

Sham - Falsa operação

TGF- β - Transforming growth factor β

Th - Linfócito T helper

TLRs - *Toll-like receptors*

TNF - Fator de necrose tumoral

Treg - Linfócito T regulador

TXA - Tromboxana A

USP - Universidade de São Paulo

UTI - Unidade de terapia intensiva

VCAM - *Vascular cell adhesion Molecule*

VEGF - *Vascular endothelial growth factor*

VLA-4 - *Very Late Antigen-4*

SUMÁRIO

1	Introdução	18
1.1	<i>Síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA)</i>	19
1.2	<i>Isquemia e reperfusão intestinal (I/R) e a inflamação pulmonar</i>	23
1.3	<i>Eventos isquêmicos e o sistema imune</i>	29
2	Objetivos	34
3	Material e Métodos	36
3.1	<i>Animais</i>	36
3.2	<i>Indução da isquemia e reperfusão intestinal</i>	36
3.3	<i>Repercussão pulmonar e intestinal após a I/R intestinal</i>	37
3.3.1	<u><i>Determinação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) no pulmão</i></u>	37
3.3.2	<u><i>Avaliação da permeabilidade microvascular pulmonar e intestinal</i></u>	37
3.4	<i>Avaliação da presença de bactérias em amostras de baço e de linfonodos mesentéricos</i>	37
3.5	<i>Determinação da fagocitose e “burst” oxidativo</i>	38
3.6	<i>Cultura de macrófagos do lavado peritoneal</i>	38
3.7	<i>Cultura de tecido pulmonar (explante)</i>	39
3.8	<i>Coleta de soro</i>	39
3.9	<i>Análise dos mediadores inflamatórios gerados pela I/R intestinal</i>	40
3.10	<i>Avaliação dos níveis de nitritos (NO₂)</i>	40
3.11	<i>Quantificação de sinais de perigo</i>	40
3.11.1	<u><i>Ácido úrico e trifosfato de adenosina (ATP)</i></u>	40
3.11.2	<u><i>High mobility group box -1 (HMGB-1)</i></u>	41
3.12	<i>Quantificação dos níveis de lactato desidrogenase (LDH)</i>	41
3.13	<i>Determinação da concentração de corticosterona</i>	42
3.14	<i>Avaliação da mecânica respiratória in vivo</i>	43
3.15	<i>Análise estatística</i>	44
4	Resultados	44
4.1	<i>Caracterização dos efeitos da I/R intestinal sobre o pulmão e o intestino após 20 dias de reperfusão</i>	44
4.1.1	<u><i>Atividade de MPO pulmonar</i></u>	44

4.1.2	<i>Extravasamento do corante Azul de Evans</i>	44
4.2	<i>Efeitos da I/R intestinal no processo de translocação bacteriana</i>	48
4.3	<i>Efeitos da I/R intestinal sobre a fagocitose e o burst oxidativo</i>	51
4.3.1	<i>Leucócitos do lavado peritoneal</i>	51
4.3.2	<i>Leucócitos circulantes</i>	53
4.4	<i>Efeitos da I/R intestinal sobre a produção de mediadores inflamatórios</i>	55
4.4.1	<i>Sobrenadante de cultura de macrófagos peritoneais</i>	55
4.4.1.1	<i>IL-10</i>	55
4.4.1.2	<i>TNF-α</i>	57
4.4.2	<i>Sobrenadante de cultura de fragmentos de pulmão (explante)</i>	59
4.4.3	<i>Amostras de soro</i>	62
4.5	<i>Efeito da I/R intestinal na produção de nitritos em amostras de explante pulmonar</i>	64
4.6	<i>Avaliação da concentração de sinais de perigo (HMGB-1, ácido úrico e AMPc) em amostras de soro</i>	65
4.7	<i>Efeitos do I/R intestinal na liberação de lactato desidrogenase (LDH) no soro</i> ..	66
4.8	<i>Avaliação dos níveis de corticosterona no soro após I/R intestinal</i>	67
4.9	<i>Efeitos da I/R intestinal sobre a mecânica respiratória</i>	68
5	Discussão	71
6	Conclusões	89
	REFERÊNCIAS	90

1 Introdução

1.1 *Síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA)*

O termo síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) foi proposto na literatura médica por Ashbaugh et al. (1967). Os autores descreveram 12 pacientes com dispnéia grave, cianose, hipóxia refratária à oxigenoterapia, perda de complacência pulmonar e infiltrado alveolar difuso. Esta primeira descrição já ressaltava a natureza multi-causal da SDRA: 7 casos ocorreram como resultado de trauma, 4 por pneumonia viral, 1 por aspiração de conteúdo gástrico, 1 por pancreatite e 1 por intoxicação por drogas. Este estudo pioneiro também indicou a existência de alto índice de letalidade na SDRA: 7 mortes em 12 pacientes. Atualmente, a SDRA está associada a índices de mortalidade de aproximadamente 40% (BLANK; NAPOLITANO, 2011; HARMAN, 2012). Li e colaboradores (2011) avaliaram a incidência de SDRA em pacientes internados nas Unidades de Terapia Intensiva (UTIs) da Mayo Clinic, em Olmsted Country, Minnesota, EUA. Os autores observaram que entre os anos de 2001-2008, a incidência de SDRA diminuiu, passando de 81 para 38 casos por 100.000 habitantes/ano. Os autores atribuíram a diminuição da incidência à melhora do suporte clínico ofertado para estes pacientes, que incluía ventilação mecânica adequada, com baixos volumes correntes, aumento do número de médicos intensivistas e melhora nos protocolos de tratamento para sepse e pneumonia. No Brasil, estudos realizados no Centro de Tratamento Intensivo da Unidade de Emergência do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto mostraram que a incidência de SDRA foi de 6,3% em 524 admissões no período de maio de 2001 a abril de 2002 (OLIVEIRA; BASILLE FILHO, 2006). Outro estudo no Hospital das Clínicas de Porto Alegre revelou que esta incidência foi de 2,3% em 1.301 pacientes da UTI (FIALKOW et al., 2002). Embora decorridos quarenta e sete anos da descrição inicial da

SDRA, considerando os avanços no conhecimento de sua fisiopatologia, é notável que o seu tratamento ainda não está totalmente definido e reside, principalmente, na oferta de ventilação mecânica invasiva; todavia, é sabido que estas estratégias ventilatórias podem ter efeito adverso e induzir lesão pulmonar. Estudos vêm sendo desenvolvidos em busca de um padrão de ventilação mecânica protetora, ou seja, com baixo volume corrente associado à PEEP que não cause lesão pulmonar, reduzindo assim a morbidade e mortalidade nesses pacientes (AMATO et al., 2007; BARBAS et al., 2012).

Em 1994, uma Conferência de Consenso Americana-Europeia reuniu especialistas na área para propor novas definições para a lesão pulmonar aguda (LPA) e a SDRA. A SDRA foi definida como uma síndrome decorrente do agravamento da LPA e caracterizada por lesão alveolar difusa, infiltrado bilateral pulmonar no exame radiológico de tórax, ruptura na barreira do epitélio alveolar e comprometimento da troca gasosa pulmonar em pacientes com ausência de hipertensão do átrio esquerdo ou pressão de oclusão da artéria pulmonar menor que 18 mmHg (WARE; MATTHAY, 2001). Segundo este consenso, a LPA e a SDRA se diferenciam apenas no que se refere à gravidade da hipoxemia, sendo que na LPA a relação entre pressão arterial de oxigênio e fração inspirada de oxigênio ($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$) é inferior ou igual a 300 mmHg, enquanto na SDRA esta relação é menor ou igual a 200 mmHg (TSUSHIMA et al., 2009). Estas definições sofreram diversas críticas ao longo dos anos, principalmente em relação aos valores de $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ estabelecidos. Em 2012, estas definições foram revisadas e muitos dos conceitos anteriores foram mantidos. Todavia, foi estabelecido como agudo um período de 7 dias entre a exposição ao fator de risco e o desenvolvimento da doença. Em relação a oxigenação, a SDRA foi dividida em três categorias: leve ($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ 200 mmHg $\leq$ 300 mmHg), moderada (100 mmHg $\leq$ 200 mmHg) e grave ($\leq$ 100mmHg). Por influencias na oxigenação, valores mínimos de PEEP (pressão positiva no final da expiração) de 5 cm

H₂O foram incluídos na definição de SDRA, a fim de excluir pacientes com hipoxemia decorrente de atelectasia. Em relação aos critérios radiológicos, a presença de infiltrado bilateral pulmonar foi mantida, porém recomenda-se o uso de tomografias computadorizadas, ao invés de radiografias, para este tipo de diagnóstico (RANIERI et al., 2012).

A SDRA e a LPA são geralmente causadas por pneumonia, sepse, trauma, aspiração ou múltiplas transfusões (FERGUSON et al., 2005). Quanto à origem são classificadas como direta ou extrapulmonar. Assim, 20% dos casos de LPA/SDRA têm origem pulmonar direta (pneumonia, aspiração), enquanto condições extrapulmonares, como sepse, trauma, choque e queimaduras correspondem a aproximadamente 50% dos casos (BLANK; NAPOLITANO, 2011). O trauma é a principal causa de morte nos primeiros 40 anos de vida, sendo a hemorragia/choque hemorrágico responsável por aproximadamente 40% dos óbitos (DUCHESNE et al, 2010; SOREIDE, 2009). O choque hemorrágico é definido como uma falha circulatória aguda, com perfusão tecidual inadequada e consequente hipóxia celular (LOFTUS, 2010). É importante lembrar que, nos estágios iniciais do choque, o organismo tende a compensar a perda de sangue por meio de sua redistribuição. Nestas circunstâncias, o fluxo sanguíneo é desviado da pele, músculos e território esplâncnico para o coração, pulmão e cérebro (BAILEY et al., 1987; DEFRAIGNE; PINCEMAIL, 1998). Vale lembrar que a região esplâncnica representa de 20 a 40 % do volume total de sangue, constituindo relevante reservatório sanguíneo em casos emergenciais, como na hemorragia (LYNCH; DAUPHINEE, 2005). Muito embora a redistribuição de sangue seja mecanismo de busca da homeostasia, a resultante deste processo de ajuste pode desencadear quadros de isquemia na região mesentérica (GUTIERREZ et al., 2004). A isquemia intestinal, seguida de reperfusão, pode desencadear LPA/SDRA (HUDSON; STEINBERG, 1999; VAN SOEREN et al., 2000),

bem como a inflamação sistêmica e insuficiência múltipla de órgãos e sistemas (IMOS) (MOORE et al., 1994).

A SDRA, embora possa ter início agudamente (6-48 horas após o insulto lesivo), pode persistir por dias e até semanas (HUDSON et al, 1995). Inicialmente, apresenta uma fase denominada exsudativa, caracterizada pela liberação de amplo espectro de mediadores inflamatórios, congestão e expansão da parede alveolar, edema, presença de sangue nos alvéolos, lesão das células epiteliais do tipo I e do endotélio capilar alveolar. Posteriormente, observa-se colapso alveolar, hemorragia e acúmulo de neutrófilos nos capilares alveolares. Estas células são ativadas e liberam mediadores inflamatórios e enzimas, como a elastase e as metaloproteinases de matriz (MMPs), importantes indutoras de lesão tecidual e que participam de forma significativa na fase efetora da SDRA (PUNEET et al., 2005). Num curso natural da resposta inflamatória, advém a fase regenerativa, quando ocorre a recuperação do pulmão para sua estrutura normal. Neste período observa-se, por exemplo, infiltração de miofibroblastos e deposição de colágeno, proliferação das células epiteliais tipo II e crescimento de epitélio. Por fim, caso a lesão alveolar difusa não seja resolvida por meio da regeneração, instala-se a fase reparativa, caracterizada por trombose local e remodelamento vascular (LUCAS, 2007).

A elastase é capaz de causar lesão do endotélio pulmonar e degradar constituintes da matriz extracelular (MORAES et al., 2003). Assim, durante a ativação dos neutrófilos, elastina, colágeno e fibronectina podem ser alvos das ações da elastase contribuindo, portanto, para a lesão da membrana basal pulmonar. Desta forma, é razoável supor que neutrófilos do leito vascular pulmonar de indivíduos com SDRA liberem elastase, interferindo com a interação leucócito-endotélio. De fato, existem estudos indicando que o plasma e o lavado broncoalveolar de pacientes portadores de SDRA apresentam aumento significativo dos níveis de elastase (GROENEVELD et al., 1995). Da mesma forma, os

níveis de MMP-2 e MMP-9 no lavado broncoalveolar de pacientes com SDRA se encontram elevados na fase inicial da doença (RICOU et al., 1996). De fato, aumento na expressão de MMPs pode ser observado em diversas patologias onde a inflamação está presente, sugerindo que estas enzimas podem participar de processos de defesa, lesão, inflamação e reparo (PARKS et al., 2004). No caso de processos inflamatórios, as MMPs podem regular as barreiras físicas e modular a produção de citocinas e quimiocinas em tecidos inflamados, regulando o movimento de leucócitos em locais de infecção ou lesão (LI et al., 2002). Estudos demonstram que em casos de lesão pulmonar, os macrófagos são a principal fonte de produção de MMPs (PARDO et al., 1996).

1.2 Isquemia e reperfusão (I/R) intestinal e a inflamação pulmonar

A isquemia, definida como a diminuição no suprimento de sangue e de oxigênio para um determinado órgão ou tecido, e o restabelecimento da oxigenação com a reperfusão podem desencadear importantes alterações na homeostasia. Uma situação de isquemia e reperfusão (I/R) particularmente perigosa é a isquemia intestinal, a qual pode decorrer de embolia arterial (50 % dos casos), tromboembolismo arterial (25 %), trombose venosa (menos de 10%) ou por processos não oclusivos (20 %) decorrentes de insuficiência cardíaca, choque hemorrágico ou sepse, sendo considerada a forma mais letal de isquemia, com índices de mortalidade de 70 a 100% (DEBUS et al., 2011; YASUHARA, 2005). A obstrução do fluxo da artéria mesentérica superior (AMS) está entre os eventos isquêmicos intestinais com maior capacidade lesiva para o organismo, com índices de mortalidade de 60-80% (DEBUS et al., 2010). Isto porque a AMS em humanos é responsável pelo suprimento de sangue para áreas tais como: pâncreas, intestino delgado e cólon ascendente e transversal. Uma vez instalado, o quadro isquêmico na região mesentérica desencadeia diversas alterações metabólicas, as quais resultam na redução de reservas energéticas,

acúmulo de metabólicos tóxicos e eventualmente necrose tecidual (CERQUEIRA et al., 2005; SUN et al., 2002). As reservas de ATP são rapidamente exauridas, ocorrendo acúmulo tecidual de lactato. Durante a isquemia ocorrem alterações no metabolismo celular que tornam as células acidóticas. Este fato promove ativação de proteases intracelulares, como o NF- κ B e AP-1, que regulam a expressão de genes inflamatórios (PASUPATHY; HOMER-VANNIASINKAM, 2005). Dessa forma, mediadores inflamatórios, tais como o TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IFN- γ ¹, prostaglandinas, bem como espécies reativas de oxigênio (EROs) e nitrogênio (ERNs), gerados no intestino durante a isquemia são, na vigência da reperfusão, disseminados sistemicamente e capazes de promoverem aumento da expressão de moléculas de adesão, recrutamento e ativação de neutrófilos, indução de necrose e apoptose celular, aumento de permeabilidade vascular e edema tecidual (GRANGER; KORTHUIS, 1995; MAXWELL; LIP, 1997; CHOPRA et al., 2009). Tais alterações podem culminar em lesões teciduais locais e distantes do sítio onde foi desencadeada a isquemia (BERTHIAUME et al., 1999). Neste último caso, diversos relatos indicam que indivíduos sob isquemia intestinal, quando submetidos à reperfusão, desenvolvem lesão pulmonar aguda (KISS et al., 2008; KUZU et al., 2002; OLANDERS et al., 2002, VICTONI et al., 2010), podendo o quadro evoluir para a SDRA (VAN SOEREN et al., 2002).

Do ponto de vista celular, neutrófilos e macrófagos exercem papel importante na inflamação pulmonar causada pela I/R intestinal. Além destas células, mastócitos, linfócitos e células estruturais das vias aéreas também favorecem o desencadeamento da lesão pulmonar aguda. É interessante notar que quando ocorre inflamação, os neutrófilos são os primeiros leucócitos a serem recrutados para o sítio de agressão celular, sendo mobilizados rapidamente da medula óssea para a corrente sanguínea. A migração dos

¹ Interferon

neutrófilos do compartimento intravascular para o extravascular ocorre predominantemente nas vênulas pós-capilares. Este mecanismo é mediado por uma combinação de processos: mecânico, químico e molecular (SEELY et al., 2003). Quatro fases distintas da migração dos neutrófilos são descritas: mobilização da medula óssea, marginação e rolamento sobre o endotélio de microvasos, aderência e transmigração do vaso para o tecido inflamado ou infeccionado (KOVACH; STANDIFORD, 2012). Para esses processos de interação leucócito-endotélio, uma série de moléculas de adesão são importantes. Dentre elas destacam-se aquelas pertencentes à família das imunoglobulinas (ICAM-1² e 2, PECAM-1³ e VCAM-1⁴) expressas preferencialmente na superfície de células endoteliais e que se ligam às integrinas (LFA-1⁵, MAC-1⁶ e VLA-4⁷), expressas na superfície de leucócitos. Além destas, as selectinas (E, L e P) também estão envolvidas, participando na adesão inicial de leucócitos ao endotélio (PANES et al., 1999). Neste contexto, mostramos em nosso laboratório que a I/R intestinal aumenta a expressão de ICAM-1 no pulmão, o que, possivelmente, está associado aos efeitos lesivos dos neutrófilos sobre este órgão (CAVRIANI, 2007). Por muito tempo se considerou os neutrófilos sem atividade transcricional e com reduzida capacidade de síntese de proteínas. Eram células conhecidas apenas por participar do processo inflamatório no que se refere à fagocitose e destruição de microorganismos por meio da produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e desgranulação. Entretanto, com a demonstração de que os neutrófilos produzem diversas citocinas, este conceito ficou ultrapassado. Atualmente, sabe-se que durante a inflamação, esses fagócitos migram para o local inflamado,

² Intercellular Adhesion Molecule

³ Platelet/Endothelial Cell Adhesion Molecule

⁴ Vascular Cell Adhesion Molecule

⁵ Lymphocyte function-associated antigen 1

⁶ Macrophage-1 antigen

⁷ Very Late Antigen-4

produzem e secretam diversas citocinas e mediadores lipídicos, como a IL-1 β , o TNF- α , IL-8, eicosanóides e o PAF⁸, que modulam sua função e a de outras células como linfócitos e células endoteliais (KOIKE et al., 2000). Embora os neutrófilos produzam menor quantidade de citocinas e quimiocinas por célula que os macrófagos, considerando o processo inflamatório agudo, essas células também são importantes fontes desses mediadores (ISHII et al., 2000).

Como dito anteriormente, os macrófagos também participam dos mecanismos indutores da lesão pulmonar causada pela I/R intestinal, uma vez que estas células produzem e secretam uma gama de mediadores e indutores da resposta imune e inflamatória, como citocinas, quimiocinas e óxido nítrico, que promovem o recrutamento de neutrófilos para o sítio da inflamação (BORJESSON et al., 2000; MORAES et al., 2008). Estas células podem ser classificadas como M1, macrófagos ativados de maneira clássica, ou M2, quando ativados de forma alternativa, como por exemplo, na presença de IL-4, IL-10, IL-13 e TGF- β (LASKIN et al., 2011). Os macrófagos M1 podem ser ativados por citocinas do tipo 1 (IFN- γ e TNF- α), por sinais de perigo como *heat shock protein* (HSP) e *high mobility group box-1* (HMGB-1) ou após reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), como LPS e lipoproteínas. São células que possuem potente atividade microbicida, anti-proliferativa e citotóxica, isto porque liberam citocinas e lipídeos pró-inflamatórias (IL-12, IL-23, IL-1, IL-6, TNF- α , leucotrienos e prostaglandinas), espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e proteases (elastase, MMPs, collagenase). As atividades dos macrófagos M1 são balanceadas pelos macrófagos M2, que promovem diminuição da inflamação por meio da liberação de citocinas antiinflamatórias fagocitose de neutrófilos em apoptose. Além disso, os macrófagos M2 iniciam o reparo

⁸ Platelet Activating Factor

tecidual, sintetizando mediadores envolvidos no remodelamento e angiogênese (TGF- β ⁹, VEGF¹⁰ e EGF¹¹). Desta forma, um balanço entre os dois tipos de células é imprescindível para o controle da resposta inflamatória. No caso da lesão pulmonar aguda desencadeada por trauma, o que se observa é uma resposta prolongada e exagerada de macrófagos M1, que estão presentes em grande quantidade no tecido pulmonar, e uma deficiência na resposta de células M2. (LASKIN et al., 2011; MORAES et al., 2008). De fato, LaNoue et al. (1998) demonstraram que macrófagos obtidos do lavado broncoalveolar de ratos submetidos à I/R intestinal aumentam a liberação de TXA₂¹², PGE₂¹³, enzimas lisossômicas e fator coagulante. Por outro lado, Souza e colaboradores (2000) observaram que não há alteração significativa do número de macrófagos no lavado broncoalveolar (LBA) após a I/R intestinal.

Os mastócitos também participam da lesão tecidual decorrente da I/R intestinal. Estudos demonstram que a deficiência genética destas células ou sua estabilização com fármacos reduziu o aumento da permeabilidade vascular intestinal e os níveis plasmáticos de lactato desidrogenase (LDH), IL-6 e TNF- α após I/R intestinal (ANDOH et al., 1999; HEI et al., 2008; HUANG et al., 2012). Os mastócitos estão amplamente disseminados no organismo. Revestem os tratos gastrintestinal e respiratório, podendo ser encontrados no epitélio brônquico, em submucosas e nas proximidades dos vasos sanguíneos. Os mastócitos são considerados sentinelas do sistema imunológico, uma vez que estão posicionados de tal maneira que, juntamente com as células dendríticas, rapidamente detectam a presença de patógenos e antígenos, liberando assim, mediadores e citocinas

⁹ Transforming Growth Factor β

¹⁰ Vascular Endothelial Growth Factor

¹¹ Epidermal Growth Factor

¹² Tromboxana A

¹³ Prostaglandina E

pró-inflamatórias e imunomodulatórias (GALLI et al., 1999). Contudo, em situações de dano tecidual são estimulados, liberando amplo espectro de mediadores com atividade pró-inflamatória, como histamina, serotonina, PAF, eicosanóides, óxido nítrico (NO), interleucinas e citocinas e proteases (METCALFE et al., 1997; PERL et al., 2007). Vale lembrar que estas células constituem importante fonte de armazenamento de TNF- α (MCLACHLAN et al., 2003).

Diversos estudos consideram o envolvimento da resposta imune inata no desenvolvimento da lesão tecidual decorrente de I/R intestinal (APRAHAMIAN et al., 2008; EDGERTON et al., 2009). A I/R intestinal pode gerar fragmentos celulares e produtos derivados da degradação de componentes da matriz extracelular (por exemplo: ácido hialurônico, fibrinogênio, fibronectina). Nestas condições, o sistema imune inato é acionado, os receptores do tipo “Toll” (TLR), notadamente os TLR4, são estimulados e se desenvolve uma resposta inflamatória estéril (MOSES et al., 2009). Portento, a inflamação estéril pode se associar à lesão local (intestino), sistêmica e com o desenvolvimento de lesão pulmonar aguda (WARD et al., 2008). Além disso, estudos revelam a participação do sistema imune adaptativo, notadamente linfócitos T e B, na modulação das lesões teciduais causadas pela I/R intestinal. Nestes estudos, os linfócitos estão envolvidos com o recrutamento de neutrófilos para o sítio da isquemia (HURN et al., 2007; LINFERT et al., 2009; SHIGEMATSU et al., 2002). Shigematsu et al. (2002) demonstraram que camundongos SCID¹⁴, quando submetidos à obstrução da artéria mesentérica superior, desenvolvem lesão intestinal de menor magnitude. Possivelmente pela falta de linfócitos T e B, característica desses animais. Um aspecto de interesse é que existem poucos dados acerca do envolvimento de linfócitos, e de seus produtos, na inflamação pulmonar aguda causada pela I/R intestinal (PAMUK et al., 2010). No que concerne ao pulmão, de Perrot et

¹⁴ Severe Combined ImmunoDeficiency

al (2003), reportaram infiltração de linfócitos T CD4+ e aumento de expressão de CD25 no pulmão de ratos submetidos à transplante pulmonar, situação onde ocorre potencial I/R pulmonar. Embora esteja bem estabelecido que eventos isquêmicos intestinais causem disfunção pulmonar, persistem dúvidas acerca dos fatores que medeiam a indução/controle da resposta inflamatória pulmonar após a I/R intestinal.

1.3 Eventos isquêmicos e o sistema imune

Estudos revelam que citocinas e interleucinas geradas no intestino durante o estresse provocado pela I/R intestinal são disseminadas sistemicamente e concorrem para a lesão inflamatória pulmonar (DEITCH et al., 2001). Existem também evidência de translocação bacteriana tanto pela via circulatória quanto pelo sistema linfático mesentérico após a I/R intestinal (BALZAN et al., 2007). Durante a isquemia, a diminuição da oxigenação tecidual promove acidose da mucosa, aumento da permeabilidade vascular e consequentemente injúria epitelial. Quando a reperfusão intestinal tem início, a lesão tecidual pode ser exacerbada levando à lesão microvascular, apoptose e necrose tecidual (BALZAN et al., 2007). Desta forma, a I/R intestinal poderia causar ruptura da barreira da mucosa intestinal, permitindo que bactérias e endotoxinas atravessassem a barreira e entrem em contato com enterócitos e células do sistema imunológico intestinal ativando a resposta inflamatória no intestino (DEITCH et al., 2002; WIEST et al., 2003). É interessante notar que bactérias podem iniciar ou potencializar a lesão em órgãos distantes mesmo quando estão restritas ao interior do intestino ou nos gânglios intestinais e não atingem a circulação sistêmica por serem capazes de promover ativação da resposta intestinal inflamatória (DEITCH et al., 2002). Todavia, a relevância clínica da translocação bacteriana durante o trauma isquêmico intestinal ainda é revestida de dúvidas (FOEX, 2005) Moore e colaboradores (1992 e 1999) afirmam que a presença de bactérias nos linfonodos

mesentéricos não apresenta relevância clínica, uma vez que a translocação bacteriana não ocorre com frequência em humanos. Estudos demonstram que a descontaminação do trato digestório de animais em modelo de choque-hemorrágico acarretou pequenos benefícios na resposta inflamatória (KAHLKE et al., 2002). Além disso, a análise temporal dos eventos desencadeados pela I/R intestinal mostra que a ativação de neutrófilos e a geração de mediadores inflamatórios precedem o aumento nos níveis plasmáticos de endotoxinas (TURNAGE et al., 1994). Estes dados sugerem que o intestino, sob trauma, é importante fonte de mediadores inflamatórios, sendo este fato mais relevante que a translocação bacteriana (DEITCH et al., 1994).

Por outro lado, estudos demonstram que pacientes com SDRA que sobrevivem à inflamação pulmonar inicial podem morrer devido a estímulos secundários como infecção (BHATIA; MOOCHHALA, 2004; BUTT; SHRESTHA, 2008). Admite-se que lesões iniciais graves, como as observadas na I/R intestinal, acarretam deterioração do sistema imune, podendo causar imunossupressão (FLOHÉ et al., 2008). Nestas condições, o risco de infecções no tecido lesado aumenta (KALICKE et al., 2003). Sendo assim, uma resposta imune efetiva contra a infecção requer a interação coordenada de células apresentadoras de antígeno (APCs) com células T (FLOHÉ et al., 2008). Em casos de trauma hemorrágico, observa-se que as células dendríticas se tornam menos responsivas a componentes bacterianos. Enquanto macrófagos peritoneais e esplâncnicos reduzem os níveis de moléculas MHC classe II em sua superfície (AYALA et al., 1990) e têm sua capacidade de liberar IL-12 deprimida. Em conjunto, estes eventos prejudicam o desenvolvimento de resposta Th1 (MCCARTER et al., 1998). Como este tipo de resposta é essencial para a eliminação bacteriana, visto que o IFN- γ ativa fagócitos que eliminarão microorganismos, uma inibição da resposta Th1 poderia acarretar disseminação de bactérias. Mack et al. (1996), mostraram que a supressão da geração e da liberação de

citocinas tipo Th1 em modelo hemorrágico surge a partir de 7 dias da indução da lesão promovida pela fratura de fêmur seguida por hemorragia. Dados recentes do nosso laboratório demonstram que a inflamação pulmonar observada com 2 horas de reperfusão intestinal é revertida após 3 dias do início da reperfusão. Porém, com 5 dias de reperfusão intestinal uma nova onda inflamatória atinge o pulmão (VITORETTI, 2010). Adicionalmente, o tratamento dos animais reperfundidos por 5 dias com antibiótico de amplo espectro foi capaz de prevenir esta inflamação pulmonar (VITORETTI, 2010). Estes dados permitem inferir que uma infecção poderia ser o segundo estímulo responsável pela nova onda inflamatória observada.

Além das alterações sofridas pelo sistema imune descritas anteriormente, casos de trauma, como na I/R intestinal, também promovem alterações nos monócitos. Nestas condições, estas células apresentam falhas na capacidade de reconhecer e eliminar patógenos, assim como supressão na apresentação de antígenos por meio de receptores HLA¹⁵ e na liberação de citocinas (KRAKAUER; OPPENHEIM, 1993). Os receptores HLA são descritos como biomarcadores de infecção (FUMEAUX; PUGIN, 2006; VAN DEN BERK et al., 1997). De fato, estudos demonstraram que pacientes submetidos a neurocirurgia que apresentaram menor expressão do receptor HLA-D desenvolveram infecção. Um possível mecanismo proposto para essa diminuição na expressão do antígeno seria os altos níveis de cortisol encontrados nestes pacientes. O mesmo aconteceu com pacientes submetidos a tratamentos dermatológicos e que receberam altas doses de corticosteróides (ASADULLAH et al., 1995).

Com base no exposto, podemos dizer que a inflamação pulmonar observada após a I/R intestinal pode ser fruto de inflamação estéril ou ser decorrente de infecção. Esta percepção recai sobre o fato de que em ambas as situações observamos similar perfil de

¹⁵ Human Leukocyte Antigen

liberação de citocinas e quimiocinas (MOLLEN et al., 2006). Além disso, sinais de perigo interagem de maneira semelhante com o sistema imune inato quando são liberados ou produzidos por bactérias ou por células sob estresse (GALLUCCI; MATZINGER, 2001). O $\text{TNF-}\alpha$, a $\text{IL-1}\beta$ e componentes intracelulares, como o ATP, são sinais de perigos clássicos (SALLUSTO et al., 1995; SCHNURR et al., 2000). Além destes, é importante reconhecer o papel das HSP, HMGB-1 e do ácido úrico como sinais de perigo gerados tanto no trauma intestinal como na inflamação pulmonar (FLOHÉ et al., 2008; GASSE et al., 2009). O $\text{TNF-}\alpha$ e a $\text{IL-1}\beta$ são citocinas da fase aguda da inflamação secretadas por diversos tipos celulares, principalmente por macrófagos (PASS et al., 1995). O $\text{TNF-}\alpha$ é um potente ativador de neutrófilos, macrófagos e células endoteliais e indutor de mediadores como IL-6 , $\text{IL-1}\beta$ e IL-8 (FACCIOLI et al., 1990). É liberado rapidamente após o estímulo inflamatório e tem importante papel na adesão de leucócitos a células endoteliais (FAFFE et al., 2000; KSONTINI et al., 1998). Diversos estudos demonstraram sua relevância em doenças, como por exemplo na SDRA, artrite reumatóide e doença inflamatória intestinal (CANETTI et al., 2001; HAMACHER et al., 2002; SCHÜTTE et al., 1996), sendo descrito como importante modulador da inflamação e do edema pulmonar ocasionado pela I/R intestinal. Estudos experimentais demonstram o aumento dos seus níveis plasmáticos durante a I/R intestinal (OKUSAWA et al., 1998). Além disso, Koksoy et al. (2001) mostraram que o bloqueio do $\text{TNF-}\alpha$ com anticorpos reduz o infiltrado de neutrófilos e o aumento da permeabilidade vascular pulmonar induzido pela I/R intestinal. No entanto, Soares et al. (2010), demonstraram, em modelo de I/R intestinal, que os níveis de $\text{TNF-}\alpha$ aumentaram em cultura de fragmentos de pulmão, mas não no soro, sugerindo que este mediador não possui papel fundamental na inflamação pulmonar observada neste modelo, demonstrando o complexo papel desta citocina na lesão e inflamação pulmonar aguda pós I/R. A capacidade da $\text{IL-1}\beta$ de potencializar o efeito do $\text{TNF-}\alpha$ durante a

inflamação aguda e crônica é bem descrita na literatura (BRADDOCK; QUINN, 2004). Souza et al. (2003) demonstraram que o bloqueio dos receptores de IL-1 β com antagonista ou com soro anti IL-1 β resulta em significativo aumento na lesão tecidual e letalidade decorrente de I/R intestinal, lançando dúvidas sobre o papel pró-inflamatório desta citocina. Uma possível explicação seria o papel da IL-1 β na indução da IL-10, que por sua vez exerceria ação antiinflamatória modulando o dano pós I/R (SOUZA et al., 2003). Por outro lado, dados do nosso grupo mostraram que os níveis séricos de IL-1 β estão elevados em ratos submetidos a I/R intestinal (CAVRIANI et al., 2007), e que sua neutralização previne a hiporreatividade brônquica induzida pela I/R intestinal (COELHO et al., 2007).

Na vigência da I/R intestinal são observados hipóxia e estresse celular, o que resulta na liberação de ATP (SCHNURR et al., 2000) que isoladamente ou em sinergismo com o TNF- α pode estimular o sistema imune. O ATP exerce seus efeitos em receptores purinérgicos, que constituem uma população heterogênea. Conforme a subclasse de receptor ativado pelo ATP, ocorrerá resposta imunossupressora ou pró-inflamatória (SITKOVSKY; OHTA, 2005). Por exemplo, a ativação do receptor P2X₂ diminui a secreção de citocinas inflamatórias pelos monócitos e macrófagos, enquanto a ativação do receptor P2X₇ aumenta. (TRAUTMANN, 2009). O ATP também exerce efeito quimiotático em eosinófilos, neutrófilos e células dendríticas imaturas (IDZKO et al., 2007). Além de estimular os eosinófilos a liberarem IL-8, potente quimiotático para estas células e para neutrófilos (MYRTEK; IDZKO, 2007). Estudos demonstram que a I/R intestinal diminui a expressão de receptores P2X₂ na superfície de membrana de neurônios dos plexos mioentérico e submucoso, alterando a motilidade intestinal e a secreção de citocinas (PAULINO et al., 2011).

Outro sinal de perigo que exerce efeito quimiotático em neutrófilos, monócitos, macrófagos e células dendríticas é a proteína nuclear *high mobility group box-1* (HMGB-1)

(ABRAHAM et al., 2000; DUMITRIU et al., 2007). Esta proteína é secretada abundantemente por células em necrose, como acontece durante a I/R, enquanto células em apoptose a retém (SCAFFIDI et al., 2002). Além das células em necrose, células *natural killers* (NK), neurônios, enterócitos, células musculares lisas e células endoteliais, quando ativadas, também liberam HMGB-1 (GARDELLA et al., 2002; LOTZE; TRACEY et al., 2005; LIU et al., 2006; PORTO et al., 2006; SEMINO et al., 2007). Estudos demonstraram que lesões promovidas por eventos isquêmicos ativam a cascata inflamatória por meio da liberação de HMGB-1 e que este último ativa o sistema imune inato por meio de receptores *Toll-like 4* (TLR-4) (TSUNG et al., 2005). Interessante notar que o HMGB-1 é descrito como mediador tardio na letalidade induzida por endotoxina, isto porque seu aumento sistêmico é posterior ao rápido aumento de citocinas como IL-1 β e TNF- α . Seu bloqueio com anticorpos diminui os índices de mortalidade observados em casos de sepse e trauma hemorrágico (LEVY et al., 2007; WANG et al., 1999). Neste último caso, estudos demonstram que a concentração sanguínea de HMGB-1 é significativamente maior em pacientes com trauma que o observado em indivíduos saudáveis (FEI et al., 2005). Além disso, Abraham e colaboradores (2000) demonstraram que o HMGB-1 pode, por si só, causar inflamação pulmonar aguda, promovendo acúmulo de neutrófilos, edema intersticial e aumento de citocinas pró-inflamatórias, porém o uso de um anticorpo não foi capaz de prevenir a inflamação pulmonar, indicando que outros mediadores também estão envolvidos. Neste contexto, é razoável supor que o HMGB-1 possa estar envolvido com a inflamação pulmonar observada após 5 dias do início da reperfusão intestinal.

Considerando o exposto, o estresse celular gerado pela I/R intestinal pode desencadear alterações na homeostasia, tornando o organismo suscetível a infecções e comprometer o pulmão ao longo dos dias de reperfusão intestinal.

2 Objetivos

- Elucidar mecanismos envolvidos com a inflamação pulmonar observada 5 dias após o início da reperfusão intestinal.
- Caracterizar a inflamação pulmonar e sistêmica após a I/R intestinal.
- Avaliar a atividade funcional de neutrófilos e monócitos circulantes e macrófagos, bem como de macrófagos e neutrófilos peritoneais após I/R a intestinal.
- Detectar se a I/R intestinal promove translocação bacteriana.
- Verificar se há comprometimento da mecânica respiratória após a I/R intestinal.

3 Material e Métodos

3.1 Animais

Foram utilizados ratos machos adultos da linhagem Wistar (220-250g) provenientes do Biotério Central do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Os animais foram mantidos em condições de temperatura e umidade controladas e ciclo claro/escuro de 12 horas. Tiveram livre acesso à ração e água. Os procedimentos adotados foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais do ICB-USP. Protocolo nº 066, folha 104, livro 2.

3.2 Indução da isquemia e reperfusão intestinal

Os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico (30 mg/kg - intraperitoneal) e xilazina (10 mg/kg - intraperitoneal) e após laparotomia mediana, a artéria mesentérica superior foi obstruída por 45 minutos utilizando-se uma pinça vascular de micro-cirurgia ("Vascu-statt" nº 1001-531, Scalan International). Durante o período de manutenção da isquemia, o abdômen dos animais foi mantido coberto com plástico transparente (15 cm x 10 cm) para minimizar perdas de líquido e de calor causadas pela incisão abdominal. Decorrido o tempo desejado de isquemia intestinal, a pinça vascular foi retirada e a incisão mediana fechada com sutura contínua, em dois planos, com fio de algodão monofilamentar. Após a sutura, os animais receberam uma dose de cloridrato de tramadol (5 mg/kg – intramuscular) e foram mantidos em reperfusão intestinal por períodos de 2 horas, 3, 5 ou 20 dias. Como controle foi utilizado ratos submetidos aos mesmos procedimentos do grupo de isquemia/reperfusão intestinal, excetuando-se o pinçamento vascular (grupo sham). Um terceiro grupo foi constituído de animais não manipulados (grupo basal).

3.3 *Repercussão pulmonar e intestinal após a I/R intestinal*

3.3.1 Determinação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) no pulmão

Após a I/R intestinal, sob anestesia profunda, os animais foram submetidos à eutanásia por dessangramento da aorta abdominal. O leito vascular pulmonar foi perfundido pela artéria pulmonar com 20 ml de PBS. Fragmentos de pulmão foram retirados e pesados e a eles adicionado 1 ml de tampão fosfato pH 6 contendo brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB -0,5%) na presença de 5 mM EDTA. A seguir as amostras foram homogeneizadas em homogeneizador tecidual (Medic Tools®) durante 20 segundos. As amostras foram centrifugadas a 12.500 rpm durante 10 min à 4° C. O sobrenadante obtido foi utilizado para determinar a atividade de MPO. O ensaio de MPO foi conduzido adicionando-se 10 µl da amostra em duplicata em cada poço de uma placa de 96 poços. Em seguida, foram adicionados 200 µl de tampão substrato contendo tampão fosfato pH 6, peróxido de hidrogênio (0,1%) e orto-dianisidina (1,25%). Decorridos 5 minutos, a reação foi paralisada pela adição de 50 µl de azida sódica (1%). A leitura da absorbância foi feita em leitor de ELISA (Bio-Tek Instruments®) em comprimento de onda de 450 nm e os valores de absorbâncias expressos em atividade de MPO por grama de tecido.

3.3.2 Avaliação da permeabilidade microvascular pulmonar e intestinal

A quantificação da permeabilidade vascular foi feita por meio da técnica de determinação da concentração do corante azul de Evans (AE) extravasado no parênquima pulmonar e intestinal (Sirois *et al.*, 1988). Para tanto 25 mg/kg do corante foram injetados via intravenosa 20 minutos antes do tempo de reperfusão intestinal ser completado. Os animais foram submetidos à eutanásia por dessangramento da aorta abdominal e o leito vascular perfundido com PBS pela artéria pulmonar. A seguir, fragmentos dos tecidos foram removidos, limpos e pesados. Um fragmento de cada tecido foi colocado em

formamida (4 ml/g, a 20 ° C por 24 h), enquanto a outra porção foi mantida em estufa a 37 ° C por 72 h para determinação do peso seco dos tecidos. 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 gotejando os valores de DO em curva padrão de azul de Evans. Os valores foram expressos em µg de AE/mg de tecido seco.

3.4 Avaliação da presença de bactérias em amostras de baço e linfonodos mesentéricos

Os procedimentos de isquemia intestinal, bem como a coleta dos tecidos após os períodos de reperfusão, foram realizados dentro do fluxo laminar e utilizando-se materiais estéreis na tentativa de evitar contaminação externa. Amostras de baço e dos linfonodos mesentéricos foram homogeneizadas com 1 ml de PBS estéril. Alíquotas de 200 µl do homogenato foram semeadas em meio Ágar sangue e Ágar MacConkey em duplicata. As placas foram incubadas a 37 ° C por 24 horas. Posteriormente, quantificamos as unidades formadoras de colônia (UFC) e as mesmas foram identificadas utilizando-se kits bioquímicos. O plaqueamento das amostras e a contagem das UFC foram realizados no Laboratório de Imunogenética em colaboração com o Dr. Orlando Garcia Ribeiro Filho e a identificação das colônias e análises bioquímicas foram realizadas no Laboratório de Bacteriologia em colaboração com a Dra Márcia Regina Franzolin, ambos do Instituto Butantan.

3.5 Determinação da fagocitose e “burst” oxidativo

A capacidade fagocítica dos leucócitos obtidos do sangue e da cavidade peritoneal foi analisada utilizando-se citometria de fluxo. Foi utilizado um citômetro de fluxo (FACScalibur Becton Dickinson Immunocytometry Sistem, San Jose, Ca, USA) conectado com um computador (Macintosh Apple, CA, USA). Foram analisados 10.000 eventos

utilizando-se o software Cell Quest Pro (Becton Dickinson Immunocytometry System, San Jose, CA, USA). As subpopulações celulares foram reconhecidas por meio das propriedades FSC (Forward Scatter) e SSC (Side Scatter) do aparelho que avaliam o tamanho e a complexidade interna das mesmas, respectivamente. A fluorescência verde do DCFH foi mensurada a 530 ± 30 nm (detector FL1) e a fluorescência de cor vermelha do *Staphylococcus aureus* marcado com iodeto de propídeo (PI) mensurada a 585 ± 42 nm (detector FL2). A fluorescência verde emitida pelo DCFH foi usada para estimar o *burst* oxidativo das células com SAPI (*Staphylococcus aureus* marcada com iodeto de propídeo) e PMA (forbol 12-miristato 13-acetato). A fagocitose foi estimada pela intensidade média de fluorescência/célula emitida pelo PI. A porcentagem de fagocitose foi calculada através do número de células fluorescentes dividido pelo número total destas células e multiplicado por 100. As fluorescências do PI e do DCFH foram analisadas utilizando-se compensação de fluorescências para corrigir quaisquer interferências de sinais emitidos pelos mesmos. Por meio do Cell Quest Pro® foram analisadas as populações de interesse (macrófagos, neutrófilos), excluindo-se as populações de linfócitos, por meio da análise dos *gates*. Além disso, para todos os experimentos o aparelho foi calibrado com um tubo branco usado como controle de fluorescência basal da célula a ser analisada.

3.6 Cultura de macrófagos do lavado peritoneal

Após os tempos propostos de reperusão intestinal, os animais tiveram a cavidade peritoneal lavada com 20 ml de PBS estéril. As células foram centrifugadas a 1200 rpm, por 5 minutos a 4 ° C e ressuspendidas em 1 ml de meio de cultura DMEM, suplementado com soro bovino fetal (10%) e penicilina/estreptomicina (0,5%). As células foram colocadas em placas de 24 poços por 3 horas a 37 ° C em atmosfera úmida com 5% de CO₂. Em seguida, as células que não aderiram foram lavadas, os macrófagos aderidos

foram descolados, ressuspensos em 1 ml de meio de cultura DMEM e contados em câmara de Neubauer. Para tanto, alíquotas das amostras foram coradas com corante cristal violeta (0,2%) dissolvido em ácido acético (30%). As células foram então cultivadas (2×10^6 células/poço) em meio de cultura com ou sem LPS (100 ng/ml de *Escherichia coli*; 055:B5, Sigma St Louis, MO, USA) por 48 h. O sobrenadante das culturas foi recolhido para quantificação de mediadores inflamatórios.

3.7 Cultura de tecido pulmonar (explante)

Após a eutanásia, o leito vascular pulmonar dos animais foi perfundido com 20 ml de PBS por meio de uma cânula inserida na artéria pulmonar. De cada animal foram obtidos 8 fragmentos de pulmão de tamanho homogêneo (aproximadamente 2×2 mm) que foram cultivados por 4, 24 ou 48 horas em placa de 24 poços (4 fragmentos por poço) em 1 ml de meio DMEM contendo 0,5% de penicilina/estreptomicina a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO_2 . Após estes períodos, o meio de cultura foi retirado e armazenado em freezer -80°C para posterior determinação de mediadores inflamatórios e dos níveis de nitritos. Os fragmentos pulmonares foram colocados em estufa por 72 horas à 37°C para determinação de seu peso seco.

3.8 Coleta de soro

Amostras de sangue foram coletadas da artéria aorta abdominal dos animais submetidos ou não à isquemia/reperfusão intestinal. Após coagulação do sangue, as amostras foram centrifugadas por 5 min a 5000 rpm, o soro coletado e congelado a -80°C para dosagens posteriores.

3.9 *Análise dos mediadores inflamatórios gerados pela I/R intestinal*

Amostras do meio de cultura de macrófagos e do explante pulmonar foram utilizadas para determinação dos níveis de IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF- α , IFN- γ , IL-4 e IL-17A por meio de kits comerciais (Duo Set, R&D System® e eBioscience® para IL-17A). Os ensaios foram conduzidos seguindo as especificações do fabricante e a densidade óptica obtida em leitor de ELISA. Paralelamente, em amostras de soro, foram analisados os níveis de IL-1 β , TNF- α , IFN- γ , IL-12 e IL-10 utilizando-se a metodologia xMap–Luminex (Millipore). Os ensaios foram conduzidos pelo Instituto Genese de Análise Científica.

3.10 *Avaliação dos níveis de nitritos (NO₂)*

Amostras do meio de cultura de fragmentos de pulmão (explante) dos animais submetidos a I/R intestinal foram utilizadas para determinação dos níveis de nitritos (NO₂). A produção de nitritos foi determinada de acordo com o método de Griess. O ensaio foi realizado pela adição de 100 μ l do explante em placas de 96 poços contendo o mesmo volume do reagente de Griess em temperatura ambiente por 10 min. A densidade óptica (540 nm) foi obtida utilizando leitor ELISA automático (Bio-Tek Instruments®) e os níveis de nitritos foram determinados utilizando curva padrão previamente estabelecida de NaNO₂ (0,2 mM– 200 mM).

3.11 *Quantificação de sinais de perigo*

3.11.1 Ácido úrico e trifosfato de adenosina (ATP)

Amostras de soro foram processadas para a quantificação de ácido úrico utilizando metodologia enzimática ou para quantificação indireta da geração de ATP, quantificando seu produto enzimático AMPc. Tanto a determinação do ácido úrico como a quantificação

e AMPc foram realizadas de acordo com as recomendações do fabricante (Labtest Diagnóstica SA e Enzo Life Science Inc., respectivamente).

3.11.2 High mobility group box -1 (HMGB-1)

Amostras de soro foram utilizadas para determinação dos níveis de HMGB-1 por meio de kit comercial (USCN Life Science Inc.). Os ensaios foram conduzidos seguindo as especificações do fabricante e a densidade óptica obtida em leitor de ELISA.

3.12 Quantificação dos níveis de lactato desidrogenase (LDH)

Para determinação da atividade da LDH no soro foi utilizado o “kit” LDH Liquiform® (Labtest Diagnóstica), seguindo as recomendações do fabricante. Em síntese, adicionam-se em uma placa de 96 poços, 30 µl de amostra, 200 µl do reagente de trabalho do kit (solução de NADPH) e a queda da absorbância (340 nm) é medida imediatamente. Foi feita uma leitura inicial (A0) e após 1 minuto realizamos uma leitura final (A1). A atividade da LDH é então calculada subtraindo-se A1 de A0. Uma unidade de LDH corresponde à quantidade de enzima necessária para reduzir 1 unidade de absorbância por minuto a 340 nm da solução de NADPH, nas condições experimentais descritas.

3.13 Determinação da concentração de corticosterona

Para determinar os níveis de corticosterona utilizamos o kit de ELISA da USCN Life Science Inc. Os ensaios foram conduzidos seguindo as especificações do fabricante e a densidade óptica obtida em leitor de ELISA.

3.14 Avaliação da mecânica respiratória in vivo

Decorridos os períodos de reperfusão intestinal, os animais foram novamente anestesiados com pentobarbital sódico (30 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) por via intraperitoneal. Em seguida, os animais foram traqueostomizados e uma cânula metálica (15 Gauge) foi introduzida no orifício da traqueostomia e fixada ao redor da traqueia com fio de algodão. Então, os animais foram conectados por meio da cânula ao aparelho de ventilação mecânica para pequenos animais (*flexiVent*, SCIREQ®, Montreal, Quebec, Canadá) e submetidos à ventilação pulmonar com volume corrente a 10 ml/kg e frequência respiratória de 150 ciclos/minuto. A PEEP (pressão positiva no final da expiração) foi mantida em 3 cmH₂O. Logo após o início da ventilação mecânica, foi administrado pancurônio (1 mg/kg i.p.) para paralisação do diafragma. Os animais foram inicialmente submetidos a duas manobras de recrutamento pulmonar. Os pulmões foram insuflados a partir da capacidade residual funcional até uma pressão de 30 cmH₂O, a fim de homogeneizar todo o pulmão e aerar possíveis regiões atelectasiadas. Foi avaliada a responsividade pulmonar do animal à diferentes concentrações de metacolina (MCh) (doses crescentes de MCh diluídas em PBS – 8, 16 e 32 µg/kg) que foram oferecidas via intra-venosa na jugular do animal. Como controle foi utilizado PBS antes das doses de MCh. A coleta dos dados de resistência e elastância foram realizadas 15 segundos após o término da injeção de cada concentração de MCh, e houve intervalo de 5 minutos entre a injeção de uma concentração e outra. Para a obtenção dos dados de resistência e elastância do sistema respiratório total foi utilizado o modelo unicompartimental (BATES, 1998) que considera o sistema respiratório como um único compartimento (pulmão e caixa torácica) e utiliza a equação do movimento, no tempo:

$$P = R_{rs} \cdot V' + E_{rs} \cdot V + P_0$$

onde P é a pressão na entrada das vias aéreas, R_{rs} é a resistência do sistema respiratório, V' é o fluxo calculado pela derivada do volume, E_{rs} é a elastância das vias aéreas, V é o volume e P_0 é a constante de correção de erros da capacidade residual funcional. Os parâmetros avaliados por este modelo foram R_{rs} (resistência do sistema respiratório) e E_{rs} (elastância do sistema respiratório). Ao fim do experimento, o animal foi submetido à eutanásia por meio da secção da aorta abdominal (dessangramento) e então desconectado do aparelho. Os dados foram analisados utilizando o software *flexiVent*, versão 5.2.

3.15 *Análise estatística*

Os dados das amostras foram submetidos a análise de variância (ANOVA) seguido do teste Tukey. As análises estatísticas foram conduzidas utilizando-se o GraphPad Prism v. 5.0. Os resultados foram expressos como média $\pm$ E.P.M. Valores de $P < 0.05$ foram considerados significativos.

4 Resultados

4.1 Caracterização dos efeitos da I/R intestinal sobre o pulmão e o intestino após diferentes períodos de reperfusão

4.1.1 Atividade de MPO pulmonar

Vale lembrar que os dados acerca da avaliação da atividade de MPO e da permeabilidade vascular após 2 h, 3 e 5 dias de reperfusão foram demonstrados durante o mestrado. Neste trabalho, o período de 20 dias de reperfusão intestinal foi acrescentado com o objetivo de avaliar a inflamação pulmonar após um tempo mais prolongado. Contudo, consideramos que a apresentação da MPO e da permeabilidade vascular de todos os grupos se faz necessária para elucidar os efeitos temporais da I/R intestinal, bem como ajudar no entendimento dos outros resultados apresentados.

Após a isquemia intestinal e 20 dias de reperfusão, a presença de neutrófilos para o pulmão foi quantificada por meio da determinação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO). Na figura 1 (painel A), observamos que após 20 dias de reperfusão intestinal não houve diferença significativa na atividade de MPO pulmonar no grupo I/R em relação aos grupos Basal e Sham.

O painel B representa a infiltração de neutrófilos no pulmão ao longo dos dias de reperfusão intestinal estudados. Como podemos observar, houve aumento na atividade de MPO pulmonar após 2 h de reperfusão intestinal. Após 3 dias de reperfusão estes valores retornaram aos níveis basais, porém após 5 dias encontramos novo aumento na MPO que reduz após 20 dias de reperfusão intestinal.

Figura 1 - Atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) em homogenatos de pulmão

Os grupos representados no painel A consistiram de animais não manipulados (basal), sham (falso-operado) e I/R intestinal, que foram submetidos a 45 min. de isquemia intestinal seguido de 20 dias de reperfusão. Os grupos representados no painel B consistiram de animais basais, sham e I/R intestinal reperfundidos por 2 h, 3, 5 ou 20 dias. Os resultados são expressos como média $\pm$ E.P.M. $P < 0,05$. * P em relação ao grupo basal; ϕ P sham *versus* isquêmico; α P 2 h *versus* outros períodos; ϵ P 3 dias *versus* 5 dias.

4.1.2 Extravasamento do corante Azul de Evans

As alterações na permeabilidade microvascular pulmonar e intestinal, após a I/R intestinal, foi analisada pela técnica do extravasamento do corante Azul de Evans. Os dados foram representados na Figura 2 (painéis A-D)

No painel A observamos que após 20 dias de reperfusão intestinal não houve alteração da permeabilidade vascular pulmonar em relação aos grupos Basal e Sham. Quando comparamos o extravasamento do corante nos diferentes períodos de reperfusão intestinal (Figura 2B), notamos que após 2 h de reperfusão houve aumento significativo da permeabilidade vascular pulmonar e que com 3 dias de reperfusão estes valores retornaram aos níveis basais. Todavia, voltaram a aumentar após 5 dias de reperfusão e mais uma vez diminuíram com 20 dias.

Em relação intestino (Painéis C e D), após 20 dias de reperfusão intestinal observamos aumento na permeabilidade vascular do duodeno nos animais dos grupos Sham e I/R em relação ao Basal (Fig. 2C). A análise temporal dos efeitos da I/R intestinal (Fig. 2D), indicou perfil semelhante ao observado no pulmão, exceto que neste órgão, o aumento da permeabilidade observado após 5 dias de reperfusão se manteve elevado nos animais reperfundidos por 20 dias.

Figura 2 - Efeito da I/R intestinal sobre a permeabilidade vascular (PV) pulmonar e intestinal

A determinação da PV foi feita através da quantificação de azul de Evans extravasado do parênquima. Os grupos representados nos painéis A e C consistiram de animais não manipulados (basal), sham (falso-operado) e I/R que foram submetidos a 45 min de isquemia intestinal seguido de 20 dias de reperfusão. Os grupos representados nos painéis B e D consistiram de animais submetidos a isquemia intestinal e a diferentes períodos de reperfusão (2h, 3,5 ou 20 dias). Os resultados são expressos como média $\pm$ E.P.M. $P < 0,05$. * P em relação ao grupo basal; ϕ P sham versus isquêmico; α P 2 h versus outros períodos; ϵ P 3 dias versus 5 dias; δ P 5 dias versus 20 dias.

4.2 Efeitos da I/R intestinal no processo de translocação bacteriana

De maneira a avaliar se a I/R intestinal promove translocação de bactérias do trato gastrointestinal para os linfonodos mesentéricos e para o baço, amostras desses órgãos foram cultivadas em meio ágar sangue e ágar MacConkey. Posteriormente, avaliamos a quantidade de unidades formadoras de colônias encontradas.

Podemos notar que a quantidade de unidades formadoras de colônias (UFC) encontradas nos homogenatos dos linfonodos mesentéricos, tanto em meio ágar sangue quanto ágar MacConkey, foi maior no grupo I/R 5 dias (Figs. 3A e 3B). Já no baço, encontramos UFC somente após 5 dias do início da reperfusão intestinal (Fig. 3C).

A identificação bioquímica das bactérias encontradas em meio ágar sangue nas amostras dos linfonodos mesentéricos e do baço dos animais reperfundidos por 5 dias revelou a presença de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus sp.* Ao passo que em meio ágar MacConkey encontramos apenas *Escherichia coli* (Tabela 1, painéis A e B). Em relação ao baço, observamos a presença

Vale lembrar que não observamos UFC no grupo Basal, Sham e I/R após 2 h de reperfusão intestinal e no grupo Sham 20 dias.

Figura 3 - Número de unidades formadoras de colônias (UFC) bacterianas em amostras de linfonodos mesentéricos e baço

A determinação do número de UFC foi realizada 24 h após os homogenatos de linfonodos mesentéricos e baço serem semeados em placas com meio Ágar sangue e MacConkey. Os grupos representados consistiram de 6 animais sham (falso-operado) e 6 I/R que foram submetidos a 45 min de isquemia intestinal seguido de 3, 5 ou 20 dias de reperusão. Os resultados são expressos como número de UFC encontradas.

Tabela 1 - Identificação bioquímica das bactérias encontradas em amostras de linfonodos mesentéricos (A) e baço (B)

(A) Linfonodos mesentéricos

Período de reperusão	Grupo	Meios de cultura	
		Ágar sangue	Ágar MacConkey
Bactérias			
3 dias	Sham	<i>Staphylococcus aureus</i>	-----
	I/R	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
5 dias	Sham	<i>Escherichia coli</i>	
		<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>
	I/R	<i>Bacillus sp.</i>	
		<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
20 dias	I/R	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>
		<i>Bacillus sp.</i>	
20 dias	I/R	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>

(B) Baço

Período de reperusão	Grupo	Meios de cultura	
		Ágar sangue	Ágar MacConkey
Bactérias			
5 dias	Sham	<i>Escherichia coli</i>	-----
		<i>Escherichia coli</i>	
	I/R	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>
		<i>Bacillus sp.</i>	

As unidades formadoras de colônias encontradas em meio Ágar sangue e MacConkey dos homogenatos dos linfonodos mesentéricos e baço foram identificadas por meio de testes bioquímicos. Os grupos representados consistiram de sham (falso-operado) e I/R que foram submetidos a 45 min de isquemia intestinal seguido de 3, 5 ou 20 dias de reperusão.

4.3 Efeitos da I/R intestinal sobre a fagocitose e o burst oxidativo

4.3.1 Leucócitos do lavado peritoneal

Neste experimento, a porcentagem de fagocitose representa a quantidade de células que fagocitaram a bactéria *Staphylococcus aureus* marcada com iodeto de propídeo (SAPI), enquanto que a intensidade de fagocitose é o número de bactérias que foram fagocitadas. Em relação ao burst oxidativo, o burst SAPI representa a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) após a fagocitose da bactéria.

A porcentagem e a intensidade de fagocitose de macrófagos recuperados do peritônio (Fig. 4, painéis A e B) aumentaram após 3 e 5 dias de reperfusão intestinal nos grupos Sham e I/R em relação ao encontrado no grupo Basal. Este dado indica que este é um efeito da manipulação/laparotomia e não da I/R intestinal. Em relação burst oxidativo (Fig. 4C), observamos aumento somente após 3 dias de reperfusão. Temporalmente observamos que no 5º dia de reperfusão intestinal a fagocitose e a produção de EROs foi maior que o observado nos grupos 2 h e 20 dias de reperfusão.

Em relação aos neutrófilos, observamos que após 2 h e 20 dias de reperfusão intestinal a porcentagem de fagocitose não se alterou (Fig. 4D), já a intensidade de fagocitose diminuiu (Fig. 4E) e o burst oxidativo aumentou em comparação ao grupo Basal (Fig. 4F). Neste último experimento observamos também que o grupo I/R 2 h apresentou menor produção de EROs que o grupo Sham. Após 3 e 5 dias de reperfusão observamos aumento da porcentagem de fagocitose nos grupos Sham e I/R (Fig. 4D), porém não houve alteração na quantidade de bactérias fagocitadas (Fig. 4E), bem como do burst oxidativo nestes períodos (Fig. 4F). Temporalmente notamos que no 5º dia de reperfusão a fagocitose dos neutrófilos foi maior em relação a 2 h e 20 dias de reperfusão, ao passo que a geração de EROs está reduzida em comparação a estes mesmos períodos.

Figura 4 - Efeitos da I/R intestinal sobre a capacidade fagocítica e burst oxidativo de macrófagos e neutrófilos recuperados do lavado peritoneal

A determinação da fagocitose e do burst oxidativo destas células foi feita utilizando-se citometria de fluxo. Os grupos representados consistiram de animais não manipulados (basal), sham (falso-operado) e I/R que foram submetidos a 45 min de isquemia intestinal seguido de 2 h, 3, 5 ou 20 dias de reperusão. Os resultados são expressos como média $\pm$ E.P.M. $P < 0,05$. * P em relação ao grupo basal; ϕP sham versus isquêmico; αP 2 h versus outros períodos; ϵP 3 dias versus outros períodos; δP 5 dias versus 20 dias.

4.3.2 Leucócitos circulantes

Os dados apresentados na figura 5 (Painéis A-C) revelaram que, após 2 h de reperfusão intestinal, os monócitos apresentaram redução da porcentagem de fagocitose no grupo I/R em comparação ao observado no grupo Sham, sem diferir do grupo Basal. Em relação a intensidade de fagocitose, bem como ao burst SAPI, observamos diminuição nos grupos Sham e I/R em comparação ao encontrado no grupo Basal. Após 3 dias de reperfusão intestinal os parâmetros avaliados não se modificaram. Contudo, no 5^o dia de reperfusão foi possível notar redução na quantidade de monócitos realizando fagocitose, bem como na produção de EROs por estas células nos grupos Sham e I/R. Por fim, após 20 dias do início da reperfusão intestinal observamos redução da intensidade de fagocitose nos grupos Sham e I/R e redução do burst no grupo I/R em relação ao seu respectivo grupo Sham.

A análise temporal revelou que após 5 dias de reperfusão intestinal a porcentagem de fagocitose foi menor que o encontrado nos outros períodos estudados. Ao passo que a intensidade de fagocitose, bem como o burst oxidativo aumentaram neste período em relação aos demais.

Um perfil diferente foi observado em relação aos neutrófilos circulantes (Painéis D-F). Neste caso, observamos redução da porcentagem de fagocitose no grupo I/R após 2 h de reperfusão em relação aos grupos Sham e Basal e diminuição também do burst SAPI em comparação ao encontrado no Sham. Por outro lado, a intensidade de fagocitose e o burst SAPI aumentaram, após 3 e 5 dias de reperfusão, no grupo I/R em relação ao Basal e respectivos grupo Sham. Em contrapartida, após 20 dias de reperfusão intestinal não observamos alterações nos parâmetros aqui estudados.

Figura 5 - Efeito da I/R intestinal sobre a capacidade fagocítica e o burst oxidativo de monócitos e neutrófilos circulantes

A determinação da fagocitose e do burst oxidativo destas células foi feita utilizando-se citometria de fluxo. Os grupos representados consistiram de animais não manipulados (basal), sham (falso-operado) e I/R que foram submetidos a 45 min de isquemia intestinal seguido de 2 h, 3, 5 ou 20 dias de reperusão. Os resultados são expressos como média $\pm$ E.P.M. $P < 0,05$. * P em relação ao grupo basal; ϕ P sham *versus* isquêmico; α P 2 h *versus* outros períodos; ϵ P 3 dias *versus* outros períodos; δ P 5 dias *versus* 20 dias.

4.4 Efeitos da I/R intestinal sobre a produção de mediadores inflamatórios

4.4.1 Sobrenadante de cultura de macrófagos peritoneais

4.4.1.1 IL-10

Macrófagos retirados do lavado peritoneal de animais submetidos ou não à I/R intestinal foram cultivados em meio de cultura por 24 h com ou sem adição de LPS. O sobrenadante coletado foi utilizado para dosagem de alguns mediadores inflamatórios.

Os dados representados na figura 6A indicam aumento dos níveis de IL-10 produzidos pelos macrófagos dos animais I/R reperfundidos por 2 h em relação ao observado no grupo Sham, porém não observamos diferença em relação aos níveis do grupo Basal. Por outro lado, a adição de LPS nestas culturas promoveu aumento de IL-10 nos macrófagos dos animais do grupo I/R em relação aos seus controles. Resultados semelhantes foram observados no grupo reperfundido por 3 dias (painel B). Neste caso, a adição de LPS na cultura de macrófagos dos animais do grupo I/R também promoveu aumento significativo em relação ao observado no grupo I/R sem LPS. Em contraste, os níveis de IL-10 dos macrófagos colhidos dos animais reperfundidos por 5 e 20 dias não diferiram em relação aos outros grupos estudados, além disso, a adição de LPS não alterou estes níveis.

Quando comparamos a liberação de IL-10 pelos macrófagos peritoneais dos animais submetidos à isquemia intestinal com diferentes períodos de reperfusão (Painel E) notamos que não houve diferença significativa entre os grupos estudados, porém quando adicionamos LPS a esta cultura observamos que os níveis deste mediador foram maiores nos macrófagos dos animais reperfundidos por 3 dias em relação aos períodos seguintes de reperfusão estudados.

Figura 6 - Quantificação de IL-10 em sobrenadante de cultura de macrófagos recuperados do lavado peritoneal

Após os períodos desejados de reperusão intestinal os macrófagos peritoneais foram cultivados em meio de cultura com ou sem adição de LPS por 24 h. Os grupos representados consistiram de animais não manipulados (basal), sham (falso-operado) e I/R intestinal submetidos a 45 min. de isquemia intestinal seguido de 2 h, 3, 5 ou 20 dias de reperusão. Os resultados são expressos como média $\pm$ E.P.M. $P < 0,05$. * P em relação ao grupo basal; # P em relação ao grupo basal LPS; $†P$ sham LPS versus I/R LPS; γP I/R versus I/R LPS; ωP 3 dias LPS versus outros períodos.

4.4.1.2 TNF- α

Também foram quantificados os níveis de TNF- α no sobrenadante de cultura de macrófagos peritoneais dos animais submetidos (ou não) a I/R intestinal (Fig. 7). Como pode ser observado, no grupo Basal, a adição de LPS na cultura de macrófagos promoveu aumento dos níveis deste medidor. Além disso, com 2 h, 5 e 20 dias de reperfusão intestinal (painéis A, C e D, respectivamente), os macrófagos dos animais do grupo I/R liberaram níveis menores de TNF- α em relação aos macrófagos dos animais do grupo Sham. Podemos notar também que, após 5 dias de reperfusão intestinal (painel C) os níveis de TNF- α gerados pelos macrófagos dos animais do grupo I/R estimulados com LPS foram menores que no seu respectivo grupo Sham. Ainda, com 20 dias de reperfusão intestinal notamos que a concentração deste mediador nas culturas dos grupos Sham e I/R estimulados com LPS foi menor que o observado no grupo Basal. Todavia, um perfil diferente foi encontrado nas culturas de macrófagos dos animais reperfundidos por 3 dias (painel B). Neste caso, a adição de LPS promoveu, nos macrófagos do grupo I/R, aumento em relação ao encontrado nos grupos Basal, Sham e I/R sem LPS.

A análise geral dos efeitos da I/R intestinal em distintos períodos de reperfusão revelou que não houve diferença significativa nos níveis de TNF- α no sobrenadante de cultura de macrófagos não estimulados com LPS entre os diferentes períodos de reperfusão estudados. Por outro lado, os macrófagos dos animais I/R 3 dias estimulados, quando estimulados com LPS, liberaram níveis significativamente maiores de TNF- α que macrófagos peritoneais obtidos de animais submetidos aos outros períodos de reperfusão intestinal estudados (painel E).

Figura 7 - Quantificação de TNF- α em sobrenadante de cultura de macrófagos recuperados do lavado peritoneal

Após os períodos desejados de reperusão intestinal os macrófagos peritoneais foram cultivados em meio de cultura com ou sem adição de LPS por 24 h. Os grupos representados consistiram de animais não manipulados (basal), sham (falso-operado) e I/R intestinal submetidos a 45 min. de isquemia intestinal seguido de 2 h, 3, 5 ou 20 dias de reperusão. Os resultados são expressos como média $\pm$ E.P.M. $P < 0,05$. * P em relação ao basal; # P em relação ao basal LPS; ϕP sham *versus* I/R; ιP sham LPS *versus* I/R LPS; γP I/R *versus* I/R LPS; ηP 2 h LPS *versus* outros períodos; ωP 3 dias LPS *versus* outros períodos.

4.4.2 Sobrenadante de cultura de fragmentos de pulmão (explante)

Alguns dos dados referentes a concentração de IL-1 β , IL-6 e IL-10 em amostras de explante pulmonar de animais submetidos a 2 h, 3 e 5 dias de reperfusão intestinal foram descritos anteriormente (VITORETTI, 2010). Contudo, sua reapresentação se faz necessária para avaliar de forma mais ampla o perfil temporal de liberação de citocinas, uma vez que o período de 20 dias de reperfusão intestinal foi acrescentado ao presente trabalho. Da mesma forma, complementa a discussão de outros mediadores inflamatórios analisados neste estudo.

Como visto na figura 8 (Painel A), tanto no grupo I/R quanto no grupo Sham, em todos os períodos, houve aumento dos níveis de IL-1 β no explante pulmonar em relação aos valores do grupo Basal. Além disso, os níveis encontrados no grupo I/R, após 2 h e 5 dias de reperfusão foram significativamente maiores que em seus controles. A análise temporal revelou que os valores encontrados no grupo I/R 5 dias foram maiores que o observados nos outros períodos estudados.

No painel B notamos que após 5 dias de reperfusão houve aumento da concentração de TNF- α no explante de pulmão dos animais do grupo I/R em relação aos grupos basal, Sham e I/R 20 dias. Observamos também que a quantidade deste mediador encontrada no explante dos animais I/R 3 dias foi maior que no seu grupo Sham, mas não diferiu do grupo Basal.

A concentração de IL-17A no explante pulmonar aumentou após 2 h e 5 dias de reperfusão em relação ao grupo Basal. Além disso, em 5 dias este aumento também foi significativo em relação ao seu grupo Sham e ao encontrado após 3 dias de reperfusão intestinal (Painel C).

O painel D demonstra que a concentração de IL-6 no explante pulmonar dos animais dos grupos Sham e I/R em todos os períodos, com exceção dos animais reperfundidos por 20 dias, aumentou em comparação ao encontrado no grupo Basal. Em adição, após 2 h de reperfusão, os níveis desta citocina no explante pulmonar dos animais I/R foram maiores que no seu grupo Sham e nos outros períodos estudados.

No painel E observamos que houve aumento dos níveis de IFN- γ no grupo I/R após 2 h de reperfusão intestinal em comparação ao observado nos grupos Basal e I/R 3 dias.

Em relação aos níveis de IL-10 (painel F), podemos observar aumento após 2 h, 3 e 5 dias de reperfusão no grupo I/R em comparação ao grupo basal. O mesmo aconteceu no grupo sham dos dois primeiros tempos estudados. Também observamos que os níveis de IL-10 após 2 h e 5 dias de reperfusão, no grupo isquêmico, foram maiores que o encontrado em seus respectivos grupos sham. Além disso, os níveis de IL-10, nos grupos I/R, diminuiriam ao longo dos dias em relação ao observado com 2 h de reperfusão, sendo que após 20 dias estes valores retornaram aos níveis encontrados no grupo basal.

No painel G notamos aumento dos níveis de IL-4 no grupo I/R após 5 dias de reperfusão em relação aos grupos basal, sham e I/R 3 e 20 dias. Observamos também diferença significativa nos níveis de IL-4 entre os grupos sham e I/R 3 dias.

Figura 8 - Quantificação de IL-1 β , TNF- α , IL-17A, IL-6, IFN- γ , IL-10 e IL-4 em sobrenadante de explante pulmonar

Após os períodos desejados de reperusão intestinal fragmentos de pulmão dos animais foram cultivados em meio de cultura por 4 ou 24 h. Os grupos representados consistiram de animais não manipulados (basal), sham (falso-operado) e I/R intestinal submetidos a 45 min. de isquemia intestinal seguido de 2 h, 3, 5 ou 20 dias de reperusão. Os resultados são expressos como média $\pm$ E.P.M. $P < 0,05$ * P em relação ao grupo basal; ϕ P sham versus isquêmico; α P 2 h versus outros períodos; ϵ P 3 dias versus outros períodos; δ P 5 dias versus 20 dias.

4.4.3 Amostras de soro

Na figura 9 (Painel A) notamos que após 5 dias de reperfusão intestinal os níveis séricos de IL-1 β no grupo I/R foram maiores que os observados em seus controles (Basal e Sham) e nos outros períodos de reperfusão intestinal estudados.

Em relação ao IFN- γ (Painel B), observamos que após 2 h e 20 dias de reperfusão intestinal a concentração deste mediador foi menor grupo I/R em comparação ao encontrado no grupo Sham, sem diferir porém dos valores do grupo Basal. Por outro lado, após 3 e 5 dias notamos que os níveis de IFN- γ no grupo I/R aumentou em relação ao observado no grupo Basal e seus respectivos Sham. Ao longo dos dias de reperfusão podemos observar que o aumento dos níveis de IFN- γ encontrados após 3 dias foram maiores que o observado com 2 h e 20 dias de reperfusão intestinal.

No painel C da figura 9 observamos que a concentração de IL-10 aumentou somente no soro dos animais I/R 3 dias, quando comparado aos valores do grupo Basal. Este aumento foi significativo também em relação ao encontrado após 5 e 20 dias de reperfusão intestinal.

Em relação a IL-12 (Painel D) e ao TNF- α (Painel E) notamos que a I/R intestinal não promoveu alterações em seus níveis séricos em nenhum dos períodos estudados.

Figura 9 - Quantificação de IL-1 β , IFN- γ , IL-10, IL-12 e TNF- α em amostras de soro

Após os períodos desejados de reperusão intestinal, amostras de sangue foram coletadas da artéria aorta abdominal, centrifugadas e armazenadas em freezer -80° C. Os grupos representados consistiram de animais não manipulados (basal), sham (falso-operado) e I/R intestinal submetidos a 45 min de isquemia intestinal seguido de 2 h, 3, 5 ou 20 dias de reperusão. Os resultados foram expressos como média $\pm$ E.P.M. $P < 0,05$. * P em relação ao grupo basal; ϕ P sham *versus* isquêmico; ϵ 3 dias *versus* outros períodos.

4.5 Efeito da I/R intestinal na produção de nitritos em amostras de explante pulmonar

Podemos observar na figura 10 que a I/R intestinal promoveu redução na concentração de nitritos no explante pulmonar dos animais reperfundidos por 2 h em relação ao encontrado no grupo Basal. Nos demais tempos de reperfusão não houve alteração.

É interessante notar ainda que no grupo Sham, nos primeiros períodos estudados (2 h e 3 dias), existe uma tendência ao aumento dos níveis de nitritos, ao passo que após 5 dias estes valores começam a decair e são significativamente menores que o observado no grupo Basal. Por outro lado, no grupo I/R observamos uma tendência de aumento de nitritos no explante pulmonar ao longo dos dias de reperfusão intestinal.

Temporalmente, observamos que a redução de nitritos observada após 2 h de reperfusão foi significativa em relação ao encontrado com 5 dias de reperfusão intestinal.

Figura 10 - Quantificação de nitritos (NO_2) em amostras de explante pulmonar

Após os períodos desejados de reperfusão intestinal, fragmentos de pulmão dos animais foram cultivados em meio de cultura por 24 h. Os grupos representados consistiram de animais não manipulados (basal), sham (falso-operado) e I/R intestinal submetidos a 45 min. de isquemia intestinal seguido de 2 h, 3, 5 ou 20 dias de reperfusão. Os resultados são expressos como média $\pm$ E.P.M. $P < 0,05$. * P em relação ao grupo basal; ϕP sham versus isquêmico; αP 2 h versus outros períodos.

4.6 Avaliação da concentração de sinais de perigo (HMGB-1, ácido úrico e AMPc) em amostras de soro

A concentração da proteína "High Mobility Group Box-1" (HMGB) observada no grupo I/R após 3 e 5 dias de reperfusão foi maior que o encontrado em seus respectivos grupos Sham, que apresentaram diminuição dos níveis em relação ao grupo Basal (Fig. 11, Painel A) Nos demais períodos, a I/R intestinal não alterou as concentrações da HMGB-1. Temporalmente observamos que os níveis desta proteína reduziram no grupo I/R 3 e 20 dias em relação ao encontrado com 2 h de reperfusão (Fig. 11A).

Em relação aos níveis de ácido úrico e AMP cíclico no soro dos animais não encontramos diferenças significativas entre os grupos estudados (painéis B e C).

Figura 11 - Quantificação de HMGB-1, AMPc e ácido úrico em amostras de soro após I/R intestinal

Após os períodos desejados de reperfusão intestinal o sangue dos animais foi colhido, centrifugado e o soro recolhido para dosagens posteriores. Os grupos representados consistiram de animais não manipulados (basal), sham (falso-operado) e I/R intestinal submetidos a 45 min. de isquemia intestinal seguido de 2 h, 3, 5 ou 20 dias de reperfusão. Os resultados são expressos como média $\pm$ E.P.M. $P < 0,05$. * P em relação ao grupo basal; ϕP sham versus isquêmico; αP 2 h versus outros períodos; δP 5 dias versus 20 dias.

4.7 Efeitos do I/R intestinal na liberação de lactato desidrogenase (LDH) no soro

A análise da concentração de LDH no soro dos animais (Fig. 12) revelou que 5 e 20 dias após a reperfusão intestinal houve aumento significativo dos níveis desta enzima no soro dos animais isquêmicos quando comparado com o encontrado no grupo Basal e em seus respectivos grupos Sham. O aumento observado nestes períodos de reperfusão também foi significativamente maior que o encontrado nos períodos anteriores de reperfusão intestinal.

Figura 12 - Quantificação de LDH em amostras de soro

Após os períodos desejados de reperfusão intestinal o sangue dos animais foi colhido, centrifugado e o soro recolhido para posterior dosagem. Os grupos representados consistiram de animais não manipulados (basal), sham (falso-operado) e I/R intestinal submetidos a 45 min. de isquemia intestinal seguido de 2 h, 3, 5 ou 20 dias de reperfusão. Os resultados são expressos como média $\pm$ E.P.M. $P < 0,05$. * P em relação ao grupo basal; ϕP sham versus isquêmico; αP 2 h versus outros períodos; ϵP 3 dias versus outros períodos.

4.8 Avaliação dos níveis de corticosterona no soro após I/R intestinal

A análise dos níveis de corticosterona no soro dos animais revelou que não houve diferença significativa entre os grupos estudados (Fig. 13).

Figura 13 - Quantificação de corticosterona em amostras de soro

Após os períodos desejados de reperusão intestinal o sangue dos animais foi colhido, centrifugado e o soro recolhido para dosagem. Os grupos representados consistiram de animais não manipulados (basal), sham (falso-operado) e I/R intestinal submetidos a 45 min. de isquemia intestinal seguido de 2 h, 3, 5 ou 20 dias de reperusão.

4.9 Efeitos da I/R intestinal sobre a mecânica respiratória

Nesta série de estudos, realizamos a análise da resposta máxima de resistência e elastância do sistema respiratório dos animais frente à administração intravenosa de metacolina (MCh) após o tempo desejado de I/R intestinal. Os dados estão representados das figuras 14 e 15, respectivamente.

Observamos que a I/R intestinal não alterou a resistência após 2 h de reperfusão (Fig. 14, Painel A). O mesmo fenômeno foi observado após 5 dias de reperfusão intestinal (Painel C). Em contrapartida, observamos que na ausência de estímulo com MCh, ou seja, somente com administração de PBS, o grupo I/R 3 dias apresentou aumento da resistência, quando comparado com o observado nos grupos Basal e Sham (Painel B). Em adição, após 20 dias de reperfusão (Painel D), também notamos aumento da resistência no grupo I/R em relação ao grupo Basal. A infusão intravenosa de 8 e 16 $\mu\text{g/kg}$ de MCh promoveu aumento significativo na resistência do grupo I/R 20 dias em relação ao Sham, porém sem diferir dos valores encontrados no grupo basal.

Temporalmente, observamos que o aumento da resistência obtido no grupo I/R 3 dias foi significativo em relação aos outros períodos de reperfusão estudados (Painel E).

Com relação a elastância pulmonar, nossos dados revelaram aumento no grupo I/R 2 h em relação ao Basal e Sham após administração de PBS ou 8 $\mu\text{g/kg}$ de MCh. Todavia, com o aumento da concentração de MCh, não observamos esta diferença entre os grupos (Fig. 15, Painel A). Notamos ainda que após 5 dias de reperfusão, com administração de PBS, houve redução da elastância no grupo I/R em comparação aos valores encontrados no grupo Sham (Painel C). Por outro lado, após 3 e 20 dias de reperfusão, não foi possível detectar alterações na elastância (Painéis B e D).

No painel D observamos que a elastância não se alterou ao longo dos diferentes tempos de reperfusão intestinal estudados.

Figura 14 - Efeito da I/R intestinal sobre a resistência pulmonar

Após os períodos desejados de reperfusion intestinal, os animais foram conectados ao *FlexiVent* para avaliação da mecânica respiratória. Os grupos representados consistiram de animais não manipulados (basal), sham (falso-operado) e I/R intestinal submetidos a 45 min. de isquemia intestinal seguido de 2 h, 3, 5 ou 20 dias de reperfusion. Os resultados são expressos como média $\pm$ E.P.M. *P em relação ao grupo basal; ϕ P sham *versus* isquêmico; α P 2 h *versus* outros períodos; ϵ P 3 dias *versus* 5 dias.

Figura 15 - Efeito da I/R intestinal sobre a elastância do tecido pulmonar

Após os períodos desejados de reperfusão intestinal, os animais foram conectados ao *FlexiVent* para avaliação da mecânica respiratória. Os grupos representados consistiram de animais não manipulados (basal), sham (falso-operado) e I/R intestinal submetidos a 45 min. de isquemia intestinal seguido de 2 h, 3, 5 ou 20 dias de reperfusão. Os resultados são expressos como média $\pm$ E.P.M. **P* em relação ao grupo basal; ϕP sham *versus* isquêmico.

5 Discussão

Os dados apresentados neste estudo referem-se à avaliação temporal de mecanismos reguladores da inflamação pulmonar decorrente de eventos isquêmicos intestinais seguidos de sua reperfusão. Para tanto, utilizando como modelo experimental ratos Wistar, induzimos a oclusão da artéria mesentérica superior por 45 minutos e analisamos quatro períodos de reperfusão intestinal (2 h, 3, 5 ou 20 dias). Inicialmente, complementamos a caracterização das repercussões pulmonares e intestinais da I/R após 20 dias de reperfusão, uma vez que os outros períodos já haviam sido avaliados (VITORETTI, 2010). Estes estudos ficaram circunscritos à quantificação indireta de neutrófilos no pulmão por meio da atividade da enzima mieloperoxidase e à avaliação da permeabilidade vascular pulmonar e intestinal. Este parâmetros foram utilizados porque segundo trabalho publicado em 2010 pela Sociedade Americana de Tórax (American Thoracic Society - ATS) (MATUTEBELLO et al., 2010), alterações na permeabilidade microvascular pulmonar e aumento da atividade da MPO, dentre outros parâmetros, são indicativos de lesão pulmonar aguda (ALI) em modelo animal. Os resultados indicaram que após 20 dias não há mais infiltração de neutrófilos nem aumento da permeabilidade vascular no pulmão, como observado após 5 dias. Todavia, no intestino (duodeno) a permeabilidade vascular continua aumentada em relação ao Basal. Sob o ponto de vista temporal, estes dados sugerem que os neutrófilos ativados e recrutados para o pulmão após 2 h de reperfusão intestinal, possam, após 3 dias, terem sido removidos por apoptose/fagocitose deixando assim, o sítio inflamatório. Contudo, com 5 dias de reperfusão intestinal novas ondas inflamatórias surgem, promovendo um novo evento inflamatório no pulmão. Decorridos 20 dias de reperfusão intestinal a inflamação parece ter sido resolvida. Esta inflamação observada com 5 dias de reperfusão pode estar relacionada com mecanismos acionados pelo

organismo ao longo dos dias para modular a inflamação. Acreditamos que no transcorrer dos dias de reperfusão intestinal alguma alteração na imunidade dos animais possa ocorrer deixando o indivíduo mais suscetível. Estudos demonstram que lesões teciduais graves, como as observadas na I/R intestinal, podem promover supressão progressiva da imunidade durante a primeira semana após o trauma intestinal (FLOHÉ et al., 2008; MANNICK et al., 2001). Como exemplo de supressão, podemos citar os monócitos, que têm sua capacidade de reconhecer e eliminar patógenos diminuída (KRAKAUER; OPPENHEIM, 1993). Esta falha na resposta imune pode contribuir para o desenvolvimento de sepse, que é considerada uma das principais causas de morte em pacientes que sobrevivem a lesões iniciais, como a inflamação pulmonar desencadeada por processos de I/R e choque hemorrágico (DEITCH, 1992). Em nossos estudos, acreditamos que a inflamação pulmonar tardia desencadeada pelo trauma intestinal pode ser exacerbada por falhas no mecanismo de combate a patógenos. Dados anteriores revelaram que o tratamento dos animais reperfundidos por 5 dias com pentabiótico foi capaz de reverter a inflamação pulmonar, caracterizada pelo aumento da MPO, da permeabilidade microvascular e de mediadores pró-inflamatórios no pulmão (VITORETTI, 2010), levantando assim a hipótese de uma possível translocação bacteriana e falhas no sistema imune, mesmo após dias do início da reperfusão intestinal.

Inicialmente, avaliamos em nosso modelo o fenômeno de translocação bacteriana. Dessa forma, analisamos a presença de bactérias no baço e nos linfonodos mesentéricos (LNMs) após a I/R intestinal. Observamos maior quantidade de unidades formadoras de colônia (UFC) no homogenato dos linfonodos dos animais reperfundidos por 5 dias em comparação aos outros períodos de reperfusão. As bactérias encontradas foram *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus sp.* A translocação de bactérias do lúmen intestinal para os LNMs foi amplamente estudada por diversos autores (Deitch,

Miller, Schlag e Rush), principalmente em modelo de choque hemorrágico. O fato é que a isquemia ou a hipoperfusão intestinal, associadas a restauração do fluxo sanguíneo (reperfusão), promovem lesão tecidual. Como consequência ocorre perda da barreira epitelial permitindo assim que bactérias e endotoxinas cruzem a mucosa intestinal e ativem a resposta inflamatória no intestino. É interessante notar que a maioria das bactérias translocadas é fagocitada pelas células imunes, porém, uma parte pode escapar e ser aprisionada nos LNMs, onde também induzem inflamação ao estimularem a produção de citocinas e mediadores inflamatórios por estes órgãos. Dessa forma, as bactérias podem contribuir para a inflamação sistêmica, promover ou potencializar a lesão a órgãos distantes, como o pulmão, sem, necessariamente, alcançarem a circulação (DEITCH, 2002). Estudos afirmam que os linfonodos mesentéricos são os primeiros e talvez os únicos órgãos a conterem bactérias translocadas do intestino. Porém, com o aumento da gravidade da lesão, bactérias podem ser encontradas no fígado e baço e em último caso na circulação (MOORE, 1999). Vale ressaltar que encontramos UFCs no homogenato de baço somente dos animais I/R 5 dias, o que sugere que neste período de reperfusão a lesão/inflamação é de maior magnitude. Vale ressaltar que Steinberg (2003) afirma em seu trabalho que a constância com que a translocação bacteriana é vista em modelo animal, não é a mesma observada na clínica, sendo inapropriado relacionar a sepse ou a múltipla falência de órgãos com a translocação bacteriana em humanos. De fato, Deitch et al. (1989) encontraram bactérias nos LNMs de 10 dos 17 pacientes submetidos à cirurgia para desobstrução intestinal e somente em 1 dos 25 que foram submetidos a laparotomia, porém nenhum dos pacientes com culturas positivas apresentou complicações infecciosas, sepse ou falência de órgãos. Da mesma forma, Moore e colaboradores (1992) demonstraram a presença de bactérias no sangue de 32% dos pacientes em choque submetidos a laparotomia de emergência, em contraste com 12% dos pacientes que não estavam em

choque. A bactéria mais encontrada nestas amostras foi o *Staphylococcus aureus*. Da mesma maneira que Deitch et. al. (1989), Moore e seus colaboradores não detectaram infecção nesses pacientes. Diante desses fatos, os autores afirmam que as manifestações clínicas da sepse devem-se mais a liberação de mediadores endógenos do que a presença de bactérias ou seus produtos (DEITCH et. al., 1989; MOORE et. al., 1992). Nossos dados também indicaram a presença da bactéria *Staphylococcus aureus*, mas é interessante notar que a *Escherichia coli* foi mais frequente em nossas amostras. A *E. coli* é constituinte da flora intestinal, porém é considerada o principal organismo entérico patogênico e frequentemente sua presença se associa a infecções em pacientes hospitalizados e enfermos (WIEST e RATH, 2003). Já a *Staphylococcus aureus* é a principal causa de infecções em pele e nos chamados tecidos moles, como tendões e ligamentos. A *S. aureus* também é responsável por infecções musculoesqueléticas, endocardites e complicações em casos de pneumonia (BARON, 1996; MCNEIL, 2014). Em relação aos *Bacillus spp*, também encontrados em nossos estudos, eles estão associados a bacteremia/septicemia, meningites, endocardites e infecções do trato respiratório, urinário e gastrointestinal (BARON, 1996). Com base no exposto, podemos sugerir que as bactérias encontradas podem estar envolvidas com a inflamação pulmonar observada após 5 dias de reperfusão intestinal, uma vez que estas estimulam a liberação de mediadores inflamatórios que podem atingir o pulmão, sem a necessidade de estas bactérias estarem na circulação sanguínea.

Dando continuidade, analisamos a capacidade fagocítica e o burst oxidativo de macrófagos e neutrófilos peritoneais e monócitos e neutrófilos circulantes de animais submetidos a diferentes períodos de reperfusão intestinal. Estas células, atuando como fagócitos, liberam enzimas proteolíticas e produzem, durante o burst respiratório, por meio do complexo fagocítico NADPH oxidase (LAMBETH, 2004), espécies reativas de oxigênio (ROS), as quais apresentam efeitos antimicrobiano (BORREGAARD, 2010;

NATHAN, 2006). Os dados obtidos da fagocitose dos neutrófilos e dos macrófagos recuperados do peritônio dos animais I/R 5 dias revelaram aumento da fagocitose, sem alteração do burst oxidativo em relação ao grupo basal, sugerindo uma deficiência na ação bactericida destas células. Este dado é importante, uma vez que macrófagos intestinais desempenham importante papel no processo de translocação bacteriana. Bactérias *E. coli* atravessam a lamina própria e são engolfadas por macrófagos, que então transportam as bactérias para os linfonodos mesentéricos e as deixam lá se sua atividade microbicida estiver comprometida (WUEST e RATH, 2003). Portanto, esta suposta falha na ação microbicida de macrófagos e neutrófilos peritoneais, após 5 dias de reperfusão intestinal, pode estar relacionada com a presença de *E. coli*, assim como de outras bactérias, nos LNMs desses animais. Vale ressaltar que como não observamos diferença entre os grupos I/R e seu Sham após 5 dias de reperfusão intestinal, estes resultados podem ser decorrentes da laparotomia e não somente da I/R, porém, se levarmos em consideração os valores do grupo Basal, que representam um indivíduo que não sofreu qualquer tipo de interferência, estes dados se revestem de importância adicional, pois demonstram que manipulações no intestino são, por si só, capazes de promoverem alterações nas funções de macrófagos e neutrófilos peritoneais.

Prosseguindo com a avaliação da fagocitose, observamos que a I/R intestinal após 3 e 5 dias de reperfusão estimulou os neutrófilos circulantes a aumentarem a quantidade de bactérias fagocitadas, bem como o seu burst oxidativo. Estes dados nos indicam que nestes períodos de reperfusão, os neutrófilos estão mais ativos que nos outros tempos estudados, podendo, dessa maneira, controlar uma possível infecção sistêmica. Além disso, observamos que a I/R intestinal age de forma diferente na fagocitose de neutrófilos peritoneais e circulantes, diminuindo a ação dos primeiros e estimulando a fagocitose nos segundos. Em relação aos monócitos, nossos dados revelaram que os animais I/R e Sham,

após 5 dias da reperfusão intestinal, apresentaram menor fagocitose que o observado no grupo Basal e nos outros períodos estudados. Em contrapartida, mostraram aumento do burst induzido pela fagocitose da bactéria SAPI. Estes dados sugerem que os poucos monócitos que estão aptos a fagocitar estão com sua atividade microbicida exacerbada. Em conjunto, os dados sobre as alterações promovidas pela I/R intestinal na capacidade fagocítica de leucócitos, bem como a presença de bactérias nos LMNs, podem estar associados com a inflamação pulmonar observada nos animais I/R 5 dias, já que as bactérias ou suas endotoxinas estimulam a liberação de mediadores inflamatórios, podendo gerar inflamação pulmonar.

Ainda nesta linha de raciocínio, estudos relatam que após algum tipo de trauma ou lesão, macrófagos peritoneais e esplâncnicos sofrem alterações e têm sua capacidade de liberar TNF- α , IL-1 β ou IL-6 suprimida após estimulação *in vitro* com lipopolissacarídeo (LPS) (RANI et al., 2006). Com base no exposto, avaliamos possíveis alterações na liberação de mediadores inflamatórios após I/R intestinal pelos macrófagos peritoneais cultivados com ou sem adição de LPS. Nossos resultados demonstraram que somente os macrófagos dos animais Basais e dos animais reperfundidos por 3 dias aumentaram a liberação de TNF- α quando estimulados *in vitro* com LPS. Em relação aos níveis de IL-10 este fenômeno aconteceu com os macrófagos dos animais com 2 h e 3 dias de reperfusão intestinal. Estes dados nos indicam que os macrófagos dos animais I/R 3 dias estão com sua capacidade de liberar citocinas preservada. Por outro lado, o fato de os macrófagos dos animais reperfundidos por 5 e 20 dias não alterarem a produção desses mediadores inflamatórios, quando induzidos por LPS, nos sugere uma supressão na liberação de mediadores que são importantes para a atividade microbicida destas células, o que pode tornar o organismo suscetível a infecções. Xu et al. (1998) demonstraram diminuição na liberação de citocinas pelos macrófagos peritoneais e esplâncnicos mesmo após 7 dias do

trauma seguido de choque hemorrágico, retornando ao normal após 10 dias. No nosso estudo, observamos essa diminuição no 5º dia, permanecendo mesmo após 20 dias do início da reperfusão intestinal. Existem ainda estudos demonstrando que no trauma hemorrágico, os macrófagos também apresentam supressão na capacidade de induzir ativação de células T, por conta da diminuição dos níveis de moléculas MHC classe II em sua superfície. Esta redução na apresentação do antígeno pode se desenvolver logo após o trauma e se manter ao longo dos dias (AYALA et al, 1990; MCCARTER et al., 1998; REDMOND et al, 1992). Nossos resultados mostraram ainda que a I/R intestinal não foi capaz de alterar a produção de IL-10 e TNF- α pelos macrófagos peritoneais. Em contraste, Souza et al. (2000) demonstraram aumento na liberação de TNF- α por macrófagos alveolares de animais após 2 h I/R intestinal. Esta discrepância pode estar relacionada à origem dos macrófagos, que no nosso estudo foram recuperados do peritônio.

Uma questão que nossos estudos procura responder recai sobre a conexão intestino/pulmão. Neste processo, já avaliamos o papel do sistema linfático como transportador de mediadores inflamatórios e o pulmão como produtor destes mediadores (explante pulmonar) (BREITHAUPT-FALOPPA et. al., 2011; CAVRIANI et. al., 2005, SOARES et. al., 2010). Estes estudos foram realizados em períodos menores de reperfusão intestinal (2 ou 4 h). Assim, dando continuidade com a avaliação temporal da liberação de mediadores inflamatórios em diferentes compartimentos envolvidos com a inflamação causada pela I/R intestinal, avaliamos a presença de alguns mediadores no meio de cultura de explantes pulmonares e no soro. A ideia é considerar que o pulmão, uma vez estimulado pelas citocinas inflamatórias derivadas do intestino, ative células residentes que liberam substâncias quimiotáticas, outros mediadores e amplificam a secreção dessas citocinas. Nossos resultados mostraram que tanto a falsa operação quanto a I/R intestinal promoveram aumento nos níveis de IL-1 β no explante pulmonar de todos os períodos de

reperfusão intestinal estudados em relação aos níveis dos animais basais. Temporalmente, observamos aumento progressivo dos níveis desta citocina até 5 dias após o início da reperfusão intestinal, decaindo com 20 dias de reperfusão. Por outro lado, no soro dos animais observamos aumento da concentração de IL-1 β somente no grupo I/R 5 dias em relação a seus controles e aos outros períodos avaliados. Com base nestes dados podemos inferir que a inflamação pulmonar ao longo dos dias de reperfusão intestinal é mais significativa que a inflamação sistêmica, com exceção do 5^o dia de reperfusão intestinal, quando observamos elevados níveis de IL-1 β em ambos os compartimentos. Em conjunto, estes resultados sugerem que esta citocina, participando da inflamação pulmonar, ativa neutrófilos, regula a expressão de moléculas de adesão nos leucócitos e em células endoteliais e suprime a apoptose de vários tipos celulares, incluindo os neutrófilos. Esta ideia é reforçada por estudos que relatam que a IL-1 β desempenha um papel fundamental na lesão local e remota ocasionada pela isquemia e reperfusão de membros posteriores (SEEKAMP; WARD, 1993). Além disso, dados do nosso grupo mostraram que os níveis séricos de IL-1 β estavam elevados em ratos submetidos a 2 h de I/R intestinal (CAVRIANI et al., 2007), e que a neutralização da IL-1 α circulante reduziu a hiperreatividade brônquica induzida pela I/R (COELHO et al., 2007), constituindo o sistema linfático um importante elo entre a IL-1 β gerada pela I/R e a inflamação pulmonar observada, via geração local de NO. Dados temporais obtidos anteriormente (VITORETTI, 2010) confirmam este fato, uma vez que a concentração de IL-1 β aumentou na linfa dos animais após I/R intestinal. Vale lembrar que o aumento de IL-1 β sérico descrito por Cavriani et. al. (2007) após 2 h de reperfusão intestinal não foi observado em nossos estudos, uma possível explicação seria a diferença de metodologia empregada, uma vez que utilizamos o xMap–Luminex (Millipore) e não kits Duo Set.

Um aspecto interessante é que a IL-1 β potencializa os efeitos do TNF- α durante a inflamação (BRADDOCK; QUINN, 2004). No diagnóstico da SDRA, a presença inicial e persistente destas citocinas é indicador de um prognóstico ruim (PARSONS et. al., 2005). De fato, estudos demonstram que a neutralização do TNF- α com anticorpos reduz inflamação induzida pela I/R intestinal (GERLACH et al., 2014; KOKSOY et al., 2001). Em nosso modelo, observamos aumento desta citocina no explante pulmonar dos animais I/R após 5 dias de reperfusão intestinal, o que pode estar relacionado com o aumento da MPO e da permeabilidade vascular pulmonar encontrada neste mesmo período. Estudos relatam que macrófagos alveolares residentes quando são estimulados produzem IL-1 β e TNF- α , estas citocinas estimulam células vizinhas a produzirem quimiocinas que medeiam o recrutamento de neutrófilos, monócitos e linfócitos para o espaço alveolar (CROSS; MATTHAY, 2011). Além disso, o TNF- α é descrito como importante modulador da inflamação e do edema pulmonar ocasionado pela I/R intestinal (DADA; SZNAJDER, 2007). Contudo, não encontramos diferenças significativas nos níveis desta citocina no soro. Dados semelhantes foram relatados por Okudan et al. (2013) em ratos reperfundidos por 2 h e por Soares e col. (2010) em camundongos C57Bl/6. Neste último, os autores, observaram aumento de TNF- α no explante pulmonar, mas não no soro após 4 h de reperfusão intestinal. O mesmo foi observado por Gimenes-Júnior (2013) e Speyer et al. (2005) em modelo de inflamação pulmonar ocasionada por instilação intranasal de LPS. Por outro lado, Cavriani et al. (2007) demonstraram importante aumento dos níveis desta citocina no soro de ratos reperfundidos por 2 h. Entretanto, neste trabalho, o ensaio citotóxico com células L-929 foi usado para a determinação da concentração de TNF- α , ao passo no presente estudo utilizamos a metodologia xMap–Luminex, o que pode gerar diferenças nos resultados obtidos. Desta forma, podemos concluir que os dados da

literatura são controversos acerca do papel do TNF- α na inflamação sistêmica ocasionada pela I/R intestinal.

Com relação à quantificação de IL-6 observamos, que tanto no grupo I/R intestinal quanto no grupo Sham, em todos os períodos (com exceção de 20 dias) tivemos aumento dos níveis desta citocina no explante pulmonar. Notamos ainda que após 2 h de reperfusão os níveis de IL-6 detectados no explante pulmonar do grupo I/R foram maiores que o observado em seu grupo Sham e nos outros períodos estudados. Em relação aos níveis séricos, não foi possível detectar a presença desta interleucina no modelo estudado. Vale lembrar que a IL-6 é considerada marcador de gravidade da SDRA (BOUROS et al., 2004; REMICK et al., 2002). E consideramos portanto que os altos níveis de IL-6 encontrados no explante pulmonar após 2 h de I/R intestinal podem modular a resposta inflamatória. Visto que a IL-6 participa da inflamação regulando a proliferação celular, diferenciação e maturação de leucócitos, células T citotóxicas, produção de proteínas de fase aguda e apoptose (FAN et al., 2008). Estudos no nosso laboratório revelaram que o bloqueio das isoformas da NOs acarreta aumento de IL-6 na linfa durante o período de isquemia (BREITHAUPT-FALOPPA et al., 2009).

Dentre as citocinas pró-inflamatórias que participam da lesão tecidual intestinal e pulmonar decorrente da I/R intestinal, a IL-17 vem ganhando espaço (EDGERTON et al., 2009). Esta citocina é produzida pela célula T helper 17 (Th17), neutrófilos e pelas células de Panet encontradas no intestino (LEE et al., 2013). A IL-17 participa da resposta imune contra diversas infecções, assim como está ligada a doenças inflamatórias e autoimunes (OUYANG et al., 2008) porque participa do processo de recrutamento e ativação de neutrófilos para o sítio da inflamação (KOLLS; LINDEN, 2004). Estudos conduzidos por LEE et al. (2013) sugerem que as células de Panet são importantes fontes de IL-17 após I/R intestinal, induzindo a expressão de outros genes pró-inflamatórios, como IL-8, TNF- α

e IL-1 β , promovendo assim inflamação sistêmica e lesão em órgãos distantes como o pulmão. Em nosso modelo, observamos que houve aumento dos níveis de IL-17 no explante pulmonar após 2 h e 5 dias de reperfusão intestinal, períodos onde notamos também aumento da MPO pulmonar, sugerindo assim uma relação entre estes fenômenos. Além disso, os resultados demonstram que os níveis de IL-17 encontrados no explante dos animais I/R após 5 dias de reperfusão foram maiores que o observado nos outros períodos estudados. Este dado, somado ao fato que neste período também encontramos altos níveis de IL-1 β e TNF- α , pode sugerir a importante participação destes mediadores e das células T na inflamação pulmonar observada neste período.

De fato, estudos mostram que lesões teciduais promovidas pela I/R intestinal podem ser mediadas, em parte, pelos linfócitos T e B (OSMAN et al., 2008; SHIGEMATSU et al., 2002). Nessa linha de pensamento, o IFN- γ e outras citocinas derivadas dos linfócitos têm demonstrado diferentes contribuições em diversos modelos de I/R (BURNE et al., 2001; YILMAZ et al., 2006). Osman e colaboradores (2008) mostraram que animais knockout para IFN- γ apresentam redução do recrutamento de células para a microcirculação intestinal após I/R intestinal, sugerindo importante papel desta citocina neste modelo. Os dados apresentados neste estudo mostraram que somente o pulmão dos animais reperfundidos por 2 h apresentou aumento na secreção de IFN- γ . Por outro lado, observamos aumento de IFN- γ no soro dos animais I/R 3 e 5 dias em relação aos seus controles (sham e basal). Os dados encontrados no soro podem sugerir uma resposta sistêmica do organismo para diminuir a susceptibilidade a infecções, uma vez que o IFN- γ aumenta a capacidade de apresentação de antígeno, ativa fagócitos e induz a síntese de enzimas responsáveis pelo burst oxidativo (SCHINKEL, 2003). O IFN- γ promove ainda a diferenciação de linfócitos T e B. Na sua presença, células T CD4 se diferenciam em linfócitos do tipo Th1.

Avaliando ainda os efeitos das citocinas do tipo Th1 em nosso modelo e com base no fato de que a IL-12 pode estar associada aos altos índices de mortalidade observados após isquemia/reperfusão (JEDYNAK et al., 2011), analisamos sua concentração sistêmica. A forma biologicamente ativa desta citocina é a IL-12p70, uma proteína formada pelas subunidades p35 e p40. Ela é secretada principalmente por monócitos, macrófagos e células dendríticas após estimulação com, por exemplo, LPS e TNF- α (LYAKH et al., 2008). Em nosso modelo, não encontramos alterações nos níveis séricos de IL-12 após a I/R intestinal em nenhum dos períodos estudados. Ao passo que não analisamos a presença desta citocina no explante pulmonar. Jedynak e colaboradores (2011) afirmam em seus estudos que a diminuição da produção de IL-12 pode agir de forma protetora, prevenindo a inflamação sistêmica observada na I/R. Dessa forma, a ausência de alterações na concentração de IL-12 após a I/R intestinal pode sugerir um mecanismo compensatório do organismo, afim de balancear a produção de citocinas pró e antiinflamatórias, visto que a IL-12 estimula o IFN- γ e a produção de citocinas tipo Th1, que em excesso produzem uma inflamação exagerada com consequente lesão tecidual.

Dessa forma, a ação antiinflamatória das citocinas é essencial para o organismo atingir o equilíbrio e manter as atividades vitais. Dentre estas citocinas, podemos destacar a IL-10, que inibe a síntese de diversas citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias como o TNF- α , participando também da regulação da resposta imune humoral atenuando o recrutamento de neutrófilos (SOUZA et al., 2003). A administração exógena de IL-10 confere efeito protetor a animais submetidos a I/R do miocárdio e previne a letalidade induzida por endotoxemia (GERARD et. al., 1993; HAYWARD et. al., 1997). Por outro lado, estudos realizados por Zingarelli et al. (2001) demonstraram que camundongos com deleção do gene da IL-10 são mais susceptíveis a lesões intestinais relacionadas à I/R intestinal. Além disso, pacientes com SDRA apresentam menor nível de IL-10 no sangue e

no lavado broncoalveolar do que aqueles que têm risco, mas não desenvolvem a doença (ARMSTRONG et al., 1997). Em nossos estudos, observamos redução de IL-10 no explante dos animais isquêmicos ao longo dos dias de reperfusão e aumento no soro após 3 dias de reperfusão intestinal. No geral, estes dados, somados aos obtidos após 5 dias de reperfusão intestinal no explante pulmonar (aumento de IL-1 β , TNF- α e IL-17) nos permitem sugerir a existência de uma complexa rede de geração de mediadores inflamatórios, onde ocorre um desequilíbrio entre mecanismos pró e antiinflamatórios, possivelmente responsável pela inflamação pulmonar observada no 5^o dia de reperfusão, uma vez que a diminuição de IL-10 pode exacerbar a lesão tecidual devido ao aumento de TNF- α e IL-1 β no pulmão e soro.

Em uma visão alternativa, avaliamos a presença de citocinas do tipo Th2 e suas ações antiinflamatórias. Nesta linha de pensamento, enquanto a IL-10 suprime diversas respostas dos macrófagos, a IL-4 e a IL-13, por exemplo, exercem efeitos antagonistas sobre a ativação destas células pelo IFN- γ , (CONSTANT; BOTTOMLEY, 1997). Em nossos estudos observamos que a produção de IL-4 em explante pulmonar foi maior nos animais I/R após 5 dias de reperfusão. Estes dados nos sugerem que esta citocina pode estar agindo na tentativa de controlar a resposta inflamatória pulmonar exacerbada neste período de reperfusão e que existe uma inclinação para uma resposta do tipo Th2, visto que a IL-4, juntamente com a IL-5 são as principais citocinas para o desenvolvimento deste tipo de resposta. Marques e colaboradores (2006) demonstraram que a lesão renal decorrente de I/R em camundongos knockout para IL-4 foi maior que a observada em animais knockout para IL-12, demonstrando a importância do balanço Th1/Th2 de liberação de citocinas no controle da inflamação. MacConmara et al. (2001) descrevem, ainda, as células T regulatórias (Tregs) como as principais fontes destas citocinas em pacientes que sofreram lesões severas de diferentes etiologias, como queimaduras e

quedas. Este efeito supressivo das Tregs sobre a resposta Th1 foi muito maior 7 dias após as lesões em comparação com o observado 1 dia após a lesão ou nos pacientes saudáveis.

Dando continuidade à análise de mediadores inflamatórios envolvidos com as disfunções pulmonares promovidas pela I/R intestinal, podemos ainda citar o óxido nítrico (NO). Esta molécula pode promover hipotensão, hiporresponsividade a agentes constritores e lesão na mucosa intestinal (WANG et al., 2001). Estudos sugerem que a I/R intestinal reduz a atividade da oxido nítrico sintase constitutiva (cNOS), aumentando a forma induzida (iNOS). Este desbalanço entre as isoformas pode estar associado a inflamação pulmonar observada após eventos isquêmicos (WARD et al., 2000). Em nosso modelo observamos redução dos níveis de nitritos no explante pulmonar dos animais I/R após 2 h de reperfusão intestinal. Este fato pode estar associado à inflamação pulmonar observada neste período, uma vez que evidências sugerem que o nitrito não é somente um produto do metabolismo do NO, mas que em condições de hipóxia, o nitrito é reduzido a NO, portanto, segundo esta linha de pensamento, redução dos níveis de nitrito podem significar também que ele foi usado para produzir mais NO (GLADWIN et. al. 2005; LUNDBERG et. al., 2009). Sugimoto et al. (2012) relataram que o tratamento com nitrito em ratos em modelo de transplante pulmonar diminuiu os níveis de citocinas, o infiltrado de neutrófilos/macrófagos, assim como a atividade de MPO no pulmão. Sugerindo, portanto, que o NO, gerado pelo nitrito, possui, neste caso, efeito anti-inflamatório. Vale lembrar que Breithaupt-Faloppa et al. (2013), sugerem que o NO endógeno pode ter tanto efeitos anti, quanto proinflamatórios, dependendo das diferentes isoformas da NOs (NO sintase) ativadas. Da mesma forma, Cavriani et. al. (2004) demonstrou que durante a I/R intestinal, a iNOs e a cNOs apresentaram efeitos distintos na modulação da inflamação pulmonar. O bloqueio da iNOs reduziu o aumento da permeabilidade microvascular pulmonar, ao passo que o bloqueio das duas isoformas pelo L-NAME exacerbou o

acúmulo de neutrófilos, o extravasamento plasmático e os níveis séricos de TNF- α , além de promover a morte dos animais, demonstrando a importância do equilíbrio dos níveis de NO durante a I/R intestinal.

Como discutido, a inflamação envolve a geração de diversos mediadores inflamatórios que podem causar lesão tecidual e ativar o sistema imune inato e adaptativo, todavia, sinais endógenos originados de células sob estresse, lesão ou necrose também são reconhecidos como perigo ao organismo e podem ativar o sistema imune (MATZINGER, 1994). Estes sinais endógenos são conhecidos como alarminas ou padrões moleculares associados ao perigo (DAMPs) e podem acionar mecanismos moduladores da inflamação após o trauma (BIANCHI, 2007; HARRIS; RAUCCI, 2006). Os DAMPs possuem similaridades estruturais e funcionais com os chamados PAMPs (padrões moleculares associados a patógenos) de microorganismos, contudo promovem uma resposta no organismo conhecida como inflamação estéril (HIRSIGER et al., 2012; MATZINGER, 1994). Dentre as chamadas alarminas podemos citar as proteínas de choque térmico (HSPs), o ácido úrico, a proteína HMGB-1 (high mobility group box protein 1), a adenosina, IL-1 α , entre outras (BIANCHI, 2007). Com base no exposto, avaliamos se a I/R intestinal pode alterar os níveis séricos de HMGB-1, ácido úrico, AMPc. Observamos que, diferentemente de outros estudos que apontam importante papel destas alarminas na I/R e na inflamação pulmonar (ABRAHAM et al., 2000; KOJIMA et al., 2012; LEVY et al., 2007; OGURA et al., 2012), em nosso modelo de I/R intestinal não houve alteração dos níveis séricos dessas alarminas. Em relação a concentração de HMGB-1, acreditamos que não encontramos diferenças pois, é sabido que células em apoptose, como acontece após a I/R intestinal, retêm HMGB-1 (LOTZE; TRACEY et al., 2005) ou ainda porque a análise sistêmica desta alarmina não tenha sido a melhor opção. Eventualmente, encontraremos alterações avaliando seus níveis no pulmão, como ocorreu com alguns mediadores

inflamatórios analisados em nosso modelo.

Também não observamos diferença nos níveis séricos de corticosterona. Os corticoides protegem o organismo de uma reação exagerada do sistema imune frente a infecções ou processos inflamatórios. Eles inibem o NF- κ B, a AP-1 e a transcrição de diversas citocinas importantes na patologia da SDRA (ROCCO et al., 2003). É interessante notar que Keh e colaboradores (2003) não observaram diferença no nível plasmático basal de cortisol em pacientes com choque séptico. De acordo com Silverman e Sternberg (2012), mesmo que os níveis circulatórios de glicocorticoides estejam normais, danos no controle de contra-regulação da resposta imune podem ocorrer em nível celular e molecular.

Em contrapartida, observamos aumento da lactato desidrogenase (LDH) no soro dos animais isquêmicos após 5 e 20 dias do início da reperfusão intestinal. Estes dados podem sugerir que ocorreu lesão tecidual. A LDH é uma enzima expressa em diversos órgãos e tecidos e na ocorrência de lesão isquêmica ocorre perda da integridade celular e liberação da enzima, o que resulta na redução da atividade da LDH no tecido lesado e aumento da atividade no sangue. Por conta disso, esta enzima, assim como a fosfatase alcalina, a creatinina fosfoquinase, e outras, tem sido consideradas marcadores séricos de isquemia intestinal (VAN NOORD, et al., 2011). Como esta enzima foi detectada no soro tardiamente após a isquemia, e levando-se em consideração o perfil inflamatório observado em nosso modelo, acreditamos que o pulmão possa ser o órgão alvo da lesão.

Com base em estudos clínicos demonstrando que a lesão pulmonar após o trauma pode estar acompanhada de distúrbios obstrutivos e restritivos (NEFF et al., 2003), investigamos se a inflamação pulmonar ocasionada pela I/R intestinal poderia alterar a mecânica pulmonar em nosso modelo. Distúrbios orgânicos que modificam a estrutura normal do tecido pulmonar ou das vias aéreas podem provocar alterações importantes na

mecânica respiratória. Nossos resultados revelaram que a I/R intestinal aumentou a resistência do sistema respiratório dos animais com 3 dias de reperfusão intestinal quando comparado aos valores dos grupos Basal, Sham e outros períodos de reperfusão. Todavia, apesar da administração de MCh ter aumentado a resistência no pulmão dos animais, não observamos diferenças significativas entre os grupos. Em relação à elastância, notamos aumento no pulmão dos animais I/R após 2 h de reperfusão em relação aos seus controles, tanto após a administração de PBS, quanto de 8 µg/kg de MCh. A dose de 32 µg/kg de MCh promoveu aumento da elastância em todos os grupos experimentais, mas não houve diferença entre os mesmos. Apesar de não havermos investigado neste trabalho, sugerimos que os resultados de resistência basal observados após 3 dias de reperfusão possam estar relacionados com o aumento na produção de fibronectina e colágeno tipo I e IV observadas em estudos anteriores (VITORETTI, 2010) o que poderia aumentar a resistência do tecido pulmonar. Em relação ao aumento da elastância após 2 h de reperfusão intestinal, podemos inferir que sua elevação está correlacionado com o aumento da permeabilidade pulmonar encontrada neste período (VITORETTI, 2010). Dados similares foram observados por Melo e colaboradores (2013). De acordo com esses autores, houve aumento da elastância no pulmão de animais submetidos a instilação de LPS. Por outro lado, a ausência de diferenças significativas entre os grupos após a infusão de MCh pode ser relacionada com o uso, para coleta dos dados, do modelo unicompartimental. Este modelo considera o sistema respiratório como um compartimento único e pode ter influenciado na falta de diferença significativa entre os resultados de cada grupo. O modelo unicompartimental, embora torne o cálculo mais simples e menos sujeito à desvios-padrão, não considera importantes diferenças entre os microambientes pulmonares, uniformizando, e provavelmente compensando, possíveis discrepâncias de valores de resistência e elastância existentes nos distintos compartimentos do sistema respiratório.

Finalmente, tomados em conjunto, os resultados apresentados neste estudo apontam para a isquemia e reperfusão intestinal como promotora de modificação temporais no organismo. Neste contexto, observamos alterações nos mecanismos regulatórios da inflamação e do sistema imune após 5 dias de reperfusão intestinal. Estas modificações contribuem para a inflamação pulmonar e sistêmica, mas não alteram a função mecânica pulmonar.

6 Conclusões

- A I/R intestinal contribui para a translocação de bactérias entéricas para os linfonodos mesentéricos.
- A I/R intestinal altera a função de fagócitos de maneira diferente ao longo dos dias de reperfusão intestinal.
- A lesão pulmonar observada após 5 dias de reperfusão intestinal está associada aos elevados níveis de mediadores proinflamatórios liberados pelo pulmão e encontrados na circulação.
- A reação pulmonar inflamatória observada após 5 dias de reperfusão não está acompanhada de alterações sistêmicas de alarminas e corticóides.
- A inflamação pulmonar promovida pela I/R intestinal não afeta a mecânica respiratória.

REFERÊNCIAS*

-
- ABRAHAM, E.; ARCAROLI, J.; CARMODY, A.; WANG, H.; TRACEY, K. J. HMG-1 as a mediator of acute lung inflammation. **J. Immunol.**, v. 165, p. 2950–2954, 2000.
- AMATO, M. B. P.; CARVALHO, C. R. R.; ISOLA, A.; et al. Mechanical ventilation in Acute Lung Injury (ALI)/Acute Respiratory Discomfort Syndrome (ARDS). **J. Bras. Pneumol.**, v. 33 Supl 2, p. S119–S127, 2007.
- ANDOH, A.; KIMURA, T.; FUKUDA, M.; ARAKI, Y.; FUJIYAMA, Y.; BAMBIA, T. Rapid intestinal ischemia-reperfusion injury is suppressed in genetically mast cell-deficient Ws/Ws rats. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 116, p. 90-93, 1999.
- APRAHAMIAN, C. J.; LORENZ, R. G.; HARMON, C. M.; DIMMIT, R. A. Toll-like receptor 2 is protective of ischemia-reperfusion-mediated small-bowel injury in a murine model. **Pediatr. Crit. Care Med.**, v. 9, n. 1, p. 105-109, 2008.
- ARMSTRONG, L.; MILLAR, A. B. Relative production of tumor necrosis factor alpha and interleukin 10 in adult respiratory distress syndrome. **Thorax**, v. 52, n. 5, p. 442-446, 1997.
- ASADULLAH, K.; WOICIECHOWSKY, C.; DOCKE, W. D. Very low monocytic HLA-DR expression indicates high risk of infection—immunomonitoring for patients after neurosurgery and patients during high dose steroid therapy. **Eur. J. Emerg. Med.**, v. 2, p. 184–190, 1995.
- ASHBAUGH, D. G.; BIGELOW, D. B.; PETTY, T. L.; LEVINE, B. E. Acute respiratory distress in adults. **Lancet**, v. 2, p. 319-323, 1967.
- AYALA, A.; LEHMAN, D. L.; HERDON, C. D.; CHAUDRY, I. H. Mechanism of enhanced susceptibility to sepsis following hemorrhage. Interleukin-10 suppression of T-cell response is mediated by eicosanoid-induced interleukin-4 release. **Arch. Surg.**, n. 129, p. 1172–1178, 1994.
- AYALA, A.; PERRIN, M. M.; CHAUDRY, I. H. Defective macrophage antigen presentation following hemorrhage is associated with the loss of MHC class II (Ia) antigens. **Immunology**, v. 70, p. 33–39, 1990.
- BALZAN, S.; DE ALMEIDA QUADROS, C.; DE CLEVA, R.; ZILBERSTEIN, B.; CECCONELLO, I. Bacterial translocation: overview of mechanisms and clinical impact. **J. Gastroenterol. Hepatol.**, n. 22, v. 4, p. 464-471, 2007.

* De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BAILEY, R. W.; BULKLEY, G. B.; HAMILTON, S. R.; MORRIS, J. B.; HAGLUND, U. H. Protection of the small intestine from nonocclusive mesenteric ischemic injury due to cardiogenic shock. **Am. J. Surg.**, v. 153, p. 108-116, 1987.

BARBAS, C. S.; MATOS, G. F.; AMATO, M. B.; CARVALHO, C. R. Goal-oriented respiratory management for critically ill patients with acute respiratory distress syndrome. **Crit. Care Res.**, v. 2012, p. 952168, 2012.

BARON, S. **Medical Microbiology**, 4. ed. Texas: University of Texas Medical Branch at Galveston, Galveston, 1996. Disponível em:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7627/?report=reader>.

BATES, J. H. T. Assessment of mechanics. In: MARINI, J. J.; SLUTSKY, A. S. (Ed.) **Physiological basis of ventilatory support**. New York: Marcel Dekker, p. 231-259, 1998.

BERTHIAUME, Y.; LESUR, O.; DAGENAIS, A. Treatment of adult respiratory distress syndrome: plea for rescue therapy of the alveolar epithelium. **Thorax**, v. 54, v. 2, p. 150-160, 1999.

BHATIA, M.; MOOCHHALA, S. Role of inflammatory mediators in the pathophysiology of acute respiratory distress syndrome. **J. Pathol.**, v. 202, n. 2, p. 145-156, 2004.

BIANCHI, M. E. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. **J. Leuk. Biol.**, v. 81, n. 1, p. 1-5, 2007.

BLANK, R.; NAPOLITANO, L. M. Epidemiology of ARDS and ALI. **Crit. Care Clin.**, v. 27, n. 3, p. 439-458, 2011.

BORJESSON, A.; NORLINA, A.; WANG, X.; ANDERSSON, R.; FOLKESSON, H. G. TNF-alfa stimulate alveolar liquid clearance during intestinal ischemia-reperfusion in rats. **Am. J. Pshysiol. Lung Cell. Mol. Physiol.**, v. 278, p. L3-L12, 2000.

BORREGAARD, N. Neutrophils, from marrow to microbes. **Immunity**, n. 33, p. 657-670, 2010.

BOUROS, D.; ALEXANDRAKIS, M. G.; ANTONIOU, K. M. The clinical significance of serum and bronchoalveolar lavage inflammatory cytokines in patients at risk for acute respiratory distress syndrome. **BMC Pulm. Med.**, v. 4, p. 6, 2004.

BRADDOCK, M.; QUINN, A. Targeting IL-1 in inflammatory disease: new opportunities for therapeutic intervention. **Nat. Rev. Drug Discov.**, v. 3, p. 330-339, 2004.

BREITHAUPT-FALOPPA, A. C.; VITORETTI, L. B.; COELHO, F. R.; DOS SANTOS FRANCO, A. L.; DOMINGOS, H. V.; SUDO-HAYASHI, L. S.; OLIVEIRA-FILHO, R. M.; TAVARES DE LIMA, W. Nitric oxide mediates lung vascular permeability and lymph-borne IL-6 after an intestinal ischemic insult. **Shock**, v. 32, n. 1, p. 55-61, 2009.

BREITHAUPT-FALOPPA, A. C.; VITORETTI, L. B.; CAVRIANI, G.; LINO-DOS-SANTOS-FRANCO, A.; SUDO-HAYASHI, L. S.; OLIVEIRA-FILHO, R. M.; VARGAFTIG, B. B.; TAVARES-DE-LIMA, W. Intestinal lymph-borne factors induce lung release of inflammatory mediators and expression of adhesion molecules after an intestinal ischemic insult. **J. Surg. Res.**, v. 176, n. 1, p. 195-201, 2011.

BREITHAUPT-FALOPPA, A. C.; FANTOZZI, E. T.; RAMOS, M. M.; VITORETTI, L. B.; COUTO, G. K.; LINO-DOS-SANTOS-FRANCO, A.; ROSSONI, L. V.; OLIVEIRA-FILHO, R. M.; VARGAFTIG, B. B.; TAVARES-DE-LIMA, W. Protective effect of estradiol on acute lung inflammation induced by an intestinal ischemic insult is dependent on nitric oxide. **Shock**, v. 40, n. 3, p. 203-209, 2013.

BRUN-BUISSON, C.; MINELLI, C.; BERTOLINI, G.; BRAZZI, L.; PIMENTEL, J.; LEWANDOWSKI, K.; BION, J.; ROMAND, J. A.; VILLAR, J.; THORSTEINSSON, A.; DAMAS, P.; ARMAGANIDIS, A.; LEMAIRE, F.; ALIVE Study Group. Epidemiology and outcome of acute lung injury in European intensive care units. Results from the ALIVE study. **Intensive Care Med.**, v. 30, p. 51-61, 2003.

BRUNE, I. B.; WILKE, W.; HENSLER, T.; HOLZMANN, B.; SIEWERT, J. R. Downregulation of T helper type 1 immune response and altered pro-inflammatory and anti-inflammatory T cell cytokine balance following conventional but not laparoscopic surgery. **Am. J. Surg.**, n. 177, p. 55-60, 1999.

BURNE, M. J.; DANIELS, F.; GHANDOUR, A.; MAUIYYEDI, S.; COLVIN, R. B.; O'DONNELL, M. P.; RABB, H. Identification of the CD4(+) T cell as a major pathogenic factor in ischemic acute renal failure. **J. Clin. Invest.**, v. 108, p. 1283-1290, 2001.

BUTT, I.; SHRESTHA, B. M. Two-hit hypothesis and multiple organ dysfunction syndrome. **J.N.M.A. J. Nepal Med. Assoc.**, v. 47, n. 170, p. 82-85, 2008.

CALDWELL, C. C.; TSCHOEP, J.; LENTSCH, A. B. Lymphocyte function during hepatic ischemia/reperfusion injury. **J. Leukoc. Boil.**, v. 82, p. 457-464, 2007.

CANETTI, C.; SILVA, J. S.; FERREIRA, S. H.; CUNHA, F. Q. Tumour necrosis factor-alpha and leukotriene B(4) mediate the neutrophil migration in immune inflammation. **Bri. J. Pharmac.**, v. 134, n. 8, p. 1619-1628, 2001.

CAVRIANI, G.; OLIVEIRA-FILHO, R. M.; TREZENA, A. G.; DA SILVA, Z. L.; DOMINGOS, H. V.; DE ARRUDA, M. J.; JANCAR, S.; TAVARES DE LIMA, W. Lung microvascular permeability and neutrophil recruitment are differently regulated by nitric oxide in a rat model of intestinal ischemia-reperfusion. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 494, n. 2-3, p. 241-249, 2004.

CAVRIANI, G.; DOMINGOS, H. V.; SOARES, A. L.; TREZENA, A. G.; LIGEIRO-OLIVEIRA, A. P.; OLIVEIRA-FILHO, R. M.; SUDO-HAYASHI, L. S.; TAVARES DE LIMA, W. Lymphatic system as a path underlying the spread of lung and gut injury after intestinal ischemia/reperfusion in rats. **Shock**, v. 23, n. 4, p. 330-336, 2005.

CAVRIANI, G. **Avaliação do envolvimento do sistema linfático na inflamação pulmonar causada pela isquemia e reperfusão intestinal**. 2007. 152 f. Tese (Doutorado em Farmacologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

CAVRIANI, G.; DO, B. B.; TAVARES DE LIMA, W. Lymphatic thoracic duct ligation modulates the serum levels of IL-1 β and IL-10 after intestinal ischemia/reperfusion in rats with the involvement of tumor necrosis factor α and nitric oxide. **Shock**, v. 27, n. 2, p. 209-213, 2007.

CERQUEIRA, N. F.; HUSSNI, C. A.; YOSHIDA, W. B. Pathophysiology of Mesenteric Ischemia/Reperfusion: a Review. **Acta Cir. Bras.**, v. 20, p. 336-343, 2005.

CHOPRA, M.; REUBEN, J. S.; SHARMA, A. C. Acute lung injury: apoptosis and signaling mechanisms. **Exp. Biol. Med.**, v. 234, p. 361-371, 2009.

COELHO, F. R.; CAVRIANI, G.; SOARES, A. L.; TEIXEIRA, S. A.; ALMEIDA, P. C.; SUDO-HAYASHI, L. S.; MUSCARA, M. N.; OLIVEIRA-FILHO, R. M.; VARGAFTIG, B. B.; TAVARES DE LIMA, W. Lymphatic-borne IL-1 β and the inducible isoform of nitric oxide synthase trigger the bronchial hyporesponsiveness after intestinal I/R in rats. **Shock**, v. 28, n. 6, p. 694-699, 2007.

CONSTANT, S. L.; BOTTOMLY, K. Induction of Th1 and Th2 CD4⁺ T cell responses: the alternative approaches. **Annu. Rev. Immunol.**, n. 15, p. 297-322, 1997.

CROSS, L. J.; MATTHAY, M. A. Biomarkers in Acute Lung Injury: Insights into the Pathogenesis of Acute Lung Injury. **Crit. Care Clin.**, v. 27, n. 2, p. 355-377, 2011.

DADA, L. A.; SZNAJDER, J. I. Hypoxic inhibition of alveolar fluid reabsorption. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 618, p. 159-168, 2007.

DE PERROT, M.; YOUNG, K.; IMAI, Y.; LIU, M.; WADDELL, T. K.; FISCHER, S.; ZHANG, L.; DEITCH, E. A. Bacterial translocation or lymphatic drainage of toxic products from the gut: what is important in human beings? **Surgery**, v. 131, n. 3, p. 241-244, 2002.

DEFRAIGNE, J. O.; PINCEMAIL, J. Local and systemic consequences of severe ischemia and reperfusion of the skeletal muscle. Physiopathology and prevention. **Acta Chir Belg.**, v. 98, n. 4, p. 176-186, 1998.

DEITCH, E. A. Simple intestinal obstruction causes bacterial translocation in man. **Arch. Surg.**, n. 124, p. 699-701, 1989.

DEITCH, E. A. Multiple organ failure: pathophysiology and potential future therapy. **Ann Surg.**, n. 216, p. 117-134, 1992.

DEITCH, E. A.; XU, D.; FRANKO, L.; AYALA, A.; CHAUDRY, I. H. Evidence favoring the role of the gut as a cytokine-generating organ in rats subjected to hemorrhagic shock. **Shock**, n. 1, v. 2, p. 141-145, 1994.

DEITCH, E. A. Role of the gut in multiple system organ failure. *Curr Opin Crit Care*, v. 7, p. 92, 2001

DEITCH, E. A. Bacterial translocation or lymphatic drainage of toxic products from the gut: what is important in human beings? *Surgery*, n. 131, v. 3, p. 241-244, 2002.

DEBUS, E. S.; DIENER, H.; LARENA-AVELLANEDA, A. Acute intestinal ischemia. *Chirurg.*, v. 80, n. 4, p. 375–385, 2010.

DEBUS, E. S.; MÜLLER-HÜLSBECK, S.; KÖLBEL, T.; LARENA-AVELLANEDA, A. Intestinal ischemia. *Int. J. Colorectal. Dis.*, v. 26, n. 9, p. 1087-1097, 2011.

DUCHESNE, J. C.; MCSWAIN, N. E. JR.; COTTON, B. A. Damage control resuscitation: the new face of damage control. *J. Trauma*, n. 69, v. 4, p. 976–990, 2010.

DUMITRIU, I. E.; BIANCHI, M. E.; BACCI, M.; MANFREDI, A. A.; ROVERE-QUERINI, P. The secretion of HMGB1 is required for the migration of maturing dendritic cells. *J. Leuk. Biol.*, v. 81, p. 84–91, 2007.

EDGERTON, C.; CRISPÍN, J. C.; MORATZ, C. M.; BETTELLI, E.; OUKKA, M.; SIMOVIC, M.; ZACHARIA, A.; EGAN, R.; CHEN, J.; DALLE LUCCA, J. J.; JUANG, Y. T.; TSOKOS, G. C. IL-17 producing CD4+ T cells mediate accelerated ischemia/reperfusion-induced injury in autoimmunity-prone mice. *Clin. Immunol.*, v. 130, n. 3, p.313-321, 2009.

ELZEY, B. D.; RATLIFF, T. L.; SOWA, J. M.; CRIST, S. A. Platelet CD40L at the interface of adaptive immunity. *Thromb Res.*, v. 127, n. 3, p. 180-183, 2010.

FACCIOLI, L. H.; SOUZA, G. E.; CUNHA, F. Q.; POOLE, S.; FERREIRA, S. H. Recombinant interleukin-1 and tumor necrosis factor induce neutrophil migration "in vivo" by indirect mechanisms. *Agents Actions*, n. 30, v. 3-4, p. 344-349, 1990.

FAFFE, D. S.; SEIDL, V. R.; CHAGAS, P. S.; et al. Respiratory effects of lipopolysaccharide-induced inflammatory lung injury in mice. *Eur. Resp. J.*, v. 15, n. 1, p. 85–91, 2000.

FAN, Y.; YE, J.; SHEN, F.; ZHU, Y.; YEGHIAZARIANS, Y.; ZHU, W.; CHEN, Y.; LAWTON, M. T.; YOUNG, W. L.; YANG, G. Y. Interleukin-6 stimulates circulating blood-derived endothelial progenitor cell angiogenesis in vitro. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, v. 28, n. 1, p. 90-98, 2008.

FEI, J.; YU, H. J.; ZHOU, J.; HUANG, X. K.; LIANG, H. P.; JIANG, Y.G. Study on high mobility group-1 protein in patients with multiple trauma. *Zhongguo Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue*; v. 17, p. 273–275, 2005.

FERGUSON, N. D.; FRUTOS-VIVAR, F.; ESTEBAN, A.; FERNANDEZ-SEGOVIANO, P.; ARAMBURU, J. A.; NAJERA, L.; STEWART, T. E. Acute respiratory distress syndrome: under recognition by clinicians and diagnostic accuracy of three clinical definitions. *Crit. Care Med.*, v. 33, p. 2228-2234, 2005.

FIALKOW, L.; VIEIRA, S. R. R.; FERNANDES, A. K.; SILVA, D. R.; BOZZETTI, M. C. Acute lung injury and acute respiratory distress syndrome at the intensive care unit of a general university hospital in Brazil. An epidemiological study using the American-European Consensus Criteria. **Intens. Care Med.**, v. 28, n. 11, p. 1644–8, 2002.

FLOHÉ, S. B.; FLOHÉ, S.; SCHADE, F. U. Invited review: deterioration of the immune system after trauma: signals and cellular mechanisms. **Innate Immun.**, v. 14, n. 6, p. 333–344, 2008.

FOEX, B. Bacterial translocation in hemorrhagic shock: are we any wiser? **Crit. Care Med.**, v.33, p. 1166–1167, 2005.

FUMEAUX, T.; PUGIN, J. Is the measurement of monocytes HLA-DR expression useful in patients with sepsis? **Intens. Care Med.**, v. 32, p. 1106–1108, 2006.

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.**, n. 29, v. 2, p. 370–376, 1999.

GALLI, S. J.; MAURER, M.; LANTZ, C. S. Mast cells as sentinels of innate immunity. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 11, p. 53–59, 1999.

GALLUCCI, S.; MATZINGER, P. Danger signals: SOS to the immune system. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 13, p. 114–119, 2001.

GARDELLA, S., ANDREI, C., FERRERA, D., LOTTI, L. V., TORRISI, M. R., BIANCHI, M. E., RUBARTELLI, A. The nuclear protein HMGB1 is secreted by monocytes via a non-classical, vesicle-mediated secretory pathway. **EMBO Rep.**, v. 3, p. 995–1001, 2002.

GASSE, P.; RITEAU, N.; CHARRON, S.; GIRRE, S.; FICK, L.; PÉTRILLI, V.; TSCHOPP, J.; LAGENTE, V.; QUESNIAUX, V. F.; RYFFEL, B.; COUILLIN, I. Uric acid is a danger signal activating NALP3 inflammasome in lung injury inflammation and fibrosis. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, v. 15, p. 903–913, 2009.

GERARD, C.; BRUYNS, C.; MARCHANT, A.; ABRAMOWICZ, D.; VANDENABEELE, P.; DELVAUX, A.; FIERIS, W.; GOLDMAN, M.; VELU, T. Interleukin 10 reduces the release of tumor necrosis factor and prevents lethality in experimental endotoxemia. **J. Exp. Med.**, v. 177, p. 547–550, 1993.

GERLACH, U. A.; ATANASOV, G.; WALLENTA, L.; POLENZ, D.; REUTZEL-SELKE, A.; KLOEPFEL, M.; JURISCH, A.; MARKSTEINER, M.; LODDENKEMPER, C.; NEUHAUS, P.; SAWITZKI, B.; PASCHER, A. Short-term TNF-alpha inhibition reduces short-term and long-term inflammatory changes post-ischemia/reperfusion in rat intestinal transplantation. **Transplantation**, v. 97, n. 7, 732–739, 2014.

GIMENES-JUNIOR, J. A. **Papel dos hormônios sexuais femininos na inflamação pulmonar aguda e na reatividade das vias aéreas após instilação nasal de LPS em camundongos.** 2013. 161 f. Tese (Doutorado em Farmacologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

GLADWIN, M.; SCHECHTER, A.; KIM-SHAPIRO, D.; PATEL RP, et. al. The emerging biology of the nitrite anion. **Nat. Chem. Biol.**, v. 1, p. 308–314, 2005.

GRANGER, D. N.; KORTHUIS, R. J. Physiologic Mechanisms of Postischemic Tissue Injury. **Annu. Rev. Physiol.**, v. 57, p. 311-332, 1995.

GROENEVELD, A. B.; RAIJMAKERS, P. G.; HACK, C. E; THIJIS, L. G. Interleukin 8-related neutrophil elastase and the severity of the adult respiratory distress syndrome. **Cytokine**, v. 7, n. 7, p. 746-752, 1995.

GUIDO, B. C.; ZANATELLI, M.; TAVARES-DE-LIMA, W.; OLIANI, S. M.; DAMAZO, A. S. Annexin-A1 peptide down-regulates the leukocyte recruitment and up-regulates interleukin-10 release into lung after intestinal ischemia-reperfusion in mice. **J. Inflamm.**, v. 10, n. 1, p. 10, 2013.

GUTIERREZ, G.; REINES, H. D.; WULF-GUTIERREZ, M. E. Clinical review: Hemorrhagic shock. **Crit. Care**, v. 8, p. 373-381, 2004.

HAGLUND, U.; BERGQVIST, D. Intestinal Ischemia -- the Basics. **Langenbecks Arch. Surg.**, v. 384, p. 233-238, 1999.

HAMACHER, J.; LUCAS, R.; LIJNEN, H. R.; et al. Tumor necrosis factor- α and angiotensin are mediators of endothelial cytotoxicity in bronchoalveolar lavages of patients with acute respiratory distress syndrome. **Am. J. Resp. Crit. Care**, v. 166, n. 5, p. 651–656, 2002.

HARMAN, E. M. Acute respiratory distress syndrome. **Medscape**, 2012. Disponível em: <http://emedicine.medscape.com/article/165139-overview-03-19>.

HARRIS, H. E. e RAUCCI, A. Alarmin(s) news about danger: workshop on innate danger signals and HMGB1. **EMBO Reports**, v. 7, n. 8, p. 774–778, 2006.

HAYWARD, R.; NOSSULI, T. O.; SCALIA, R.; LEFER, A. M. Cardioprotective effect of interleukin-10 in murine myocardial ischemia reperfusion. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 334, p. 157–163, 1997.

HEI, Z. Q.; GAN, X. L.; HUANG, P. J.; WEI, J.; SHEN, N.; GAO, W. L. Influence of ketotifen, cromolyn sodium, and compound 48/80 on the survival rats after intestinal ischemia reperfusion injury in rats. **BMC. Gastroenterol.**, v. 8, p. 42, 2008.

HIRSIGER, S.; SIMMEN, H. P.; WERNER, C. M.; WANNER, G. A.; RITTIRSCH, D. Danger signals activating the immune response after trauma. **Mediators Inflamm.**, v. 2012, p. 315941, 2012.

HORIE, Y.; WOLF, R.; CHERVENAK, R. P.; JENNINGS, S. R.; GRANGER, D. N. T-lymphocytes contribute to hepatic leukostasis and hypoxic stress induced by gut ischemia/reperfusion. **Microcirculation**, v. 6, p. 267-280, 1999.

HUDSON, L. D.; MILBERG, J. A.; ANARDI, D.; MAUNDER, R. J. Clinical risks for development of the acute respiratory distress syndrome. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, v. 151, n. 2, p. 293-301, 1995.

HUDSON, L. D.; STEINBERG, K. P. Epidemiology of acute lung injury and ARDS. **Chest**, v. 116, Suppl n. 1, p. 74S-82S, 1999.

HURN, P. D.; SUBRAMANIAN, S.; PARKER, S. M.; AFENTOULIS, M. E.; KALER, L. J.; VANDENBARK, A. A.; OFFNER, H. T- and B-cell-deficient mice with experimental stroke have reduced lesion size and inflammation. **J. Cereb. Blood Flow Metab.**, v. 27, p. 1798-1805, 2007.

IDZKO, M.; HAMMAD, H.; VAN NIMWEGEN, M.; KOOL, M.; WILLART, M. A.; MUSKENS, F.; HOOGSTEDEN, H. C.; LUTTMANN, W.; FERRARI, D.; DI VIRGILIO, F.; VIRCHOW JR, J. C.; LAMBRECHT, B. N. Extracellular ATP triggers and maintains asthmatic airway inflammation by activating dendritic cells. **Nat. Med.**, v. 13, p. 913-919, 2007.

ISHII, H.; ISHIBASHI, M.; TAKAYAMA, M.; NISHIDA, T.; YOSHIDA, M. The role of cytokine-induced neutrophil chemoattractant-1 in neutrophil-mediated remote lung injury after intestinal ischaemia/reperfusion in rats. **Respirology**, v. 5, n. 4, p. 325-331, 2000.

JEDYNAK, M.; SIEMIĄTKOWSKI, A.; GACKO, M.; MROCZKO, B.; BORKOWSKI, J.; SZMITKOWSKI, M. Serum concentrations of interleukin-12 (IL-12) in patients undergoing abdominal aortic aneurysm repair — preliminary report. **Pol. Arch. Med. Wew.**, v. 4, p. 1173-1179, 2004.

JEDYNAK, M.; MROCZKO, B.; SIEMIĄTKOWSKI, A.; GACKO, M.; SZMITKOWSKI, M. Decreased serum level of IL-12 in the course of ischemia and reperfusion during abdominal aortic surgery. **Folia Histochem. Cytobiol.**, v. 49, n. 3, p. 465-471, 2011.

KAHLKE, V.; FANDRICH, F.; BROTZMANN, K.; ZABEL, P.; SCHRÖDER, J. Selective decontamination of the digestive tract: impact on cytokine release and mucosal damage after hemorrhagic shock. **Crit. Care Med.**, v. 30, p. 1327-1333, 2002.

KALICKE, T.; SCHLEGEL, U.; PRINTZEN, G. Influence of a standardized closed soft tissue trauma on resistance to local infection. An experimental study in rats. **J. Orthop. Res.**, v. 21, p. 373-378, 2003.

KEH, D.; BOEHNKE, T.; WEBER-CARTENS, S.; SCHULZ, C.; AHLERS, O.; BERCKER, S.; VOLK, H. D.; DOECKE, W. D.; FALKE, K. J.; GERLACH, H. Immunologic and hemodynamic effects of "low-dose" hydrocortisone in septic shock: a double-blind, randomized, placebo-controlled, crossover study. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, n. 167, v. 4, p. 512-520, 2003.

KISS, J.; JALKANEN, S.; FULOP, F.; SAVUNEN, T.; SALMI, M. Ischemia reperfusion injury is attenuated in VAP-1-deficient mice and by VAP-1 inhibitors. **Eur. J. Immunol.**, v. 38, p. 3041-3049, 2008.

KOIKE, K.; YAMAMOTO, Y.; HORI, Y.; ONO, T. Group IIA phospholipase A2 mediates lung injury in intestinal ischemia-reperfusion. **Ann. Surg.**, v. 232, n. 1, p. 90-97, 2000.

KOJIMA, M.; TANABE, M.; SHINODA, M.; YAMADA, S.; MIYASHO, T.; SUDA, K.; HIBI, T.; OBARA, H.; ITANO, O.; KAWACHI, S.; KITAJIMA, M.; MARUYAMA, I.; KITAGAWA, Y. Role of high mobility group box chromosomal protein 1 in ischemia-reperfusion injury in the rat small intestine. **J. Surg. Res.**, v. 178, n. 1, p. 466-471, 2012.

KOKSOY, C.; KUZU, M. A.; KUZU, I.; ERGUN, H.; GURHAN, I. Role of tumor necrosis factor in lung injury caused by intestinal ischemia-reperfusion. **Br. J. Surg.**, v. 88, n. 3, p. 464-468, 2001.

KOLLS, J. K.; LINDEN, A. Interleukin-17 family members and inflammation. **Immunity**, n. 21, p. 467-476, 2004.

KOVACH, M. A.; STANDIFORD, T. J. The function of neutrophils in sepsis. **Curr. Opin. Infect. Dis.**, v. 25, n. 3, p. 321-327, 2012.

KRAKAUER, T.; OPPENHEIM, J.J. IL-1 and tumor necrosis factor-alpha each up-regulate both the expression of IFN-gamma receptors and enhance IFN-gamma induced HLA-DR expression on human monocytes and a human monocytic cell line (THP-1). **J. Immunol.**, v. 150, n. 4, p. 1205-1211, 1993.

KSONTINI, R.; MACKAY, S. L.; MOLDAWER, L. L. Revisiting the role of tumor necrosis factor alpha and the response to surgical injury and inflammation. **Arch. Surg-Chicago**, v. 133, n. 5, p. 558-567, 1998.

KUZU, M. A.; KOKSOY, C.; KUZU, I.; GURHAN, I.; ERGUN, H.; DEMIRPENCE, E. Role of integrins and intracellular adhesion molecule-1 in lung injury after intestinal ischemia-reperfusion. **Am. J. Surg.**, v. 183, n. 1, p. 70-74, 2002.

LAMBETH, J. D. NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. **Nat. Rev. Immunol.**, n. 4, p. 181-189, 2004.

LANOUE, J. L.; IGLESIAS, J. L.; ROGERS, T. E.; KIM, L. T.; MENG, Y.; MYERS, S. I.; TURNAGE, R. H. Alveolar macrophage response to remote organ injury. **Shock**, v. 9, p. 261-265, 1998.

LASKIN, D. L. ; SUNIL, V. R.; GARDNER, C. R.; LASKIN, J. D. Macrophages and tissue injury: agents of defense or destruction? **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 51, p. 267-288, 2011.

LEE, H.T.; KIM, M.; KIM, J. Y.; BROWN, K. M.; HAM, A.; D'AGATI, V. D.; MORI-AKIYAMA, Y. Critical role of interleukin-17A in murine intestinal ischemia-reperfusion injury. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.**, n. 304, v. 1, p. G12-G25, 2013.

LESER, H. G.; GROSS, C.; SCHEIBENBOGEN, C. Elevation of serum interleukin-6 concentration precedes acute phase response and reflects severity in acute pancreatitis. **Gastroenterology**, v. 101, p. 782-785, 1991.

LEVY, R. M.; MOLLEN, K. P.; PRINCE, J. M.; KACZOROWSKI, D. J.; VALLABHANENI, R.; LIU, S.; TRACEY, K. J.; LOTZE, M.T.; HACKAM, D. J.; FINK, M. P.; VODOVOTZ, Y.; BILLIAR, T. R. Systemic inflammation and remote organ injury following trauma require HMGB1. **Am. J. Physiol.**, v. 293, p. R1538–R1544, 2007.

LEWANDOWSKI, K.; LEWANDOWSKI, M. Epidemiology of ARDS. **Minerva Anesthesiol.**, v. 76, p. 473-477, 2006.

LI, G.; MALINCHOC, M.; CARTIN-CEBA, R.; et al. Eight-year trend of acute respiratory distress syndrome: a population-based study in Olmsted County, Minnesota. **AM. J. Resp. Crit. Care**, v. 183, n. 1, p. 59–66, 2011.

LI, Q.; PARK, P. W.; WILSON, C. L.; PARKS, W. C. Matrilysin shedding of syndecan-1 regulates chemokine mobilization and transepithelial efflux of neutrophils in acute lung injury. **Cell**, v.111, n. 5, p. 635–646, 2002.

LINFERT, D.; CHOWDHRY, T.; RABB, H. Lymphocytes and ischemia-reperfusion injury. **Transplant Rev.**, v. 23, p. 1-10, 2009.

LIU, S.; STOLZ, D. B.; SAPPINGTON, P. L.; MACIAS, C. A.; KILLEEN, M. E.; TENHUNEN, J. J.; DELUDE, R. L.; FINK, M. P. HMGB1 is secreted by immunostimulated enterocytes and contributes to cytomix-induced hyperpermeability of Caco-2 monolayers. **Am. J. Physiol. Cell Physiol.**, v. 290, p. C990-C999, 2006.

LOFTUS, I. **Care of the critically ill surgical patient**. 272 f. 3. ed., London: Hodder Arnold, 2010.

LOTZE, M. T.; TRACEY, K. J. High-mobility group box 1 protein (HMGB1): nuclear weapon in the immune arsenal. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 5, p. 331–342, 2005.

LUCAS, S. The autopsy pathology of sepsis-related death. **Curr. Diagn. Pathol.**, v. 13, p. 375-388, 2007.

LUNDBERG, J. O.; GLADWIN, M. T.; AHLUWALIA, A.; BENJAMIN, N; et. al. Nitrate and nitrite in biology, nutrition and therapeutics. **Nat. Chem. Biol.**, v. 5, p. 865–869, 2009.

LYAKH, L.; TRINCHIERI, G.; PROVEZZA, L.; CARRA, G.; GEROSA, F. Regulation of interleukin-12/interleukin-23 production and the T-helper 17 response in humans. **Immunol. Rev.**, v. 226, p. 112–131, 2008.

LYNCH, T.; DAUPHINEE, W. Quality management case studies in health service emergencies: SARS and wild and-urban interface fires. **Qual. Manag. Health. Care.**, v. 14, p. 2-17, 2005.

MACCONMARA, M. P.; MAUNG, A. A.; FUJIMI, S.; MCKENNA, A. M.; DELISLE, A.; LAPCHAK, P. H.; ROGERS, S.; LEDERER, J. A.; MANNICK, J.A. Increased CD4+ CD25+ T regulatory cell activity in trauma patients depresses protective Th1 immunity. **Ann. Surg.**, n. 244, v. 4, p. 514-523, 2006.

MACK, V. E.; MCCARTER, M. D.; NAAMA, H. A. Dominance of T helper 2-type cytokines after severe injury. **Arch. Surg.**, v. 131, p. 1303–1309, 1996.

MANNICK, J. A.; RODRICK, M. L.; LEDERER, J. A. The immunologic response to injury. **J. Am. Coll. Surg.**, v. 193, p. 237–244, 2001.

MARINI, J. J.; EVANS, T. W. Round Table Conference: Acute Lung Injury, 15th-17th March 1997 Brussels, Belgium. **Intensive Care Med.**, v. 24, p. 878-883, 1998.

MARQUES, V. P.; GONÇALVES, G. M.; FEITOZA, C. Q.; CENEDEZE, M. A.; FERNANDES-BERTOCCHI, A. P.; DAMIÃO, M. J.; PINHEIRO, H. S.; ANTUNES-TEIXEIRA, V. P.; DOS REIS, M. A.; PACHECO-SILVA, A.; SARAIVA-CÂMARA, N. O. Influence of TH1/TH2 switched immune response on renal ischemia-reperfusion injury. **Nephron. Exp. Nephrol.**, v.104, n. 1, p. 48-56, 2006.

MARTIN, T. R. Cytokines and lung injury: searching for useful biomarkers. **Crit. Care Med.**, v.33, p. 230-232, 2005.

MATUTE-BELLO, G.; DOWNEY, G.; MOORE, B. B.; GROSHONG, S. D.; MATTHAY, M. A.; SLUTSKY, A. S.; KUEBLER W. M. Acute Lung Injury in Animals Study Group. An official American Thoracic Society workshop report: features and measurements of experimental acute lung injury in animals. **Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.**, v. 44, n. 5, p. 725-738, 2011.

MATZINGER, P. Tolerance, danger, and the extended family. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 12, p. 991–1045, 1994.

MAXWELL, S. R. and LIP, G. Y. Reperfusion injury: a review of the pathophysiology, clinical manifestations and therapeutic options. **Int. J. Cardiol.**, v. 58, p. 95-117, 1997.

MCCARTER, M. D.; MACK, V. E.; DALY, J. M. Trauma-induced alterations in macrophage function. **Surgery**, v. 123, p. 96–101, 1998.

MCLACHLAN, J. B.; HART, J. P.; PIZZO, S. V.; SHELBURNE, C. P.; STAATS, H. F.; GUNN, M. D.; ABRAHAM, S. N. Mast cell-derived tumor necrosis factor induces hypertrophy of draining lymph nodes during infection. **Nat. Immunol.**, v. 4, p. 1199-1205, 2003.

MCNEIL, J. C. Staphylococcus aureus - antimicrobial resistance and the immunocompromised child. **Infect. Drug. Resist.**, v. 7, n. 7, p. 117-127, 2014..

MELO, A. C.; VALENÇA, S. S.; GITIRANA, L. B.; SANTOS, J. C.; RIBEIRO, M. L.; MACHADO, M. N.; MAGALHÃES, C. B.; ZIN, W. A.; PORTO, L. C. Redox markers and inflammation are differentially affected by atorvastatin, pravastatin or simvastatin administered before endotoxin-induced acute lung injury. **Int. Immunopharmacol.**, v. 17, n. 1, p. 57-64, 2013.

METCALFE, D. D.; BARAM, D.; MEKORI, Y. A. Mast Cells. **Physiol. Rev.**, v. 77, p. 1033-1079, 1997.

MOLLEN, K. P.; ANAND, R. J.; TSUNG, A.; PRINCE, J. M.; LEVY, R. M.; BILLIAR, T. R. Emerging paradigm: Toll-like receptor 4-sentinel for the detection of tissue damage. **Shock**, v. 26, p. 430-437, 2006.

MOORE, E. E.; MOORE, F. A.; FRANCIOSSE, R. J.; KIM, F. J.; BIFFL, W. L.; BANERJEE, A. The postischemic gut serves as a priming bed for circulating neutrophils that provoke multiple organ failure. **J. Trauma**, v. 37, n. 6, p. 881-887, 1994.

MOORE, F. A.; MOORE, E. E.; POGGETTI, R. S.; READ, R. A. Postinjury shock and early bacteremia: a lethal combination. **Arch. Surg.**, v. 127, p. 893-898, 1992.

MOORE, F.A. The role of the gastrointestinal tract in postinjury multiple organ failure. **Am. J. Surg.**, n. 178, v.6, p. 449-453, 1999

MORAES, L. B.; MURAKAMI, A. H.; FONTES, B.; POGGETTI, R. S.; VAN ROOIJEN, N.; YOUNES, R. N.; HEIMBECKER, A. M.; BIROLINI, D. Gut ischemia/reperfusion induced acute lung injury is an alveolar macrophage dependent event. **J. Trauma**, v. 64, p. 1196-2000, 2008.

MORAES, T. J.; CHOW, C. W.; DOWNEY, G. P. Proteases and lung injury. **Crit. Care Med.**, v. 31, n. 4, p. 189-194, 2003.

MORIYA, H. T. **Contribuições não lineares e aproximação do domínio do tempo do modelo de fase constante na mecânica respiratória em camundongos**. 2003. 112 f. (Tese) Doutorado em Engenharia Biomédica - Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

MOSES, T.; WAGNER, L.; FLEMING, S. D. TLR4-mediated Cox-2 expression increases intestinal ischemia/reperfusion-induced damage. **J. Leukoc. Biol.**, v. 86, n. 4, p. 971-980, 2009.

MYRTEK, D.; IDZKO, M. Chemotactic activity of extracellular nucleotides on human immune cells. **Purinerg. Signal**, v. 3, p. 5-11, 2007.

NARITA, K.; KUWABARA, Y.; FUJII, Y. Lung injury after intestinal ischemia-reperfusion may be avoided by the reduced absorption of locally produced cytokines. **Surg. Today**, v. 34, n. 11, p. 937-942, 2004.

NATHAN, C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. **Nat. Rev. Immunol.**, n. 6, p. 173-182, 2006.

NEFF, T. A.; STOCKER, R.; FREY, H. R.; STEIN, S.; RUSSI, E. W. Long-term assessment of lung function in survivors of severe ARDS. **Chest**, v. 123, n. 3, p. 845-853, 2003.

OGURA, J.; KUWAYAMA, K.; TAKAYA, A.; TERADA, Y.; TSUJIMOTO, T.; KOIZUMI, T.; MARUYAMA, H.; FUJIKAWA, A.; TAKAHASHI, N.; KOBAYASHI, M.; ITAGAKI, S.; HIRANO, T.; YAMAGUCHI, H.; ISEKI, K. Intestinal ischemia-reperfusion increases efflux for uric acid via paracellular route in the intestine, but decreases that via transcellular route mediated by BCRP. **J. Pharm. Pharm. Sci.**, n. 15, v. 2, p. 295-304, 2012.

OKUDAN, N.; BELVIRANLI, M.; GÖKBEL, H.; OZ, M.; KUMAK, A. Protective effects of curcumin supplementation on intestinal ischemia reperfusion injury. **Phytomedicine**, v. 20, n. 10, p. 844-848, 2013.

OKUSAWA, S.; GELFAND, J. A.; IKEJIMA, T.; CONNOLLY, R. J.; DINARELLO, C. A. Interleukin 1 induces a shock-like state in rabbits. Synergism with tumor necrosis factor and the effect of cyclooxygenase inhibition. **J. Clin. Invest.**, v. 81, p. 1162-1172, 1998.

OLANDERS, K.; SUN, Z.; BORJESSON, A.; DIB, M.; ANDERSSON, E.; LASSON, A.; OHLSSON, T.; ANDERSSON, R. The effect of intestinal ischemia and reperfusion injury on icam-1 expression, endothelial barrier function, neutrophil tissue influx, and protease inhibitor levels in rats. **Shock**, v. 18, p. 86-92, 2002.

OLIVEIRA, R. H. R.; BASILLE FILHO, A. Incidence of acute lung injury and acute respiratory distress syndrome in the intensive care unit of a university hospital: a prospective study. **J. Bras. Pneumolog.**, v. 32, n. 1, p. 35-42, 2006.

OSMAN, M.; RUSSELL, J.; GRANGER, D. N. Lymphocyte-derived interferon-gamma mediates ischemia-reperfusion-induced leukocyte and platelet adhesion in intestinal microcirculation. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.**, n. 296, v. 3, p. G659-G663, 2008.

OUYANG, W.; KOLLS, J. K.; ZHENG, Y. The biological functions of T helper 17 cell effector cytokines in inflammation. **Immunity**, n. 28, p. 454-467, 2008.

PAMUK, O. N.; LAPCHAK, P. H.; RANI, P.; PINE, P.; DALLE LUCCA, J. J.; TSOKOS, G. C. Spleen tyrosine kinase inhibition prevents tissue damage after ischemia-reperfusion. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.**, v. 299, n. 2, p. G391-G399, 2010.

PANES, J.; PERRY, M.; GRANGER, D. N. Leukocyte-endothelial cell adhesion: avenues for therapeutic intervention. **Br. J. Pharmacol.**, v. 126, p. 537-550, 1999.

PARDO, A.; SELMAN, M.; RIDGE, K.; BARRIOS, R.; SZNAJDER, J. I. Increased expression of gelatinases and collagenases in rat lungs exposed to 100% oxygen. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, v. 154, p. 1067-1075, 1996.

PARKS, W. C.; WILSON, C. L.; LOPEZ-BOADO, Y.S. Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 4, n. 8, p. 617-629, 2004.

PARSONS, P. E.; MATTHAY, M. A.; WARE, L. B. Elevated plasma levels of soluble TNF receptors are associated with morbidity and mortality in patients with acute lung injury. **Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.**, v. 288, n. 3, p. L426–L431, 2005.

PASUPATHY, S.; HOMER-VANNIASINKAM, S. Ischaemic Preconditioning Protects Against Ischaemia/Reperfusion Injury: Emerging Concepts. **Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.**, v. 29, p. 106-115, 2005.

PAULINO, A. S.; PALOMBIT, K.; CAVRIANI, G.; TAVARES-DE-LIMA, W.; MIZUNO, M. S.; MAROSTI, A. R.; DA SILVA, M. V.; GIROTTI, P. A.; LIBERTI, E. A.; CASTELUCCI, P. Effects of ischemia and reperfusion on P2X2 receptor expressing neurons of the rat ileum enteric nervous system. **Dig. Dis. Sci.**, v. 56, n.8, p. 2262-2275, 2011.

PERL, M.; CHUNG, C. S.; PERL, U.; BIFFL, W. L.; CIOFFI, W. G.; AYALA, A. Beneficial *versus* detrimental effects of neutrophils are determined by the nature of the insult. **J. Am. Coll. Surg.**, v. 204, p. 840-852, 2007.

PORTO, A.; PALUMBO, R.; PIERONI, M.; APRIGLIANO, G.; CHIESA, R.; SANVITO, F.; MASERI, A.; BIANCHI, M. E. Smooth muscle cells in human atherosclerotic plaques secrete and proliferate in response to High Mobility Protein Box 1. **FASEB J.**, v. 20, p. E1–E9, 2006.

PUNEET, P.; MOOCHHALA, S.; BHATIA, M. Chemokines in acute respiratory distress syndrome. **Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.**, v. 288, n. 1, p. L3-L15, 2005.

RANI, M.; HUSAIN, B.; LENDEMANS, S.; SCHADE, F. U.; FLOHÉ, S. Haemorrhagic shock in mice--intracellular signalling and immunomodulation of peritoneal macrophages' LPS response. *Immunobiology*, n.211, v. 9, 711-719, 2006.

RANIERI, V. M.; RUBENFELD, G. D.; THOMPSON, B. T.; et al. Acute respiratory distress syndrome: the Berlin definition. **JAMA**, n. 307, p. 2526–2533, 2012.

REDMOND, H. P.; HOFMANN, K.; SHOU, J.; LEON, P.; KELLY, C. J.; DALY, J. M. Effects of laparotomy on systemic macrophage function. **Surgery**, n. 111, p. 647–655, 1992.

REMICK, D. G.; GARG, S. J.; NEWCOMB, D. E.; WOLLENBERG, G.; HUIE, T. K.; BOLGOS, G. L. Exogenous Interleukin-10 Fails to Decrease the Mortality or Morbidity of Sepsis. **Crit. Care Med.**, v. 26, p. 895-904, 1998.

RICOU, B.; NICOD, L.; LACRAZ, S. Matrix metalloproteinases and TIMP in acute respiratory distress syndrome. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, v. 154, p. 346–352, 1996.

ROCCO, P. R.; SOUZA, A. B.; FAFTE, D. S.; PÁSSARO, C. P.; SANTOS, F. B.; NEGRI, E. M.; LIMA, J. G.; CONTADOR, R. S.; CAPELOZZI, V. L.; ZIN, W. A. Effect of corticosteroid on lung parenchyma remodeling at an early phase of acute lung injury. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, v. 168, n. 6, p. 677-684, 2003.

ROSSI, A.; PERGOLA, C.; CUZZOCREA, S.; SAUTEBIN, L. The role of 5-lipoxygenase and leukotrienes in shock and ischemia-reperfusion injury. **Sci. World J.**, v. 22; p. 56-74, 2007.

SALLUSTO, F.; CELLA, M.; DANIELI, C.; LANZAVECCHIA, A. Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. **J. Exp. Med.**, v. 182, p. 389-400, 1995.

SCAFFIDI, P.; MISTELI, T.; BIANCHI, M. E. Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. **Nature**, v. 418, p. 191–195, 2002.

SCHINKEL C. The role of IFN-gamma in surgical patients. **J. Interferon Cytokine Res.**, v. 23, n. 7, p. 341-349, 2003.

SCHNURR, M.; THEN, F.; GALAMBOS, P.; SCHOLZ, C.; SIEGMUND, B.; ENDRES, S.; EIGLER, A. Extracellular ATP and TNF-alpha synergize in the activation and maturation of human dendritic cells. **J. Immunol.**, v. 165, p. 4704-4709, 2000.

SCHÜTTE, H.; LOHMEYER, J.; ROSSEAU, S.; et al. Bronchoalveolar and systemic cytokine profiles in patients with ARDS, severe pneumonia and cardiogenic pulmonary oedema. **Eur. Respir. J.**, v. 9, n. 9, p. 1858–1867, 1996.

SEEKAMP, A.; WARD, P. A. Ischemia-reperfusion injury. **Agents Actions Suppl**, v. 41, p. 137-152, 1993.

SEELY, A. J. E.; PASCUAL, J. L.; CHRISTOU, N. V. Science review: Cell membrane expression (connectivity) regulates neutrophil delivery, function and clearance. **Crit. Care**, v. 7, n. 4, p. 291–307, 2003.

SEMINO, C.; CECCARELLI, J.; LOTTI, L. V.; TORRISI, M. R.; ANGELINI, G.; RUBARTELLI, A. The maturation potential of NK cell clones toward autologous dendritic cells correlates with HMGB1 secretion. **J. Leukoc. Biol.**, v. 81, p. 92–99, 2007.

SHIGEMATSU, T.; WOLF, R. E.; GRANGER, D. N. T-lymphocytes modulate the microvascular and inflammatory responses to intestinal ischemia-reperfusion. **Microcirculation**, v. 9, p. 99-109, 2002.

SILVERMAN, M. N.; STERNBERG, E. M. Glucocorticoid regulation of inflammation and its functional correlates: from HPA axis to glucocorticoid receptor dysfunction. **Ann. NY. Acad. Sci.**, n.1261, p. 55-63, 2012.

SITKOVSKY, M. V.; OHTA, A. The 'danger' sensors that STOP the immune response: the A2 adenosine receptors? **Trends Immunol.**, v. 26, p. 299-304, 2005.

SOARES, A. L.; COELHO, F. R.; GUABIRABA, R.; KAMAL, M.; VARGAFTIG, B. B.; LI, L.; LI, J.; TAVARES-DE-LIMA, W.; RYFFEL, B. Tumor necrosis factor is not associated with intestinal ischemia/reperfusion-induced lung inflammation. **Shock**, v. 34, n. 3, p. 306-313, 2010.

SOREIDE, K. Epidemiology of major trauma. **Br. J. Surg.**, n. 96, p. 697–698, 2009.

SORKINE, P.; SETTON, A.; HALPERN, P.; MILLER, A.; RUDICK, V.; MARMOR, S.; KLAUSNER, J. M.; GOLDMAN, G. Soluble Tumor Necrosis Factor Receptors Reduce Bowel Ischemia-Induced Lung Permeability and Neutrophil Sequestration. **Crit. Care Med.**, v. 23, p. 1377-1381, 1995.

SOUZA, A. L. JR.; POGGETTI, R. S.; FONTES, B.; BIROLINI D. Gut ischemia/reperfusion activates lung macrophages for tumor necrosis factor and hydrogen peroxide production. **J. Trauma**, n. 49, v. 2, p. 232-236, 2000.

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.**, v. 170, n. 9, p. 4759-4766, 2003.

SPEYER, C. L.; RANCILIO, N. J.; MCCLINTOCK, S. D.; CRAWFORD, J. D.; GAO, H.; SARMA, J. V.; WARD, P. A. Regulatory effects of estrogen on acute lung inflammation in mice. **Am. J. Physiol-Cell Ph.**, v. 288, p. 881-890, 2005.

STEINBERG, S. M. Bacterial translocation: what it is and what it is not. **Am. J. Surg.**, n. 186, n.3, p. 301-305, 2003.

SUGIMOTO, R.; OKAMOTO, T.; NAKAO, A.; ZHAN, J.; WANG, Y.; KOHMOTO, J.; TOKITA, D.; FARVER, C. F.; TARPEY, M. M.; BILLIAR, T. R.; GLADWIN, M. T.; MCCURRY, K. R. Nitrite reduces acute lung injury and improves survival in a rat lung transplantation model. **Am. J. Transplant.**, n. 12, v. 11, p. 2938-2948, 2012.

SUN, Z.; OLANDERS, K.; LASSON, A.; DIB, M.; ANNBORN, M.; ANDERSSON, K.; WANG, X.; ANDERSSON, R. Effective treatment of gut barrier dysfunction using an antioxidant, a PAF inhibitor, and monoclonal antibodies against the adhesion molecule PECAM-1. **J. Surg. Res.**, v. 105, p. 220-233, 2002.

TRAUTMANN, A. Extracellular ATP in the immune system: more than just a “danger signal”. **Sci. Signal.**, v. 2, p. 6-8, 2009.

TSUNG, A.; SAHAI, R.; TANAKA, H.; NAKAO, A.; FINK, M.P.; LOTZE, M.T. The nuclear factor HMGB1 mediates hepatic injury after murine liver ischemia-reperfusion. **J. Exp. Med.**, v. 201, p. 1135–1143, 2005.

TSUSHIMA, K.; KING, L. S.; AGGARWAL, N. R.; et al. Acute lung injury review. **Int. Med.**, v. 48, n. 9, p. 621–630, 2009.

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.**, v. 11, n. 2, p. 179-197, 2000.

VICTONI, T.; COELHO, F. R.; SOARES, A. L.; DE FREITAS, A.; SECHER, T.; GUABIRABA, R.; ERARD, F.; DE OLIVEIRA-FILHO, R. M.; VARGAFTIG, B. B.; LAUVAUX, G.; KAMAL, M. A.; RYFFEL, B.; MOSER, R.; TAVARES-DE-LIMA, W. Local and remote tissue injury upon intestinal ischemia and reperfusion depends on the TLR/MyD88 signaling pathway. **Med. Microbiol. Immunol.**, v. 199, n. 1, p. 35-42, 2010.

VITORETTI, L. B. **Perfil temporal da inflamação pulmonar induzida pela isquemia/reperfusão intestinal em ratos. Estudo do papel do sistema linfático.** 2010. 154 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

WANG, H.; BLOOM, O.; ZHANG, M.; OMBRELLINO, M.; CHE, J.; VISHNUBHAKAT, J. M.; FRAZIER, A.; IVANOVA, S.; BOROVIKOVA, L.; MANOGUE, K.. Identification of HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice. **Science**, v. 285, p. 248-251, 1999.

WANG, W.; SMAIL, N.; WANG, P.; CHAUDRY, I. H. Increased gut permeability after hemorrhage is associated with upregulation of local and systemic IL-6. **J. Surg. Res.**, v. 79, p. 39-46, 1998.

WANG, Y.; XU, H.; MIZOGUCHI, K.; OE, M.; MAETA, H. Intestinal ischemia induces late preconditioning against myocardial infarction: a role for inducible nitric oxide synthase. **Cardiovasc. Res.**, v. 49, p. 391–398, 2001.

WARD, D.T.; LAWSON, S.A.; GALLAGHER, C.M.; CONNER, W.C.; SHEA-DONOHUE, T. Sustained nitric oxide production via L-arginine administration ameliorates effects of intestinal ischemia– reperfusion. **J. Surg. Res.**, v. 89, p. 13–19, 2000.

WARD, N. S.; CASSERLY, B.; AYALA, A. The compensatory anti-inflammatory response syndrome (CARS) in critically ill patients. **Clin. Chest Med.**, v. 29, n.4, p. 617-625, 2008.

WARE, L. B.; MATTHAY, M. A. Alveolar fluid clearance is impaired in the majority of patients with acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. **Am. J. Resp. Crit. Care**, v. 163, n. 6, p. 1376–1383, 2001.

WIEST, R.; RATH, H. C. Gastrointestinal disorders of the critically ill. Bacterial translocation in the gut. **Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.**, n. 17, v. 3, p. 397-425, 2003.

XU, Y. X.; AYALA, A.; CHAUDRY, I. H. Prolonged immunodepression after trauma and hemorrhagic shock. **J. Trauma**, n. 44, p. 335–341, 1998.

YASUHARA H. Acute mesenteric ischemia: the challenge of gastroenterology. **Surg. Today**, v. 35, n. 3, p. 185-195, 2005.

YILMAZ, G.; ARUMUGAM, T. V.; STOKES, K. Y.; GRANGER, D. N. Role of T lymphocytes and interferon-gamma in ischemic stroke. **Circulation**, n. 113, p. 2105–2112, 2006.

ZINGARELLI, B.; YANG, Z.; HAKE, P. W.; DENENBERG, A.; WONG, H. R. Absence of endogenous interleukin 10 enhances early stress response during post-ischaemic injury in mice intestine. **Gut**, v. 48, n. 5, p. 610-622, 2001.