ISMAEL FRANCISCO MOTA SIQUEIRA GUARDA

**Estudo dos efeitos do etil-piruvato, salina hipertônica e do Ringer
lactato sobre a resposta da microcirculação mesentérica em modelo de
sepse induzida por *Escherichia coli* em ratos**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para a
obtenção do título de Doutor em Ciências

Programa de Anestesiologia

Orientadora: Prof^a. Dra. Paulina Sannomiya

São Paulo

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Guarda, Ismael Francisco Mota Siqueira

Estudo dos efeitos do etil-piruvato, salina hipertônica e do Ringer lactato sobre a resposta da microcirculação mesentérica em modelo de sepse induzida por *Escherichia coli* em ratos / Ismael Francisco Mota Siqueira Guarda. -- São Paulo, 2014.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Anestesiologia.

Orientadora: Paulina Sannomiya.

Descritores: 1.Piruvatos 2.Solução salina hipertônica 3.Sepse 4.Microcirculação
5.Selectina-P 6.Molécula 1 de adesão intercelular 7.*Escherichia coli* 8.Ratos Wistar

USP/FM/DBD-341/14

DEDICATÓRIA

DEDICATÓRIA

*À minha esposa Renata,
amiga e parceira em todos os momentos da minha vida.*

*Às minhas filhas Mariana, Samira e Rafaela,
meus incentivos à vida.*

Aos meus pais, José Guarda e Maria de Lourdes Motta Siqueira Guarda.

Wilson Abrão Saad e Antonina Amaral Saad.

Aos meus irmãos Marília Carolina, Roberta, Luciana, Abrão e Emerson.

AGRADECIMENTOS

AGRADECIMENTOS

À Professora Paulina Sannomiya, pela orientação deste trabalho, por compartilhar seus conhecimentos, pelo papel educador, pela dedicação, carinho e paciência.

Aos “amigos de pesquisa” que tornaram este projeto uma realidade:

Cristiano de Jesus Correia, Ana Carolina Ramos Moreno, Ana Cristina Breithaupt-Fallopá, Sueli Gomes Ferreira, Rafael Simas, Laura Menegat e Fernando Luiz Zanoni.

Aos Professores Maria José Carmona, Marina Martinez e Luiz Felipe Pinho Moreira.

Aos alunos de iniciação científica: Clebson de Lima Ferreira, Mariane Taborda e Roberto Armstrong.

Aos “amigos de Laboratório”: Leila Peralta Areco, Roberta Figueiredo Vieira, Paulo Thales Rocha de Sousa, Sérgio da Silva Sales e José Walber Miranda Costa Cruz.

Aos colaboradores da Pós Graduação da Anestesiologia: Claudia Alexandria Pereira e Arlen Clayton.

Aos colegas anestesistas do Hospital das Clínicas da FMUSP: Brigitte Feiner de Mello, Sandra Regina Salateo, Josué de Paula Posso, Daniel Ibanhes e Rodrigo Guerson André.

Ao Professor Wilson Abrão Saad, pelo incentivo e parceria em pesquisa científica.

E finalmente a Deus.

EPÍGRAFE

EPÍGRAFE

“Feliz daquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina”

Cora Coralina

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA

AGRADECIMENTOS

EPÍGRAFE

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	4
3. REVISÃO DA LITERATURA	6
3.1 Seps e microcirculação	6
3.2 Considerações terapêuticas sobre o etil-piruvato	10
3.3 Considerações terapêuticas sobre a solução salina hipertônica	11
3.4 Ringer lactato	13
4. MÉTODOS	15
4.1 Animais	15
4.2 Anestesia e preparação cirúrgica	15
4.3 Preparação do Inóculo e Suspensão de Bactérias	16

4.4 Grupos e tratamentos	17
4.5 Esquema do protocolo experimental	18
4.6 Medidas hemodinâmicas e temperatura.....	18
4.7 Gasometria e leucograma	19
4.8 Microscopia intravital <i>in situ</i> de mesentério	19
4.9 Quantificação de P-selectina e ICAM-1 por imunohistoquímica	21
4.10 Análise estatística.....	22
5. RESULTADOS.....	24
5.1 Mortalidade.....	24
5.2 Efeito da infusão de bactérias sobre o leucograma e número de plaquetas	24
5.3 Efeito da infusão de bactérias sobre as variáveis PAM e temperatura.....	26
5.4 Efeito da bacteremia sobre a gasometria, eletrólitos, hematócrito e lactato	28
5.5 Microscopia intravital: critérios na avaliação.....	30
5.6 Efeitos dos tratamentos com Ringer lactato e Ringer etil-piruvato sobre as interações leucócito-endotélio.....	31
5.7 Efeitos dos tratamentos com Ringer lactato e Ringer etil-piruvato sobre a expressão de P-selectina e ICAM-1	33
5.8 Efeitos dos tratamentos com Ringer lactato e Solução salina Hipertônica 7,5% sobre as interações leucócito-endotélio	36

5.9 Efeitos dos tratamentos com Ringer lactato e solução salina hipertônica sobre a expressão de P-selectina e ICAM-1	39
6. DISCUSSÃO	43
7. CONCLUSÕES	49
8. ANEXO	51
9. REFERÊNCIAS	53

RESUMO

RESUMO

Guarda IFMS. *Estudo dos efeitos do etil-piruvato, salina hipertônica e do Ringer lactato sobre a resposta da microcirculação mesentérica em modelo de sepse induzida por Escherichia coli em ratos* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2014.

INTRODUÇÃO: Estudos recentes em modelos experimentais de sepse demonstraram as propriedades antioxidante e anti-inflamatória do etil-piruvato. Diferentes modelos experimentais também demonstraram que pequenos volumes de solução salina hipertônica (7,5%) melhoram a hemodinâmica, a microcirculação e modulam o sistema imunológico. Este estudo teve como objetivo investigar os efeitos do etil-piruvato, da solução salina hipertônica e da solução de Ringer lactato sobre a microcirculação mesentérica em modelo de sepse induzida por *Escherichia coli* viva em ratos. MÉTODOS: Ratos Wistar machos receberam por via endovenosa uma suspensão de *E. coli* ou foram submetidos ao procedimento cirúrgico do grupo falso-operado. Após três horas da infusão bacteriana os animais foram randomizados em: grupo controle não tratado, grupo tratado com solução de Ringer lactato (4mL/kg i.v.); grupo tratado com solução de Ringer lactato (4 mL/kg i.v.) associado a etil-piruvato (50mg/kg) e grupo tratado com solução salina hipertônica (7,5%, 4 mL/kg i.v.). Após 24 horas da bacteremia, as interações leucócito-endotélio foram investigadas por

microscopia intravital, e a expressão de P-selectina e da molécula de adesão intercelular (ICAM)-1 determinada por imuno-histoquímica. Leucograma e contagem de plaquetas foram realizadas no início do estudo, 3 horas e 24 horas após a inoculação de *E. coli*. RESULTADOS: Os grupos não tratado e tratado com solução de Ringer lactato exibiram um aumento no número de leucócitos *rollers* (~ 2,5 vezes), leucócitos aderidos (~ 3,0 vezes), e de leucócitos migrados (~ 3,5 vezes) comparados ao grupo falso operado. O tratamento com etil-piruvato reduziu o número de leucócitos *rollers*, aderidos e migrados aos níveis obtidos no grupo falso operado ($p>0,05$). Efeitos semelhantes foram observados nos animais tratados com a solução salina hipertônica ($p>0,05$). A expressão de P-selectina e de ICAM-1 aumentou significativamente na microcirculação mesentérica no grupo não tratado, comparado ao grupo falso operado ($p<0,001$). Todos os tratamentos reduziram a expressão de ambas moléculas de adesão, sendo os grupos tratados com etil-piruvato e solução salina hipertônica mais eficazes. A infusão de bactérias provocou leucopenia significativa, seguida por leucocitose com granulocitose, e concomitante redução progressiva no número de plaquetas. CONCLUSÕES: Os dados apresentados sugerem que o etil-piruvato e a solução salina hipertônica (7,5%) eficientemente reduziram a resposta inflamatória na microcirculação mesentérica no presente modelo experimental de sepse induzida por *E. coli* viva; associada, pelo menos em parte, a menor expressão de moléculas de P-selectina e ICAM-1.

Descritores: Etil-piruvato, salina hipertônica, sepse, microcirculação, P-selectina, ICAM-1.

ABSTRACT

ABSTRACT

Guarda IFMS. *Effects of ethyl-pyruvate, hypertonic saline and lactated Ringer's solution on mesenteric microcirculation in a sepsis model induced by Escherichia coli in rats* [thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2014.

BACKGROUND: Experimental studies on sepsis have demonstrated that ethyl pyruvate is endowed with antioxidant and anti-inflammatory properties. It has been shown that small volumes of hypertonic saline solution (7.5%) improve hemodynamics, the microcirculation, and modulate the immune system. This study aimed to investigate the effects of ethyl pyruvate, hypertonic saline and lactated Ringer's solution on mesenteric microcirculation in a sepsis model induced by live *Escherichia coli* in rats.

METHODS: Male Wistar rats were underwent an intravenous suspension of *E. coli* bacteria or submitted to the sham procedure. After 3h of bacteria infusion rats were randomized into: control, without treatment; treated with lactated Ringer's solution (4 mL/kg, i.v.); treated with lactated Ringer's solution (4mL/kg, i.v.) plus ethyl pyruvate (50mg/kg), and treated with hypertonic saline solution (7.5%, 4 mL/kg i.v.). At 24h after bacteria infusion leukocyte-endothelial interactions were investigated by intravital microscopy, and the expression of P-selectin and intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 evaluated by immunohistochemistry. White blood cell and platelet counts

were determined at baseline, 3h and 24h after *E. coli* inoculation. RESULTS: Both non-treated and lactated Ringer's-treated groups exhibited an increase in the number of rolling leukocytes (~2.5-fold), adherent (~3.0-fold), and migrated cells (~3.5-fold) compared to sham. Treatment with Ringer's ethyl pyruvate solution reduced the number of rolling, adherent and migrated leukocytes to the levels attained in the sham group ($p>0.05$). Similar effects were observed when animals were treated with hypertonic saline ($p>0.05$). The expression of P-selectin and ICAM-1 significantly increased on mesenteric microvessels in non-treated group compared with sham ($p<0.001$). All treatments reduced the expression of both adhesion molecules being ethyl pyruvate and hypertonic saline solution more effective than lactated Ringer's solution. Infusion of bacteria caused a significant leucopenia (3h), followed by a leucocytosis with granulocytosis (24h). There was an intense and progressive reduction in the number of platelets. No differences were observed after treatment with the different solutions. CONCLUSIONS: Data presented suggest that ethyl pyruvate and hypertonic saline solution (7.5%) efficiently reduce the inflammatory response at mesenteric microcirculation in an experimental model of sepsis induced by live *E. coli* associated, at least in part, with a down-regulation of P-selectin and ICAM-1.

KEY WORDS: Ethyl pyruvate, hypertonic saline, sepsis, microcirculation, P-selectin, ICAM-1

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A microcirculação tem a função vital de fornecer oxigênio e outros substratos essenciais às células, além de remover os seus produtos do metabolismo celular. Também é reconhecido que, na microcirculação, células endoteliais desempenham um papel chave no reconhecimento e desenvolvimento inicial do processo inflamatório por sofrer ativação e recrutar células do sistema imune para os tecidos e focos de inflamação. Este processo é caracterizado por interações dos leucócitos com o endotélio, resultado da liberação de mediadores inflamatórios, e da expressão de moléculas de adesão.

Em casos de sepse e/ou Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica (SIRS) as alterações microcirculatórias podem ser detectadas na fase inicial da doença e podem persistir independentemente da evolução de parâmetros macro-hemodinâmicos (De Backer et al., 2002; Trzeciak et al., 2007). De acordo com Sakr et al. (2004), a presença de alterações microcirculatórias persistentes estão associadas a um pior prognóstico. Por conseguinte, intervenções terapêuticas que atuem na fase inicial de desenvolvimento da sepse podem ser benéficas para seu tratamento.

Estudos recentes utilizando a solução de Ringer etil-piruvato em modelos experimentais de sepse demonstram que o etil-piruvato pode ser um promissor agente terapêutico para o tratamento da sepse. Enquanto há suficiente comprovação das ações anti-inflamatórias e antioxidantes do etil-

piruvato em modelos de isquemia-reperfusão e de sepse (Hauser et al., 2005; Venkataraman et al., 2002), não existem estudos sobre seus efeitos na interação leucócito-endotélio na vigência de inflamação/infecção. Da mesma forma, apesar de consistentes evidências do efeito imunomodulador da solução salina hipertônica 7,5% em modelos experimentais de choque hemorrágico e reperfusão (Poli de Figueiredo et al., 2006; Yada-Langui et al., 2000; 2004), poucos artigos se referem a esta solução como agente terapêutico envolvendo sepse.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Objetivo geral

Este estudo tem como objetivo investigar os efeitos do etil-piruvato, da solução salina hipertônica a 7,5% e da solução de Ringer lactato sobre as interações leucócito-endotélio na microcirculação mesentérica em modelo de sepse induzida por injeção endovenosa de *Escherichia coli*.

Objetivos específicos

Pretende-se investigar:

1. Os parâmetros hemodinâmicos, temperatura corporal, gasometria arterial e leucograma;
2. As interações leucócito-endotélio sobre a microcirculação mesentérica;
3. A expressão de moléculas de adesão endoteliais (P-selectina e ICAM-1) no leito vascular mesentérico.

REVISÃO DA LITERATURA

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Seps e microcirculação

A seps e a Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica (SIRS) acometem, com frequência, a evolução de pacientes expostos ao trauma, hemorragia e grandes cirurgias, particularmente os idosos e imunocomprometidos (Angus et al., 2001; Annane et al., 2005; Bochud e Calandra, 2003; Silva et al., 2004;). Mesmo com intervenções terapêuticas orientadas a um melhor aporte hemodinâmico e o desenvolvimento de novas gerações de antibióticos (Chaudry, 1999; Marshall et al., 2004; Rivers et al., 2001; Vincent, 2001; Vincent e Gerlach, 2004), a seps e suas complicações são responsáveis por uma taxa de mortalidade de até 70% em unidades de terapia intensiva (Angus et al., 2001; Hotchkiss e Karl ,2003).

A seps é definida como a resposta inflamatória sistêmica na vigência de infecção, associada a dois ou mais critérios para o diagnóstico de SIRS. Na maioria dos casos de seps por bactérias Gram-negativas, os agentes são enterobactérias *Escherichia coli*, espécies de *Klebsiella* e *Pseudomonas aeruginosa*, que acometem usualmente os pulmões, tratos gastrointestinal e urinário, e a corrente sanguínea. Dentre as bactérias Gram-positivas, estafilococos (*Staphylococcus aureus*) e estreptococos (*Streptococcus pneumoniae*) estão presentes nas infecções da pele e tecidos moles, nas infecções primárias da corrente sanguínea e dos pulmões (Annane et al.,

2005; Bochud e Calandra, 2003). Sintomas como febre, leucocitose ou leucopenia, taquicardia e taquipnéia são decorrentes da liberação de mediadores inflamatórios por diversos tecidos, incluindo macrófagos, monócitos, neutrófilos e células endoteliais (Bochud e Calandra, 2003; Bone et al., 1992;).

O elemento essencial no desencadeamento da sepse é a presença do componente lipopolissacarídeo (LPS) da parede externa das bactérias gram-negativas. O LPS liga-se a uma proteína de fase aguda denominada proteína de ligação ao LPS, e forma um complexo 1000 vezes mais ativo que o LPS livre (Mathison et al., 1992). Este complexo, por sua vez, liga-se à glicoproteína de membrana CD14, expressa por macrófagos e outras células monocíticas, que o transfere às estruturas denominadas *Toll-like Receptors* (TLRs), protótipos de receptores que identificam padrões moleculares associados aos patógenos. A ativação do TLR inicia uma série de eventos intracelulares envolvendo proteínas e fatores de transcrição de inúmeros genes que codificam citocinas, quimiocinas, moléculas de adesão e de enzimas induzidas como a ciclooxigenase do tipo 2 (COX-2) e óxido nítrico sintase induzida (iNOS) (Akira et al., 2001; Takeda et al., 2003).

O fator de necrose tumoral alfa (TNF- α , *tumor necrosis factor- α*) é liberado precocemente durante a instalação da sepse, sendo considerado um mediador da cascata inflamatória que regula a síntese de várias citocinas e quimiocinas. Em modelos experimentais de sepse, o aumento na síntese de TNF- α está diretamente relacionado ao desenvolvimento de choque séptico e insuficiência múltipla de órgãos (Coimbra et al., 2005; Tracey et al.,

1987). A rápida liberação de TNF- α tem papel fundamental na síntese de moléculas de adesão em neutrófilos (complexo CD11b/CD18) e células endoteliais (*intercellular adhesion molecule -1*, ICAM-1) (Collins et al., 1995).

O TNF- α e a interleucina (IL)-1 β estimulam a expressão de ICAM-1 e E-selectina em células endoteliais, e ativam o fator nuclear κ B (NF- κ B) em diversos tecidos (Christman et al., 1998; Rahman e Macnee, 1998). NF- κ B é um fator diretamente envolvido na transcrição de genes pró-inflamatórios que promovem a expressão de várias citocinas, moléculas de adesão e da iNOS. A fosforilação da proteína inibitória I κ B ligada aos dímeros inativos da NF- κ B (p50, p52, p65 [Rel A] e Rel B) permite que o dímero NF- κ B ativado se transloque do citosol para o núcleo, onde se liga à região promotora de vários genes responsivos.

Além dos componentes da parede celular de bactérias, vários outros fatores podem desencadear a ativação do endotélio, incluindo a interação com leucócitos e com plaquetas, pela ativação da via da coagulação e por vários mediadores inflamatórios plasmáticos (Pober et al., 2009). A ativação de células endoteliais e leucócitos é uma resposta imune primária, inicialmente fisiológica, contra a invasão bacteriana. Os leucócitos devem ser ativados para aderir à parede microvascular e migrar para o tecido perivascular. Este processo é mediado por uma variedade de glicoproteínas expressas na superfície dos leucócitos e de células endoteliais que resultam em maior aderência dos leucócitos às vênulas pós-capilares. Inicialmente, os leucócitos rolam ao longo da parede de vênulas pós-capilares, como consequência da expressão de moléculas de adesão da família das

selectinas e tornam-se firmemente aderidos ao endotélio pela interação da ICAM-1 em células endoteliais com moléculas da família das $\beta 2$ integrinas (complexo CD11/CD18) em leucócitos (Granger e Kubes, 1994; Marshall, 2005). Os neutrófilos, quando migrados, geram e liberam produtos tóxicos como radicais livres de oxigênio, proteases e produtos da ativação da fosfolipase A_2 , que provocam e perpetuam alterações vasomotoras, lesão endotelial e perda da integridade vascular (Marshall, 2005).

Na sepse, a disfunção endotelial é seguida pela migração de leucócitos e extravasamento de fluidos para o interstício, hipovolemia, hipotensão e distúrbios de coagulação que resultam em disfunção da perfusão tecidual, hipóxia e finalmente falência orgânica (Ince, 2005; Sakr et al., 2004; Shouten et al., 2008).

Em pacientes sépticos, tem sido demonstrado que alterações microcirculatórias ocorrem precocemente independentemente da gravidade da sepse. Nos casos de sepse grave estas alterações são caracterizadas por importante heterogeneidade do fluxo sanguíneo microcirculatório e pela diminuição da densidade capilar funcional (De Backer et al., 2002; Sakr et al., 2004; Spanos et al., 2010; Trzeciak et al., 2008).

Em modelos experimentais, a técnica de microscopia intravital (MIV) aplicada ao estudo da microcirculação permite, em tempo real, a visualização direta dos vasos e as interações leucócito-endotélio (Anjos-Valotta et al., 2006; Farsky et al., 1995; Sannomiya et al., 1997).

3.2 Considerações terapêuticas sobre o etil-piruvato

O etil-piruvato é um composto derivado do piruvato, um importante intermediário metabólico. Sua propriedade anti-oxidante sobre espécies reativas de oxigênio despertou grande interesse científico pela sua possível aplicação em situações de isquemia-reperfusão (Fink, 2004, Sims et al., 2001).

Os efeitos modulatórios sobre o processo inflamatório em modelos experimentais de isquemia-reperfusão e choque hemorrágico (Sims et al., 2001; Tawadrous et al., 2002; Yang et al., 2004) impulsionaram as pesquisas do etil-piruvato em modelos de sepse. Ulloa et al. (2002) verificaram que o etil piruvato atenua a inflamação sistêmica provocada por endotoxemia ou sepse, mesmo quando administrado após a liberação do TNF- α . Este efeito anti-inflamatório foi confirmado por Venkataraman et al. (2002) em modelo de sepse induzida por LPS, associando-se a menores concentrações de IL-6 e maiores de IL-10. Sappington et al. (2003) demonstraram em ratos injetados com LPS que mesmo a administração tardia do etil-piruvato é eficaz na redução da hipermeabilidade da mucosa intestinal e da translocação bacteriana para os gânglios linfáticos do mesentério. Em modelo de disfunção renal provocada pela injeção de LPS e por ligadura cecal e perfuração, o etil-piruvato reduz a disfunção renal e a insuficiência de múltiplos órgãos (Miyaji et al., 2003). Hauser et al. (2005) investigaram os efeitos metabólicos e hemodinâmicos do etil-piruvato sobre a circulação sistêmica, pulmonar, hepática e esplâncnica em porcos sob

endotoxemia crônica provocada pela infusão contínua de LPS. Neste estudo, a acidose metabólica sistêmica e regional reduz-se significativamente, com melhora da estabilidade hemodinâmica e normalização dos parâmetros gasimétricos, efeitos estes atribuídos à redução do estresse oxidativo e à liberação de óxido nítrico.

3.3 Considerações terapêuticas sobre a solução salina hipertônica

Velasco et al. (1980) publicaram a primeira pesquisa sobre a utilização de solução salina hipertônica (7,5%, 2400 mOsm/L) a pequeno volume na restauração hemodinâmica em modelo de choque hemorrágico. Estudos subsequentes comprovaram que esta solução promove a expansão imediata do volume sanguíneo (Rocha e Silva e Poli de Figueiredo, 2005), restaura o débito cardíaco e o fluxo sanguíneo regional (Bruskagin et al., 2002; Poli de Figueiredo et al., 2006; Rocha e Silva e Poli de Figueiredo, 2005; Varicoda et al., 2003). Também foram demonstradas propriedades imunomoduladoras, em experimentos conduzidos *in vivo* e *in vitro* (Coimbra et al., 1995, 1996, 1997), que incluem redução significativa da mortalidade de animais submetidos à isquemia/reperfusão e sepse, aumento da proliferação de linfócitos T e diminuição da síntese/liberação de prostaglandina E₂ e de IL-4.

Entretanto, poucos estudos se referem à solução salina hipertônica como agente terapêutico em sepse. Em modelo de ligadura cecal e

perfuração, Shih et al. (2008) demonstraram que a salina hipertônica previne a insuficiência cardíaca e ameniza a síndrome de disfunção múltipla dos órgãos comparada ao tratamento com solução de Ringer lactato. Estes efeitos foram atribuídos à redução do infiltrado neutrofílico pulmonar e da necrose hepática. Estes mesmos autores relataram, posteriormente, que o uso de duas doses de salina hipertônica (3 e 9 horas após ligadura cecal), reduz a hiponatremia, a hipocalcemia, a acidose metabólica e distúrbios hidroeletrólíticos (Shih et al., 2012). Em modelo de endotoxemia, Yu et al. (2012) relataram que a ressuscitação a pequeno volume com salina hipertônica reduz a lesão pulmonar quando comparada à solução salina isotônica. Estes resultados foram confirmados por Kim e Lee (2012) em modelo de dupla lesão (hemorragia + ligadura cecal e perfuração). Gao et al. (2009) relataram, em modelo de hemorragia associada ao LPS, que a solução salina hipertônica reduz a lesão e o edema pulmonar. Em ratos submetidos à obstrução intestinal e isquemia, a solução de Ringer lactato ou salina hipertônica foram usadas por Zanoni et al. (2013) como tratamento inicial, seguido pela enterectomia do segmento necrotizado. O tratamento com salina hipertônica 7,5% reduz a concentração sérica de quimiocinas, as interações leucócito-endotélio na microcirculação mesentérica e a translocação bacteriana, quando comparado ao tratamento com solução de Ringer lactato.

3.4 Ringer lactato

A solução de Ringer lactato ainda permanece como principal opção de tratamento de reposição volêmica em casos de re-hidratação em virtude de sua composição hidroeletrólítica próxima a do líquido extracelular do organismo: sódio (130,0 mEq/L), potássio (4,0 mEq/L), cálcio (3,0 mEq/L), cloreto (109,0 mEq/L), lactato (28,0 mEq/L), osmolaridade 272 mOsmol/L, e pH 6,0 - 7,5.

Em nosso estudo, a solução de Ringer lactato foi utilizada como “solução controle” ao tratamento com etil-piruvato e ao tratamento com solução salina hipertônica.

MÉTODOS

4. MÉTODOS

4.1 Animais

Os animais foram manipulados de acordo com as diretrizes do *National Institutes of Health* (1985) para o cuidado, manipulação e utilização de animais de laboratório. Os experimentos foram realizados no Laboratório de Investigação Médica (LIM)-11, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Ratos machos da linhagem Wistar com peso entre 250 e 300 g e idade de 08 a 10 semanas, provenientes do biotério da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, foram mantidos em estantes ventiladas, a temperatura de $23\pm 1^{\circ}\text{C}$, com períodos de claro e escuro de 12 horas, sem restrição à ingestão de água e ração.

4.2 Anestesia e preparação cirúrgica

Os animais foram submetidos à anestesia geral com pentobarbital sódico, 50 mg/kg, administrado por via intraperitoneal e doses complementares de 4 mg/kg por via venosa (i.v.), quando necessário, para manutenção do plano anestésico. Os animais foram posicionados em decúbito dorsal, em mesas cirúrgicas, com as patas fixadas lateralmente. Foram realizadas tricotomia e anti-sepsia com iodopovidine da região

cervical à direita. A artéria carótida e veia jugular direita foram dissecadas e canuladas com cateteres de polietileno PE-10 adaptados a cateteres PE-50 (Clay Adams PE-10, PE-50), os quais foram preenchidos com solução fisiológica heparinizada, ocluídos com obturador e exteriorizados pelo dorso do animal. Um período de recuperação cirúrgica de 24 horas foi concedido a todos os animais antes dos experimentos.

4.3 Preparação do Inóculo e Suspensão de Bactérias

O inóculo da bactéria foi preparado a partir de culturas de *E. coli* obtidas previamente de linfonodos mesentéricos de ratos Wistar em modelo experimental de sepse induzida por obstrução intestinal (Zanoni et al., 2009); e mantidas no Laboratório de Microbiologia, Departamento de Análises Clínicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. As amostras de *E. coli* foram semeadas em ágar (Agar de Soja TSA Tryplice – DIFCO®) e incubadas por 18 horas em estufa bacteriológica a 37°C. Duas horas antes da inoculação, uma suspensão de bactérias em solução salina foi ajustada para a densidade óptica de 2,0 a um comprimento de onda de 625 nm. Esta suspensão bacteriana ($3-5 \times 10^9$ UFC/mL) determina, aproximadamente, 50% de mortalidade dentro de 7 dias.

4.4 Grupos e tratamentos

Os animais foram randomizados em 5 grupos:

- (1) FO – falso operado, apenas submetido ao preparo cirúrgico;
- (2) ST – grupo inoculado com *E. coli* sem tratamento;
- (3) RL – grupo inoculado com *E. coli* tratado com solução de Ringer lactato, Baxter® (Na^+ 130 mEq/L; K^+ 4 mEq/L; Ca^{++} 3 mEq/L; Cl^- 109 mEq/L; lactato 28 mEq/L);
- (4) SH – grupo inoculado com *E. coli* tratado com solução salina hipertônica a 7,5% (Na^+ 1200 mEq/L; Cl^- 1200 mEq/L);
- (5) REP – grupo inoculado com *E. coli* tratado com solução de Ringer etil-piruvato - constituído a partir da adição de 50 mg/kg de etil-piruvato (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, USA) ao Ringer lactato.

O volume das soluções foi fixado em 4mL/kg, evitando-se assim possíveis efeitos de diferentes volumes infundidos; e administrado 3 horas após a inoculação bacteriana em dose única, por meio de bomba de infusão a velocidade de 0,2 mL/min (Figura 1). A dose de etil-piruvato utilizada neste estudo foi baseada em observações experimentais de outros autores (Uchiyama et al., 2003; Yang et al., 2004).

4.5 Esquema do protocolo experimental

Figura 1. Protocolo experimental.

Para a aquisição de dados hemodinâmicos, coleta de amostras sanguíneas e de tecido mesentérico foram utilizados 33 ratos. Para a MIV foram utilizados independentemente 42 ratos.

4.6 Medidas hemodinâmicas e temperatura

O cateter PE-50 arterial foi conectado a um transdutor de pressão (P23XL, Viggo-Spectramed Inc., Oxnard, CA, EUA), ligado a um sistema multicanal de aquisição de dados biológicos (Acqknowledge – Biopac Systems, Inc., Goleta, CA, EUA) para o registro da pressão arterial média

(PAM) dos animais, monitorada ao longo dos experimentos. Medidas da temperatura retal foram obtidas por termômetro digital.

4.7 Gasometria e leucograma

Amostras de sangue, coletadas da cauda do animal, foram utilizadas para as contagens total e diferencial dos leucócitos. As amostras (20 µL) foram diluídas em solução de Turk (1:20) para a quantificação do número total de leucócitos em câmara de Neubauer. A contagem diferencial dos leucócitos foi realizada em extensão sanguínea corada pelo método Instant Prov® (Newprov Produtos para Laboratórios, Pinhais, PR, Brasil). Foram contadas 100 células por lâmina, diferenciando-se os tipos celulares em linfócitos, neutrófilos, monócitos e eosinófilos. Amostras de sangue, obtidas do cateter arterial, foram utilizadas para a determinação da gasometria, lactato e hematócrito (Radiometer ABL 555, Radiometer Medical, Copenhagen, Denmark).

4.8 Microscopia intravital *in situ* de mesentério

A MIV foi realizada 24 horas após a indução da bacteremia. Após obtenção de anestesia (pentobarbital sódico, 4 mg/kg, i.v.) foi realizada incisão cutânea e muscular na porção lateral direita do abdome para a exteriorização do leito vascular mesentérico e observação da

microcirculação. Os animais foram mantidos em decúbito lateral direito sobre uma placa acrílica aquecida a 37°C. A preparação foi mantida úmida e aquecida por superfusão com solução de Krebs-Henseleit (pH 7,2 a 7,4), com a seguinte composição (mM): 113 NaCl; 4,7 KCl; 2,5 CaCl₂.2 H₂O; 25 NaHCO₃; 1,1 MgSO₄; 1,1 KH₂PO₄ e 5 glicose. A solução de perfusão foi continuamente saturada com mistura de gases (95% N₂ e 5% CO₂). Este procedimento mantém as características da microcirculação inalteradas ao longo da análise microscópica intravital. A microcirculação mesentérica foi avaliada após 10 minutos de estabilização. Vênulas pós-capilares com diâmetro de 20-25 µm foram selecionadas para cada animal. O sistema de MIV inclui uma câmera (AxioCam HSc, Carl Zeiss Co, München-Hallbergmoos, Alemanha) incorporada a um microscópio triocular (Axioplan 2, Carl Zeiss Co), a fim de facilitar a observação da imagem ampliada (425x) em um monitor de microcomputador (SyncMaster 753DFX, Samsung, Manaus, Brasil). As imagens foram analisadas utilizando-se o software Axiovision versão 4.1 (Carl Zeiss). As interações leucócito-endotélio na microcirculação mesentérica foram avaliadas em até 3 campos distintos incluindo a determinação do número de leucócitos *rollers*, leucócitos aderidos e leucócitos migrados.

Leucócitos *rollers* – definido como o número de leucócitos que se movem na periferia em contato com o endotélio, em velocidade muito menor que os eritrócitos, em segmento de 100 µm de extensão da vênula durante 3 minutos.

Leucócitos aderidos – definido como o número de leucócitos que permanecem aderidos ao endotélio, por mais de 30 segundos, em extensão de 100 μm da vênula.

Leucócitos migrados - definido como o número de leucócitos migrados para o tecido perivascular em área de 5.000 μm^2 .

4.9 Quantificação de P-selectina e ICAM-1 por imunohistoquímica

O mesentério foi removido, imerso em hexano e congelado em nitrogênio líquido. Cortes seriados de 8 μm foram colocados sobre lâminas de vidro silanizadas (Dako, Glostrup, Denmark) e as amostras fixadas em acetona por 10 min. Para o bloqueio de sítios inespecíficos foi utilizada solução de TRIS-salina com tween20 (TBST) acrescido de soro albumina bovina (3%), por 1 hora à temperatura ambiente. Anticorpo monoclonal anti-P-selectina humana (CD62P; R&D Systems Inc, Minneapolis, Minn, USA) e anticorpo monoclonal anti-ICAM-1 de rato (CD54; Cedarlane Laboratories Limited, Ontario, Canada) foram diluídos 1:50 em tampão TBST acrescido de soro albumina bovina (1%) e as amostras incubadas em câmara úmida à 4°C por uma noite. O bloqueio da peroxidase endógena (Dual Enzyme Block, Dako) foi realizado por 15 minutos à temperatura ambiente. As lâminas foram lavadas em solução de TBST e incubadas com solução de anticorpos secundários (ADVANCE™ HRP Link, Dako) por 30 minutos à temperatura ambiente. Após nova lavagem em TBST, as amostras foram

incubadas por 30 minutos com solução de anticorpos conjugados a HRP (ADVANCE™ HRP Enzyme, Dako) e, em seguida, lavadas e coradas com solução de HRP-3-amino-9-etilcarbazol (AEC; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) por 10 minutos e contra-coradas com hematoxilina de Mayer. Para o controle negativo as amostras foram incubadas com tampão fosfato salina em substituição ao anticorpo primário. As análises foram realizadas através do Software NIS-Elements-BR (Nikon).

4.10 Análise estatística

Os dados foram tabulados no programa Microsoft Excel®, e analisados no programa GraphPad Prisma® (Prism 5.01 for Windows). A apresentação dos resultados ocorreu através de medidas descritivas expressos como média $\pm$ erro padrão da média (epm).

Para a comparação entre os grupos foi utilizada a Análise de Variância (One-Way). Para as comparações múltiplas utilizou-se o teste de Tukey. Foi adotado nível de significância para erro α de 5% ($p < 0,05$).

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1 Mortalidade

Determinou-se a mortalidade dos animais 24 horas pós bacteremia, a qual foi de 25% para o grupo REP, 28% no grupo SH, 30% para o grupo RL, 40% no grupo ST e 0% para o Grupo FO.

5.2 Efeito da infusão de bactérias sobre o leucograma e número de plaquetas

A infusão de bactérias provocou importante leucopenia nas 3 primeiras horas de evolução da bacteremia, principalmente devido à redução no número de linfócitos e monócitos. Decorridas 24 horas, houve acentuada leucocitose com granulocitose. Registrou-se uma redução progressiva e intensa no número de plaquetas ao longo do experimento. O tratamento com RL, SH e REP não modificou o leucograma evolutivo comparado ao grupo ST ($p>0,05$). Por outro lado, no grupo FO não submetido à bacteremia evidenciou-se leucocitose as custas de granulocitose que se manteve no período de 24 horas, e contagem de plaquetas inalterada. Os resultados são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Evolução do leucograma e contagem de plaquetas

Grupos			
FO	Basal	3h	24h
Leucócitos/mm ³	9.720 ± 1.028	21.460 ± 2.280*	18.575 ± 605*
Granulócitos/mm ³	2.800 ± 195	16.340 ± 1.815†	8.700 ± 755 ^δ
Linfócitos/mm ³	6.660 ± 824	4.640 ± 490	9.075 ± 517
Monócitos/mm ³	260 ± 21	480 ± 73	800 ± 82†
Plaquetas x10 ³ /mm ³	858 ± 26	628 ± 32*	817 ± 53
ST	Basal	3h	24h
Leucócitos/mm ³	13.430 ± 366	7.280 ± 405*	25.864 ± 2.434†
Granulócitos/mm ³	6.250 ± 256	4.808 ± 235	19.758 ± 2.291†
Linfócitos/mm ³	6.658 ± 307	2.306 ± 234†	5.762 ± 827
Monócitos/mm ³	522 ± 29	166 ± 17 ^δ	360 ± 44
Plaquetas x10 ³ /mm ³	884 ± 57	336 ± 27†	74 ± 11†
RL	Basal	3h	24h
Leucócitos/mm ³	11.647 ± 928	6.940 ± 336 ^δ	22.860 ± 1.319†
Granulócitos/mm ³	4.834 ± 293	4.840 ± 522	17.507 ± 1.016†
Linfócitos/mm ³	6.300 ± 732	1.947 ± 248†	4.766 ± 488
Monócitos/mm ³	513 ± 73	153 ± 6*	586 ± 101
Plaquetas x10 ³ /mm ³	800 ± 53	271 ± 33†	118 ± 15†
REP	Basal	3h	24h
Leucócitos/mm ³	12.405 ± 665	6.501 ± 695*	26.906 ± 4.790 ^δ
Granulócitos/mm ³	5.203 ± 283	4.381 ± 561	20.986 ± 4.328†
Linfócitos/mm ³	6.733 ± 380	1.893 ± 297†	5.413 ± 680
Monócitos/mm ³	468 ± 68	226 ± 79	506 ± 75
Plaquetas x10 ³ /mm ³	806 ± 50	410 ± 58†	78 ± 19†
SH	Basal	3h	24h
Leucócitos/mm ³	15.780 ± 2.157	9.830 ± 524	26.520 ± 2.362*
Granulócitos/mm ³	7.450 ± 1.327	7.140 ± 571	19.540 ± 2.352†
Linfócitos/mm ³	7.850 ± 938	2.370 ± 128†	6.200 ± 662
Monócitos/mm ³	480 ± 80	320 ± 12	770 ± 104
Plaquetas x10 ³ /mm ³	1.033 ± 47	428 ± 99†	159 ± 45†

FO, falso operado; ST, grupo sem tratamento; RL, Ringer Lactato (4 mL/kg); REP, Ringer etil-piruvato (RL 4 mL/kg + 50 mg/Kg de etil-piruvato); SH, salina hipertônica 7,5% (4mL/kg). As amostras sanguíneas foram coletadas nos momentos basal, 3 horas (prévio ao tratamento com RL, REP e SH) e 24 horas. Os resultados são apresentados como média ± epm de 5 a 6 animais em cada grupo. † $p < 0,001$; * $p < 0,01$; ^δ $p < 0,05$ versus valores basais.

5.3 Efeito da infusão de bactérias sobre as variáveis PAM e temperatura

No período inicial de 3 horas a bacteremia determinou uma discreta redução na PAM e um aumento progressivo na temperatura corporal em todos os grupos em relação ao grupo FO. Nos animais tratados com REP e SH (180 min) a PAM se elevou ao nível dos animais FO, enquanto nos animais dos grupos RL e ST manteve-se o estado de hipotensão relativa. Nenhum dos tratamentos alterou as medidas de temperatura. Registros de PAM e temperatura não diferiram entre os grupos ao final de 24 horas (Figura 2).

Figura 2. PAM e temperatura foram registradas durante 210 minutos e 24 horas após. FO, falso operado; ST, grupo sem tratamento; RL, Ringer Lactato (4 mL/kg); REP, Ringer etil-piruvato (RL 4 mL/kg + 50 mg/Kg de etil-piruvato); SH, salina hipertônica 7,5% (4mL/kg). Os resultados são apresentados como média $\pm$ epm de 5 a 7 animais em cada grupo. * $p < 0,05$ ST e RL versus FO.

5.4 Efeito da bacteremia sobre a gasometria, eletrólitos, hematócrito e lactato

As amostras sanguíneas foram coletadas nos momentos basal, 3 horas (prévio ao tratamento com RL, REP e SH) e 24 horas. A bacteremia provocou uma acidose metabólica caracterizada por hipocarbica relativa associada a uma redução dos níveis de bicarbonato e do excesso de bases em todos os grupos, entretanto, mais significativa nos animais dos grupos ST e RL comparado aos valores basais ($p<0,001$). O grupo FO não apresentou alterações (Tabela 2).

Tabela 2. Efeito da bacteremia sobre a gasometria, eletrólitos, hematócrito e lactato.

Grupos	pH	PaCO ₂ (mmHg)	PaO ₂ (mmHg)	HCO ₃ ⁻ (mmol/L)	BE (mmol/L)	Lactato (mmol/L)	Ht (%)	Potássio (mmol/L)	Sódio (mmol/L)
FO									
Basal	7,48 ± 0,01	29 ± 1	92 ± 4	21,6 ± 1,0	-0,3 ± 1,0	1,9 ± 0,2	35 ± 1	3,6 ± 0,1	150 ± 2
3 h	7,42 ± 0,02	35 ± 2	83 ± 2	22,4 ± 0,4	-0,4 ± 0,6	1,8 ± 0,1	38 ± 1	4,2 ± 0,1	147 ± 2
24 h	7,44 ± 0,02	34 ± 1	91 ± 3	23,1 ± 0,6	0,0 ± 1,0	2,6 ± 0,3	39 ± 1	5,0 ± 0,4	148 ± 1
ST									
Basal	7,44 ± 0,04	33 ± 3	92 ± 5	21,5 ± 0,8	-1,4 ± 1,0	2,3 ± 0,2	41 ± 2	3,9 ± 0,2	148 ± 2
3 h	7,48 ± 0,01	26 ± 1 ^δ	93 ± 7	18,8 ± 0,8	-2,8 ± 0,6 ^δ	2,8 ± 0,2	37 ± 2	3,5 ± 0,2	145 ± 2
24 h	7,44 ± 0,02	23 ± 2 [†]	106 ± 6	15,7 ± 1,2 [†]	-6,3 ± 1,3 [†]	2,9 ± 0,2	35 ± 2	3,5 ± 0,4	146 ± 1
RL									
Basal	7,45 ± 0,01	32 ± 1	87 ± 5	22,7 ± 0,8	0,2 ± 1,1	1,9 ± 0,1	35 ± 1	4,2 ± 0,3	151 ± 2
3 h	7,42 ± 0,01	31 ± 1	81 ± 5	19,5 ± 0,5 ^δ	-3,2 ± 0,6 ^δ	2,7 ± 0,2	31 ± 1	4,0 ± 0,3	151 ± 1
24 h	7,43 ± 0,02	27 ± 2 [*]	81 ± 8	17,6 ± 1,2 [†]	-5,0 ± 1,0 [†]	3,0 ± 0,5 ^δ	36 ± 1	3,7 ± 0,2	149 ± 2
REP									
Basal	7,39 ± 0,02	38 ± 1	82 ± 3	21,8 ± 0,3	-1,9 ± 0,8	2,6 ± 0,3	40 ± 1	4,7 ± 0,3	145 ± 2
3 h	7,48 ± 0,02	27 ± 1 [*]	92 ± 5	19,3 ± 0,4	-2,0 ± 0,4	2,4 ± 0,3	36 ± 2	3,7 ± 0,1	144 ± 2
24 h	7,44 ± 0,02	29 ± 3 [*]	86 ± 3	18,7 ± 1,3	-3,8 ± 1,0	3,0 ± 0,3	37 ± 2	3,4 ± 0,3	144 ± 1
SH									
Basal	7,42 ± 0,02	35 ± 2	75 ± 4	22,0 ± 0,5	-0,8 ± 0,8	1,9 ± 0,3	37 ± 1	4,0 ± 0,2	157 ± 4
3 h	7,46 ± 0,02	28 ± 2 ^δ	90 ± 7	19,7 ± 0,9	-1,9 ± 0,7	2,4 ± 0,2	34 ± 1	3,6 ± 0,2	155 ± 4
24 h	7,41 ± 0,03	33 ± 3	75 ± 4	19,8 ± 0,8	-3,4 ± 0,6	2,8 ± 0,4	34 ± 1	3,6 ± 0,3	155 ± 2

FO, falso operado; ST, grupo sem tratamento; RL, Ringer Lactato (4 mL/kg); REP, Ringer etil-piruvato (RL 4 mL/kg + 50 mg/Kg de etil-piruvato). PaCO₂, pressão arterial de CO₂; PO₂, pressão parcial de O₂; HCO₃⁻, bicarbonato; BE, excesso de bases; Ht, hematócrito. Os resultados são apresentados como média ± epm para 6 a 7 animais em cada grupo. [†]*p*<0,001; ^{*}*p*<0,01; ^δ*p*<0,05 *versus* valores basais intra-grupos.

5.5 Microscopia intravital: critérios na avaliação

Considerando-se tratar de um novo modelo experimental de sepse, procedemos um estudo piloto em 13 animais submetidos à bacteremia conforme o protocolo, para avaliação inicial da microcirculação mesentérica por meio da MIV. A aquisição das imagens e posterior análise foram realizadas independentemente por dois pesquisadores. De 25 campos iniciais gravados, distinguimos 2 padrões de fluxo microcirculatório conforme o diâmetro venular observado à MIV (Figura 3): (1) vênulas com diâmetro regular e fluxo sanguíneo estável; e (2) vênulas com irregularidade no diâmetro venular, por vezes tortuosas, apresentando fluxo sanguíneo lentificado e/ou hiper celular.

De uma forma geral, os campos com vênulas de diâmetro inferior a 20 μm apresentaram irregularidades em seu fluxo, tais como lentificação progressiva ou interrupção, de modo que o objeto do estudo, as interações leucócito-endotélio, prosseguiu direcionado especificamente sobre a primeira porção venular pós-capilar que apresentasse fluxo sanguíneo constante e com diâmetro regular entre 20 e 25 μm . Excluíram-se ainda do estudo, os campos gravados que apresentassem variação do fluxo de leucócitos *rollers* devido a deformidades vasculares, os campos acometidos por hemorragia que pudesse interferir nas contagens de leucócitos, e os campos com diâmetro venular maior que 30 μm .

células/5.000 μm^2 , respectivamente) (Figura 4). Fotomicrografias representativas encontram-se documentadas na Figura 5.

Figura 4. Número de leucócitos *rollers*, aderidos e migrados obtidos através de microscopia intra-vital na microcirculação mesentérica 24 horas após a bacteremia. FO, falso operado; RL, Ringer Lactato (4 mL/kg); REP, Ringer etil-piruvato (RL 4 mL/kg + 50 mg/Kg etil-piruvato). Os resultados são apresentados como média $\pm$ epm de 5 a 7 animais em cada grupo. * $p < 0.001$ versus sham; † $p < 0.001$ versus NT and LR; δ $p < 0,01$ versus NT and LR.

Figura 5. Fotomicrografias representativas da microcirculação mesentérica: (A) rato falso operado, (B) rato sem tratamento, (C) rato tratado com solução de Ringer lactato, e rato tratado com Ringer etil-piruvato (D). Alterações significativas são observadas em (B) e (C) comparadas a (D) e (A). Aumento final de 425X.

5.7 Efeitos dos tratamentos com Ringer lactato e Ringer etil-piruvato sobre a expressão de P-selectina e ICAM-1

O grupo ST apresentou um aumento significativo na expressão de P-selectina (2 vezes) e de ICAM-1 (1,5 vezes) nos microvasos do mesentério comparado ao grupo falso operado ($p < 0,001$). O tratamento com REP reduziu a expressão de ambas moléculas de adesão em 40% e 26% para a P-selectina e ICAM-1 respectivamente, em relação ao grupo ST ($p < 0,001$), não sendo estatisticamente diferente dos valores observados no grupo FO

($p>0,05$). O tratamento com RL reduziu parcialmente a expressão de P-selectina em 27% sem, entretanto, alterar a expressão de ICAM-1 quando comparado ao grupo ST (Figura 6).

Figura 6. Expressão de P-selectina e ICAM-1 na microcirculação mesentérica 24 horas após a bacteremia. FO, grupo falso operado; ST, sem tratamento; RL, Ringer Lactato (4 mL/kg); REP, Ringer etil-piruvato (RL 4 mL/kg + 50 mg/Kg etil-piruvato). Os resultados são apresentados como média $\pm$ epm de 3 amostras/rato, 3 ratos/grupo. * $p < 0,001$ versus FO, † $p < 0,001$ versus ST, δ $p < 0,01$ versus LR, § $p < 0,01$ versus FO e ST.

5.8 Efeitos dos tratamentos com Ringer lactato e Solução salina Hipertônica 7,5% sobre as interações leucócito-endotélio

Comparado ao grupo FO, os grupos ST e RL apresentaram aumento significativo no número de leucócitos *rollers* (~2,5 vezes), leucócitos aderidos (~3,4 vezes) e de leucócitos migrados (~3,0 vezes). O tratamento com SH reduziu o número de leucócitos *rollers* (66 ± 5 células/3min), leucócitos aderidos (6 ± 1 células/100 μ m da vênula) e leucócitos migrados (6 ± 1 células/5.000 μ m²) próximo aos valores obtidos no grupo FO (44 ± 5 células/3min; 4 ± 1 células/100 μ m da vênula; 4 ± 1 células/5.000 μ m², respectivamente) (Figura 7). Fotomicrografias representativas encontram-se documentadas na Figura 8.

Figura 7. Número de leucócitos rollers, aderidos e migrados obtidos através de microscopia intravital na microcirculação mesentérica 24 horas após a bacteremia. FO, falso operado; ST, sem tratamento; RL, Ringer Lactato (4 mL/kg); SH, salina hipertônica a 7,5% (4 mL/kg). Os resultados são apresentados como média $\pm$ epm de 5 a 7 animais em cada grupo. * $p < 0,001$ versus FO, § $p < 0,01$ versus FO, ‡ $p < 0,01$ versus RL, † $p < 0,01$ versus ST e RL.

Figura 8. Fotomicrografias representativas da microcirculação mesentérica: (A) rato falso operado, (B) rato sem tratamento, (C) rato tratado com solução de Ringer lactato, e rato tratado com salina hipertônica (D). Alterações significativas são observadas em (B) e (C) comparadas a (D) e (A). Aumento final de 425X.

5.9 Efeitos dos tratamentos com Ringer lactato e solução salina hipertônica sobre a expressão de P-selectina e ICAM-1

O grupo ST apresentou um aumento na expressão de P-selectina (1,8 vezes) e de ICAM-1 (1,6 vezes) nos microvasos do mesentério comparado ao grupo FO ($p<0,001$). O tratamento com SH reduziu a expressão de ambas moléculas de adesão em 33% e 34% para a P-selectina e ICAM-1 respectivamente, em relação ao grupo ST. Estes valores não são diferentes dos valores observados no grupo FO ($p>0,05$). O tratamento com RL reduziu a expressão de P-selectina em 27% e reduziu, parcialmente, a expressão de ICAM-1 em 18% em relação ao grupo ST (Figura 9).

Figura 9. Expressão de P-selectina e ICAM-1 nos microvasos do mesentério 24 horas após a bacteremia. FO, falso operado; ST, sem tratamento; RL, Ringer Lactato (4 mL/kg); SH, salina hipertônica 7,5% (4 mL/kg). Os resultados são apresentados como média $\pm$ epm de 3 amostras/rato, 3 ratos/grupo. * $p < 0,001$ versus FO, † $p < 0,01$ versus ST e FO, ‡ $p < 0,01$ versus ST e RL, § $p < 0,05$ versus ST, δ $p < 0,001$ versus ST.

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

No presente estudo demonstramos que a administração de dose única de etil-piruvato e de solução salina hipertônica (7,5%) eficientemente reduziu a resposta inflamatória na microcirculação mesentérica no presente modelo experimental de sepse induzida por *E. coli* viva associada a menor expressão das moléculas de adesão P-selectina e ICAM-1.

O desencadeamento da sepse foi induzido por inoculação de bactérias vivas de *E. coli* obtidas de nódulos linfáticos mesentéricos em modelo de obstrução intestinal (Zanoni et al., 2009) na intenção de reproduzir o cenário de translocação bacteriana que pode ocorrer em algumas situações clínicas. No presente estudo, a quantidade de bactéria utilizada foi estabelecida por estudo prévio onde se determinou uma taxa de mortalidade de aproximadamente 50% em 7 dias. Em modelos experimentais com animais de pequeno porte, a injeção de baixas doses de *E. coli* viva está associada a mínimas alterações fisiológicas, enquanto doses maiores resultam em colapso cardiovascular imediato e morte (Poli de Figueiredo et al., 2008). Como previsto, a mortalidade em nosso estudo foi de 40% nos animais do grupo ST no período de 24 horas da bacteremia, valor este concordante ao apresentado por Koh et al. (2010), em modelo experimental de sepse grave (10^8 UFC/mL), cuja mortalidade variou de 40 a 60% em 27 horas. Inicialmente, as manifestações clínicas decorrentes da bacteremia foram caracterizadas por piloereção, prostração, redução discreta da PAM e aumento da frequência cardíaca. A evolução da

inflamação sistêmica foi caracterizada por critérios positivos para o diagnóstico de sepse e SIRS, tais como elevação de temperatura, acidose metabólica compensada, leucopenia seguida de intensa leucocitose, e importante trombocitopenia ao final de 24 horas do início dos experimentos. Estas variáveis sistêmicas se associaram substancialmente às alterações nas interações leucócito-endotélio observadas pela MIV e à expressão de moléculas de adesão P-selectina e ICAM-1 na microcirculação mesentérica, como evidenciado em nosso estudo pelo grupo ST. De acordo ainda com alguns pesquisadores (Buras et al., 2005; Poli de Figueiredo et al., 2008), as alterações clínicas observadas em sepse por injeção de bactérias vivas podem ser decorrentes mais da toxemia devido à lise bacteriana do que a sepse verdadeiramente. Entretanto, os resultados obtidos com o grupo ST e comparados aos do grupo FO validam o presente modelo experimental quanto ao desenvolvimento de SIRS/sepse, podendo ser de grande aplicabilidade para estudos que envolvam a função plaquetária.

Embora nenhum dos tratamentos tenha alterado a evolução do leucograma, efeitos salutareos foram observados nos grupos REP e SH quanto ao restabelecimento da PAM e sobre as medidas de bicarbonato e excesso de bases à gasometria. O grupo RL não demonstrou diferença em relação ao grupo ST. Os efeitos benéficos do tratamento com o etil-piruvato e solução salina hipertônica são demonstrados por Shih et al, (2012) e Hauser et al. (2005) em diferentes modelos experimentais de sepse. Este é um importante achado considerando que se variáveis macro-hemodinâmicas não assegurem uma pressão de perfusão adequada na microcirculação, a

hipotensão por si pode contribuir sobremaneira na piora das alterações microcirculatórias (Trzeciak et al., 2007).

Na vigência de um agente infeccioso, a ativação de células endoteliais e leucócitos é um evento determinante na defesa contra a invasão bacteriana (Buras, et al., 2005). Os leucócitos devem ser ativados para aderir à parede microvascular e migrar para o tecido perivascular. Este processo é mediado por uma variedade de glicoproteínas expressas na superfície dos leucócitos e de células endoteliais que resultam em maior aderência dos leucócitos às vênulas pós-capilares. Inicialmente, os leucócitos rolam ao longo de vênulas pós-capilares, como consequência da expressão de moléculas de adesão da família das selectinas (Rosen, 2004) e tornam-se firmemente aderidos à parede vascular pela interação da ICAM-1 em células endoteliais com moléculas da família das $\beta 2$ integrinas (complexo CD11/CD18) em leucócitos (Granger e Kubes, 1994; Marshall, 2005).

O principal resultado apresentado é a demonstração da eficácia dos tratamentos com dose única de etil-piruvato ou solução salina hipertônica 7,5% na redução do processo inflamatório, quando administrados na fase inicial da sepse. O efeito benéfico dos tratamentos decorreu da redução nas interações leucócito-endotélio na microcirculação mesentérica, avaliadas *in vivo* e *in situ*, e da menor expressão das moléculas de adesão P-selectina e ICAM-1 nos microvasos do mesentério. Esta afirmativa é reforçada pelo fato que independentes grupos de animais foram utilizados para a MIV e coleta de órgãos. Adicionalmente, os efeitos determinados tanto pelo etil-piruvato

como pela salina hipertônica sobre as interações leucócito-endotélio não se relacionaram a alterações no leucograma, uma vez que leucocitose e granulocitose equivalentes foram observadas em todos os grupos com bacteremia. Esses dados analisados em conjunto pressupõem que o etil-piruvato e salina hipertônica possuam efeitos modulatórios sobre as interações leucócito-endotélio.

Estudos em modelos experimentais de endotoxemia ou sepse demonstram que o etil-piruvato reduz a expressão gênica de várias citocinas (TNF- α e IL-6), da COX-2, e da iNOS (Ulloa et al., 2002; Venkataraman et al., 2002; Yang et al., 2004). Em parte, este efeito de redução está relacionado à inibição da fosforilação da unidade p65 do NF- κ B, isto é, a via NF- κ B de sinalização (Han et al., 2005; Ulloa et al., 2002;). O TNF- α e a interleucina (IL)-1 β estimulam a expressão de ICAM-1 e E-selectina em células endoteliais e ativam o NF- κ B em diversos tecidos (Christman et al., 1998; Rahman e Macnee, 1998), sabidamente um fator diretamente envolvido na transcrição de genes pró-inflamatórios que promovem a expressão de várias citocinas, de moléculas de adesão e da iNOS. In vitro, Johansson et al., (2008) e Johansson e Palmblad, (2009) demonstraram que o etil-piruvato reduz a ativação endotelial e a expressão de moléculas de adesão de ICAM-1, VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1) e E-selectina em cultura de células endoteliais da veia umbilical humana ativadas e células epiteliais pulmonares.

Diferentes modelos experimentais demonstraram que a solução salina hipertônica é responsável pela redução da adesão dos leucócitos ao

endotélio e redução do infiltrado neutrofílico, da expressão da glicoproteína de adesão ICAM-1 e de lesão pulmonar (Yada-Langui et al., 2000; 2004).

O tratamento com RL apresentou uma redução parcial sobre a expressão de ambas moléculas de adesão P-selectina e de ICAM-1 embora seus efeitos sobre as interações leucócito-endotélio fossem semelhantes ou até piores comparados ao grupo ST. Diferentes modelos experimentais evidenciaram que a administração de Ringer lactato está relacionada à importante recrutamento e acúmulo de leucócitos na microcirculação mesentérica (Yada-Langui et al, 2004; Nakagawa et al., 2006), associados ao aumento da expressão de moléculas de adesão ICAM-1 e P-selectina. Yada-Langui et al. (2004) em modelo de choque hemorrágico, demonstraram que o grupo tratado com Ringer lactato aumenta a expressão de molécula de adesão ICAM-1 do tecido pulmonar em 10 vezes ao determinado pelo grupo falso operado. Resultados semelhantes foram observados por Zanoni et al. (2013) em modelo de obstrução intestinal e isquemia.

CONCLUSÕES

7. CONCLUSÕES

Os dados apresentados nos permitem concluir que:

- (1) a injeção endovenosa de bactéria *E. coli* viva, oriunda de rato autólogo, foi validada como modelo experimental de sepse;
- (2) o tratamento com etil-piruvato, na fase inicial da sepse, foi efetivo na redução das interações leucócito-endotélio e expressão de P-selectina e ICAM-1 na microcirculação mesentérica;
- (3) o tratamento com solução salina hipertônica a 7,5%, na fase inicial da sepse, foi efetiva na redução das interações leucócito-endotélio e expressão de P-selectina e ICAM-1 na microcirculação mesentérica.

ANEXOS

8. ANEXO

SNC 3477/10/066

MEDICINA
USP
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

A CEUA do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 18.08.10, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **205/10** intitulado: **"Estudo dos efeitos do etil-piruvato, salina hipertônica e do Ringer lactato sobre a resposta da microcirculação mesentérica em modelo de sepse induzida por Escherichia coli em ratos"** e seus anexos, apresentado pela Comissão Científica do Incor.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEP-FMUSP, o relatório final sobre a pesquisa, (Lei Procedimentos para o Uso Científico de Animais - Lei No 11.794 -8 de outubro de 2008).

Pesquisador (a) Responsável: Paulina Sannomiya
Pesquisador (a) Executante : Ismael Francisco Mota Siqueira Garda

CEP-FMUSP, 18 de agosto de 2010.

Dr. Eduardo Pompeu
Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais

Prof. Dr. Eduardo Massad
Coordenador
Comitê de Ética em Pesquisa

COMISSÃO CIENTÍFICA
RECEBIDO
25/08/10
Chaine

Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo Rua Ovídio Pires de Campos, 225, 5º andar - CEP 05403 010 - São Paulo - SP Fone: 011 3069 6442 Fax: 011 3069 6492 e-mail: cep_fmusp@hcnet.usp.br

REFERÊNCIAS

9. REFERÊNCIAS

Akira S, Takeda K, Kaisho T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nature Immunology*. 2001;2:675-80.

Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med*. 2001;29:1303-10.

Anjos-Valotta EA, Martins JO, Oliveira MA, Casolari DA, Britto LR, Tostes RC et al. Inhibition of tumor necrosis factor-alpha-induced intercellular adhesion molecule-1 expression in diabetic rats: role of insulin. *Inflamm Res*. 2006;55:16-22.

Anname D, Bellissant E, Cavaillon JM. Septic shock. *Lancet*. 2005;365:63-78.

Bochud PY, Calandra T. Pathogenesis of sepsis: new concepts and implications for future treatment. *Brit Med J*. 2003;326:262-6.

Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA et al. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest*. 1992;101:1644-55.

Bruscagin V, Poli de Figueiredo LF, Rasslan S, Varicoda EY, Rocha e Silva M. Fluid resuscitation improves hemodynamics without increased bleeding in a model of uncontrolled hemorrhage induced by an iliac artery tear in dogs. *J. Trauma*. 2002;52:1147-52.

Buras JA, Holzmann B, Sitkovsky M. Animal models of sepsis: setting the stage. *Nat Rev Drug Discov*. 2005;4:854-65.

Chaudry IH. Sepsis: lessons learned in the last century and future directions. *Arch Surg*. 1999;134:922-9.

Christman JW, Lancaster LH, Blackwell TS. Nuclear factor kappaB: a pivotal role in the systemic inflammatory response syndrome and new target therapy. *Intensive Care Med*. 1998;24:1131-8.

Coimbra R, Junger WG, Liu FC, Loomis WH, Hoyt DB. Hypertonic/hyperoncotic fluids reverse prostaglandin E2 (PGE2)-induced T cell suppression. *Shock*. 1995;4:45-9.

Coimbra R, Junger WG, Hoyt DB, Liu FC, Loomis WH, Evers MF. Hypertonic saline resuscitation restores hemorrhage-induced immunosuppression by decreasing prostaglandin E2 and interleukin-4 production. *J. Surg. Res*. 1996;64:203-9.

Coimbra R, Hoyt DB, Junger WG, Angle N, Wolf P, Loomis W, et al. Hypertonic saline resuscitation decreases susceptibility to sepsis following hemorrhagic shock. *J. Trauma*. 1997;42:602-7.

Coimbra R, Melbostad H, Loomis W, Tobar M, Hoyt DB. Phosphodiesterase inhibition decreases nuclear factor- κ B activation and

shifts the cytokine response toward anti-inflammatory activity in acute endotoxemia. *J Trauma*. 2005;59:575-82.

Collins T, Read MA, Neish AS, Whitley MZ, Thanos D, Maniatis T. Transcriptional regulation of endothelial cell adhesion molecules: NF- κ B and cytokine-inducible enhancers. *FASEB J*. 1995;9:899-909.

De Backer D, Creteur J, Preiser JC, Dubois MJ, Vincent JL. Microvascular blood flow is altered in patients with sepsis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002;166:98-104.

Farsky SHP, Sannomiya P, Garcia-Leme J. Secreted glucocorticoids regulate leukocyte-endothelial interactions in inflammation. A direct vital microscopic study. *J. Leukoc. Biol*. 1995;57:379-86.

Fink MP. Ethyl piruvate: a novel treatment for sepsis and shock. *Minerva Anesthesiol*. 2004;70:365-71.

Gao J, Zhao WX, Xue FS, Zhou LJ, Yu YH, Zhou HB. Effects of different resuscitation fluids on acute lung injury in a rat model of uncontrolled hemorrhagic shock and infection. *J Trauma*. 2009;67:1213-9.

Granger DN, Kubes P. The microcirculation and inflammation: modulation of leukocyte-endothelial cell adhesion. *J Leukoc Biol*. 1994;55:662-75.

Han Y, Englert JA, Yang R, Delude RL, Fink MP. Ethyl pyruvate inhibits nuclear factor-kappaB-dependent signaling by directly targeting p65. *J Pharmacol Exp Ther*. 2005;312:1097-105.

Hauser B, Kick J, Asfar P, Ehrmann U, Albicini M, Vogt J et al. Ethyl pyruvate improves systemic and hepatosplanchnic hemodynamics and prevents lipid peroxidation in a porcine model of resuscitated hyperdynamic endotoxemia. *Crit Care Med.* 2005;33:2034-42.

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

Ince C. The microcirculation is the motor of sepsis. *Crit Care.* 2005, 9(suppl 4):S13-S19.

Johansson AS, Johansson-Haque K, Okret S, Palmblad J. Ethyl pyruvate modulates acute inflammatory reactions in human endothelial cells in relation to the NF-kappaB pathway. *Br J Pharmacol.* 2008;154:1318-26.

Johansson AS, Palmblad J. Ethyl pyruvate modulates adhesive and secretory reactions in human lung epithelial cells. *Life Sci.* 2009;84:805-9.

Kim HJ, Lee KH. The effectiveness of hypertonic saline and pentoxifylline (HTS-PTX) resuscitation in haemorrhagic shock and sepsis tissue injury: comparison with LR, HES, and LR-PTX treatments. *Injury.* 2012;43:1271-6.

Koh IH, Menchaca-Diaz JL, Koh TH, Souza RL, Shu CM, Rogerio VE et al. Microcirculatory evaluation in sepsis: a difficult task. *Shock.* 2010;34 Suppl 1:27-33.

Marshall JC, Maier RV, Jimenez M, Dellinger EP. Source control in the management of severe sepsis and septic shock: an evidence-based review. *Crit Care Med.* 2004;32:S513-S526.

Marshall JC. Neutrophils in the pathogenesis of sepsis. *Crit Care Med*. 2005;33:S502-5.

Mathison JC, Tobias OS, Wolfson E, Ulevitch RJ. Plasma lipopolysaccharide (LPS)-binding protein. A key component in macrophages recognition of Gram-negative bacteria. *J Immunol*. 1992;149:200-6.

Miyaji T, Hu X, Yuen PS, Muramatsu Y, Iyer S, Hewitt SM, et al. Ethyl pyruvate decreases sepsis-induced acute renal failure and multiple organ damage in aged mice. *Kidney Int*. 2003;64:1620-31.

Nakagawa NK, Nogueira RA, Correia CJ, Shiwa SR, Costa Cruz JW, Poli de Figueiredo LF et al. Leukocyte-endothelium interactions after hemorrhagic shock/reperfusion and cecal ligation/puncture: an intravital microscopic study in rat mesentery. *Shock*. 2006;26:180-6.

Pober JS, Min W, Bradley JR. Mechanisms of endothelial dysfunction, injury, and death. *Annu Rev Pathol*. 2009;4:71-95.

Poli-de-Figueiredo LF, Cruz RJ Jr, Sannomiya P, Rocha-E-Silva M. Mechanisms of action of hypertonic saline resuscitation in severe sepsis and septic shock. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*. 2006;6:201-6.

Poli-de-Figueiredo LF, Garrido AG, Nakagawa N, Sannomiya P. Experimental models of sepsis and their clinical relevance. *Shock*. 2008;30:53-9.

Rahman I, MacNee W. Role of transcription factors in inflammatory lung diseases. *Thorax*. 1998;53:601-12.

Rivers E, Nguyen B, Havstad S, Ressler J, Muzzin A, Knoblich B et al. Early goal directed therapy in the treatment of severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med*. 2001;345:1368-77.

Rocha e Silva M, Poli de Figueiredo LF. Small volume hypertonic resuscitation of circulatory shock. *Clinics*. 2005;60:159-172.

Rosen SD. Ligands for L-selectin: homing, inflammation, and beyond. *Annu Rev Immunol*. 2004;22:129-56.

Sakr Y, Dubois MJ, De Backer D, Creteur J, Vincent JL. Persistent microcirculatory alterations are associated with organ failure and death in patients with septic shock. *Crit Care Med*. 2004;32:1825-31.

Sannomiya P, Oliveira MA, Fortes ZB. Aminoguanidine and the prevention of leukocyte dysfunction in diabetes mellitus: a direct vital microscopic study. *Br J Pharmacol*. 1997;122:894-8.

Sappington PL, Fink ME, Yang R, Delude RL, Fink MP. Ethyl pyruvate provides durable protection against inflammation-induced intestinal epithelial barrier dysfunction. *Shock*. 2003;20:521-8.

Schouten M, Wiersinga WJ, Levi M, van der Poll T. Inflammation, endothelium, and coagulation in sepsis. *J Leukoc Biol*. 2008;83(3):536-45.

Shih CC, Chen SJ, Chen A, Wu JY, Liaw WJ, Wu CC. Therapeutic effects of hypertonic saline on peritonitis-induced septic shock with multiple organ dysfunction syndrome in rats. *Crit Care Med*. 2008;36:1864-72.

Shih CC, Tsai MF, Chen SJ, Tsao CM, Ka SM, Huang HC, et al. Effects of small-volume hypertonic saline on acid-base and electrolytes balance in rats with peritonitis-induced sepsis. *Shock*. 2012;38:649-55.

Silva E, Pedro Mde A, Sogayar AC, Mohovic T, Silva CL, Janiszewski M et al. Brazilian Sepsis Epidemiological Study (BASES study). *Crit Care*. 2004; 8:R251-60.

Sims CA, Wattanasirichaigoon S, Menconi MJ, Ajami AM, Fink MP. Ringer's ethyl pyruvate solution ameliorates ischemia/reperfusion-induced intestinal mucosal injury in rats. *Crit Care Med*. 2001;29:1513-8.

Spanos A, Jhanji S, Vivian-Smith A, Harris T, Pearse RM. Early microvascular changes in sepsis and severe sepsis. *Shock*. 2010;33:387-91.

Tawadrous ZS, Delude RL, Fink MP. Resuscitation from hemorrhagic shock with Ringer's ethyl pyruvate solution improves survival and ameliorates intestinal mucosal hyperpermeability in rats. *Shock*. 2002;17:473-7.

Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol*. 2003;1:335-76.

Tracey KJ, Fong Y, Hesse DG, Manogue KR, Lee AT, Kuo GC et al. Anti-cachectin/TNF monoclonal antibodies prevent septic shock during lethal bacteremia. *Nature*. 1987;330:662-4.

Trzeciak S, Dellinger RP, Parrillo JE, Guglielmi M, Bajaj J, Abate NL, et al. Early microcirculatory perfusion derangements in patients with severe sepsis and septic shock: relationship to hemodynamics, oxygen transport, and survival. *Ann Emerg Med*. 2007;49:88-98.

Trzeciak S, McCoy JV, Phillip Dellinger R, Arnold RC, Rizzuto M, Abate NL, et al. Microcirculatory Alterations in Resuscitation and Shock (MARS) investigators. Early increases in microcirculatory perfusion during protocol-directed resuscitation are associated with reduced multi-organ failure at 24 h in patients with sepsis. *Intensive Care Med.* 2008;34:2210-7.

Uchiyama T, Delude RL, Fink MP. Dose-dependent effects of ethyl pyruvate in mice subjected to mesenteric ischemia and reperfusion. *Intensive Care Med.* 2003;29:2050-8.

Ulloa L, Ochani M, Yang H, Tanovic M, Halperin D, Yang R et al. Ethyl pyruvate prevents lethality in mice with established lethal sepsis and systemic inflammation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002;99:12351-6.

Varicoda EY, Poli de Figueiredo LF, Cruz RJ Jr, Silva LE, Rocha e Silva M. Blood loss after fluid resuscitation with isotonic or hypertonic saline for the treatment of uncontrolled hemorrhage induced by spleen rupture. *J. Trauma.* 2003;55:112-7.

Velasco IT, Pontieri V, Rocha e Silva M Jr, Lopes OU. Hyperosmotic NaCl and severe hemorrhagic shock. *Am J Physiol.* 1980;239:H664-73.

Venkataraman R, Kellum JA, Song M, Fink MP. Resuscitation with Ringer's ethyl pyruvate solution prolongs survival and modulates plasma cytokine and nitrite/nitrate concentrations in a rat model of lipopolysaccharide-induced shock. *Shock.* 2002;18:507-12.

Vincent JL. Hemodynamic support in septic shock. *Intens Care Med.* 2001;27:S80-S92.

Vincent JL, Gerlach H. Fluid resuscitation in severe sepsis and septic shock: an evidence-based review. *Crit Care Med.* 2004;32:S451-S454.

Yada-Langui MM, Coimbra R, Lancelotti C, Mimica I, Garcia C, Correia N, et al. Hypertonic saline and pentoxifylline prevent lung injury and bacterial translocation after hemorrhagic shock. *Shock.* 2000;14(6):594-8.

Yada-Langui MM, Anjos-Valotta EA, Sannomiya P, Rocha e Silva M, Coimbra R. Resuscitation affects microcirculatory polymorphonuclear leukocyte behavior after hemorrhagic shock: role of hypertonic saline and pentoxifylline. *Exp. Biol. Med.* 2004;229:684-93.

Yang R, Uchiyama T, Alber SM, Han X, Watkins SK, Delude RL et al. Ethyl pyruvate ameliorates distant organ injury in a murine model of acute necrotizing pancreatitis. *Crit Care Med.* 2004;32:1453-9.

Yu G, Chi X, Hei Z, Shen N, Chen J, Zhang W, et al. Small volume resuscitation with 7.5% hypertonic saline, hydroxyethyl starch 130/0.4 solution and hypertonic sodium chloride hydroxyethyl starch 40 injection reduced lung injury in endotoxin shock rats: comparison with saline. *Pulm Pharmacol Ther.* 2012;25:27-32.

Zanoni FL, Benabou S, Greco KV, Moreno AC, Cruz JW, Figueira FP et al. Mesenteric microcirculatory dysfunctions and translocation of indigenous bacteria in a rat model of strangulated small bowel obstruction. *Clinics.* 2009;64:911-9.

Zanoni LF, Costa Cruz JW, Martins JO, Benabou S, Vicente Greco K, Ramos Moreno AC, et al. Hypertonic saline solution reduces mesenteric

microcirculatory dysfunctions and bacterial translocation in a rat model of strangulated small bowel obstruction. *Shock*. 2013;40:35-44.