FERNANDO LUIZ ZANONI

**Estudo dos efeitos da solução salina hipertônica e do
Ringer lactato sobre a resposta da microcirculação
mesentérica e a translocação bacteriana em modelo
de obstrução intestinal e isquemia em ratos**

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

Programa de: Anestesiologia

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Paulina Sannomiya

**São Paulo
2010**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Zanoni, Fernando Luiz

Estudo dos efeitos da solução salina hipertônica e do Ringer lactato sobre a resposta da microcirculação mesentérica e a translocação bacteriana em modelo de obstrução intestinal e isquemia em ratos / Fernando Luiz Zanoni. -- São Paulo, 2010.

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

Orientadora: Paulina Sannomiya.

Descritores: 1.Obstrução intestinal 2.Sepse 3.Interações leucócito-endotélio
4.Translocação bacteriana 5.Solução salina hipertônica

USP/FM/DBD-336/10

Dedico este trabalho aos meus pais, José Carlos Zanoni (in memoriam) e Linda de Jesus dos Reis Zanoni.

Devo a vocês todas as conquistas de minha vida. Sou eternamente grato pelos exemplos que tive de amor, compreensão e honestidade, valores fundamentais na formação de meu caráter.

AGRADECIMENTOS

À Prof.^a Dr.^a Paulina Sannomiya, orientadora deste trabalho e pesquisadora exemplar. Obrigado pelas oportunidades, por todo o incentivo e por me proporcionar crescimento científico, intelectual e pessoal.

Aos Professores Maurício Rocha e Silva e Luiz Francisco Poli de Figueiredo, pelo apoio e por permitirem a realização deste trabalho no Laboratório de Investigação Médica (LIM-11) da Faculdade de Medicina da USP.

Aos doutores Ana Carolina Ramos Moreno, Franco Ferraro Calderaro, José Walber Miranda Costa Cruz, Karin Vicente Greco e à Professora Marina Baquerizo Martinez pelo incansável apoio e colaboração, indispensáveis para a realização deste trabalho.

Ao Dr. Joilson de Oliveira Martins, pela grande amizade, apoio e incentivo em toda minha vida acadêmica.

Aos amigos e colaboradores do LIM-11, Clebson de Lima Ferreira, Cristiano de Jesus Correia, Ismael FMS Guarda, Leila Peralta Areco, Rafael Simas, Simon Benabou e Sueli Gomes, sempre dispostos a ajudar.

Às pessoas queridas da minha vida, que ao longo destes anos me deram todo o apoio, carinho e compreensão necessários, Sra. Zulmira Zanoni, Camila Utrera, Dalvino de Oliveira Santos, Jesmar Zanoni, Márcia Santos e Sônia Maria Zanoni.

À FAPESP, pelo suporte financeiro.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE ABREVIACÕES

RESUMO

SUMMARY

1. INTRODUÇÃO	01
1.1. Considerações preliminares	01
1.2. Obstrução intestinal	01
1.3. Lesão de isquemia e reperfusão	03
1.4. Translocação bacteriana	05
1.5. Tratamento clínico-cirúrgico da obstrução intestinal	06
1.6. Solução salina hipertônica	07
2. OBJETIVOS	10
3. MATERIAL E MÉTODOS	11
3.1. Animais	11
3.2. Protocolo experimental	12
3.3. Anestesia e preparo dos animais	13
3.4. Grupos experimentais	13
3.5. Ressecção intestinal	14
3.6. Medidas hemodinâmicas e gasometria	15
3.7. Leucograma e glicemia	15
3.8. Ensaio microbiológicos	16
3.9. Microscopia Intravital (<i>in situ</i>) de mesentério	17
3.10. Quantificação das moléculas de adesão por imunofluorescência	18
3.11. Quantificação de citocinas e quimiocinas por enzima-imunoensaio	19
3.12. Histologia intestinal	20
3.13. Bioquímica sérica	21
3.14. Determinação da concentração sérica de insulina	21
3.15. Determinação da concentração sérica de corticosterona	22

3.16. Análise estatística	22
4. RESULTADOS...	23
4.1. Características gerais dos animais.....	23
4.2. Análise dos gases arteriais, eletrólitos, lactato e glicemia ..	24
4.3. Translocação bacteriana intestinal.....	24
4.4. Interações leucócito-endotélio na microcirculação mesentérica	26
4.5. Expressão de moléculas de adesão em vasos da microcirculação mesentérica	27
4.6. Quantificação de citocinas e das quimiocinas CINC-1 e CINC-2 no soro	29
4.7. Histologia intestinal.....	30
4.8. Bioquímica sérica.....	30
4.9. Concentrações séricas de insulina e corticosterona	31
5. DISCUSSÃO	52
6. CONCLUSÕES	67
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68
APÊNDICE	

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Análise dos gases arteriais, eletrólitos, pH, lactato, glicose e hematócrito após o tratamento com Ringer lactato ou salina hipertônica.....	32
Tabela 2 – Análise dos gases arteriais, eletrólitos, pH, lactato, glicose e hematócrito após o tratamento com Ringer lactato ou salina hipertônica e enterectomia.....	33
Tabela 3 – Efeito dos tratamentos com Ringer lactato ou salina hipertônica sobre a translocação de <i>E. coli</i>	34
Tabela 4 – Análise das interações leucócito-endotélio na microcirculação mesentérica de ratos.....	35
Tabela 5 – Atividade de enzimas hepáticas e níveis séricos de uréia, creatinina e bilirrubinas após o tratamento com Ringer lactato ou salina hipertônica.....	36
Tabela 6 – Atividade de enzimas hepáticas e níveis séricos de uréia, creatinina e bilirrubinas após o tratamento com Ringer lactato ou salina hipertônica e enterectomia.....	37

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Análise de sobrevivência.....	38
Figura 2 – Variação ponderal.....	39
Figura 3 – Pressão arterial média.....	40
Figura 4 – Expressão de P-selectina em vasos da microcirculação mesentérica.....	41
Figura 5 – Fotomicrografias da expressão de P-selectina.....	42
Figura 6 – Expressão de ICAM-1 em vasos da microcirculação mesentérica.....	44
Figura 7 – Fotomicrografias da expressão de ICAM-1.....	45
Figura 8 – Concentração sérica de CINC-1.....	47
Figura 9 – Concentração sérica de CINC-2.....	48
Figura 10 – Escore total de lesão histológica intestinal.....	49
Figura 11 – Concentração sérica de insulina.....	50
Figura 12 – Concentração sérica de corticosterona.....	51

LISTA DE ABREVIATÖES

ANOVA	Análise de variância
ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
ATP	Adenosina trifosfato
TB	Translocação bacteriana
CINC	<i>Cytokine-induced neutrophil chemoattractant</i>
CLM	Complexo linfonodal mesentérico
CLP	Ligadura e punção cecal
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
Epm	Erro padrão da média
FA	Fosfatase alcalina
FO	Falso operado
GIP	<i>Glucose-dependent insulintropic polypeptide</i>
GLP	<i>Glucagon-like peptide</i>
I/R	Isquemia e reperfusão
ICAM	<i>Intercellular adhesion molecule</i>
IL	Interleucina
i.p.	Intraperitoneal
IRA	Insuficiência renal aguda
i.v.	Intravenoso
LDH	Lactato desidrogenase
LM	Linfonodo mesentérico

LPS	Lipopolissacarídeo
MC	Mac Conkey
MIV	Microscopia intravital
N	Normal
N/L	Neutrófilo / Linfócito
NO	Óxido nítrico
OI	Obstrução intestinal e isquemia
OIM	Obstrução intestinal mecânica
P_aCO₂	Pressão parcial do CO ₂ no sangue arterial
PAM	Pressão arterial média
P_aO₂	Pressão parcial do O ₂ no sangue arterial
PBS	Tampão fosfato salina
PGE₂	Prostaglandina E ₂
PMN	Polimorfonuclear
RL	Ringer com lactato
SH	Solução hipertônica – NaCl 7,5%
SIRS	Síndrome da resposta inflamatória sistêmica
TMB	Tetramethylbenzidina
TNF	Fator de necrose tumoral
UFC	Unidades formadoras de colônia

RESUMO

Zanoni FL. *Estudo dos efeitos da solução salina hipertônica e do Ringer lactato sobre a resposta da microcirculação mesentérica e a translocação bacteriana em modelo de obstrução intestinal e isquemia em ratos* [tese]. São Paulo. Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2010. 82p.

INTRODUÇÃO: Estudos demonstram que a solução salina hipertônica melhora a hemodinâmica, a microcirculação e modula o sistema imune, atenuando a resposta inflamatória associada ao choque e trauma. Este estudo tem por objetivo avaliar e comparar os efeitos da solução salina hipertônica (NaCl, 7,5%) e do Ringer lactato seguido da ressecção de segmento do intestino necrosado no tratamento da obstrução intestinal e isquemia, através da análise da translocação bacteriana, da disfunção microcirculatória mesentérica, dos distúrbios hemodinâmicos e metabólicos e da disfunção orgânica. **MÉTODOS:** Ratos Wistar machos (250 – 300 g) anestesiados (pentobarbital sódico, 50 mg/kg, i.p.) foram submetidos à obstrução intestinal e isquemia (OI, ligadura ao nível do íleo terminal seguida de ligadura de ramos da artéria mesentérica correspondentes à irrigação de 7 – 10 cm do íleo). Duas horas após os animais foram randomizados em: OI sem tratamento (OI); OI tratado com Ringer lactato (RL, 4 mL/kg, i.v.); e OI tratado com solução salina hipertônica (SH 7,5%, 4 mL/kg, i.v.). Vinte e quatro horas após os procedimentos cirúrgicos iniciais, os ratos obstruídos (OI, RL e SH) foram submetidos à enterectomia. Ratos controles falso-operados (FO) foram submetidos à lapatotomia. Os seguintes parâmetros foram analisados: 1) cultura bacteriana (*E. coli*) em amostras de linfonodos mesentéricos, fígado, baço e sangue; 2) análise das interações leucócito-endotélio na microcirculação mesentérica por técnica de microscopia intravital; 3) expressão de moléculas de adesão endoteliais (P-selectina e ICAM-1) por imunohistoquímica; 4) quantificação das citocinas e quimiocinas CINC-1 e CINC-2 no soro por enzima-imunoensaio; 5) histologia intestinal; 6) bioquímica sérica; 7) gasometria, hematócrito,

lactato, glicose e leucograma; 8) insulina e corticosterona e; 9) sobrevida.

RESULTADOS: O tratamento com SH reduziu a bacteremia, a incidência de animais com amostras positivas para *E. coli* (57%) e a quantidade de colônias bacterianas ($p<0,05$) comparado ao tratamento com RL ou aos animais não tratados (OI). As interações leucócito-endotélio e a expressão das moléculas de adesão, P-selectina e ICAM-1, reduziram-se após tratamento com SH seguido de enterectomia a valores observados no grupo controle FO ($p>0,05$). Ambos os tratamentos, SH e RL, associados à enterectomia normalizaram as concentrações séricas de CINC-1 e CINC-2 ($p>0,05$). Alterações de P_aCO_2 , pH, lactato e glicemia normalizaram-se após o tratamento dos animais com SH ou RL seguido de enterectomia. A hipoinsulinemia registrada nos ratos OI foi prevenida pelo tratamento dos animais com SH ou RL. As concentrações séricas de corticosterona normalizaram-se após tratamento dos animais com SH associado à enterectomia. A magnitude da lesão intestinal, evidenciada por dano da membrana basal, edema, congestão e presença de células inflamatórias, foi menor no grupo tratado com SH comparado ao tratamento com RL, ambos associados à enterectomia. As concentrações de uréia, creatinina e a atividade das enzimas hepáticas normalizaram-se após tratamento com SH e enterectomia. Houve um aumento significativo da sobrevida dos animais (86%, 15 dias) e no ganho de peso corpóreo ($p>0,05$ vs FO) no grupo tratado com SH seguido de enterectomia. **CONCLUSÕES:** A estabilização de ratos submetidos à OI com SH associada à enterectomia resultou em aumento significativo da sobrevida dos animais. A SH reduziu a resposta inflamatória local (interações leucócito-endotélio e expressão de moléculas de adesão na microcirculação mesentérica, e lesão intestinal) e sistêmica (concentrações séricas de CINC-1 e CINC-2, disfunção renal e hepática).

Descritores: 1. Obstrução intestinal; 2. Seps; 3. Interações leucócito-endotélio; 4. Translocação bacteriana; 5. Solução salina hipertônica

SUMMARY

Zanoni FL. *Study of the effects of hypertonic saline and lactated Ringer's solutions on mesenteric microcirculatory response and bacterial translocation in a rat model of intestinal obstruction and ischemia* [thesis]. São Paulo. Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2010. 82p.

BACKGROUND: It has been shown that hypertonic saline solution improve hemodynamics, the microcirculation, and modulate the immune system, attenuating the inflammatory response associated with shock and trauma. The present study aims to investigate and compare the effects of hypertonic saline solution (NaCl, 7.5%) and lactated Ringer's solution in the treatment of intestinal obstruction and ischemia, analysing the bacterial translocation phenomenon, mesenteric microcirculatory dysfunctions, hemodynamic/metabolic disturbances, and organ dysfunction in a rat model of intestinal obstruction and ischemia (IO) followed by resection of the necrotic small bowel segment. **METHODS:** Anesthetized (pentobarbital 50 mg/kg, i.p.) male Wistar rats (250-300 g) were submitted to IO (ligature at the level of the terminal ileum, followed by ligation of mesenteric vessels that supply 7 – 10 cm of the ileal loop). Two hours thereafter animals were randomized into: IO without treatment; IO treated with lactated Ringer's (LR, 4 ml/kg, i.v.) solution; IO treated with hypertonic saline (HS, 7.5%, 4 mL/kg, i.v.) solution. Twenty-four hours thereafter, IO rats (IO, LR, HS) were submitted to enterectomy. Control Sham-operated rats were submitted to laparotomy only. The following parameters were analysed: 1) bacterial cultures (*E. coli*) from mesenteric lymph nodes, liver, spleen, and blood samples; 2) analyses of leukocyte-endothelial interactions at the mesenteric microcirculation by intravital microscopy; 3) expression of endothelial adhesion molecules (P-selectin, ICAM-1) by immunohistochemistry; 4) quantification of serum cytokines and chemokines (CINC-1, CINC-2) by enzyme-linked immunosorbent assay; 5) intestinal histology; 6) serum biochemistry; 7) blood gases, hematocrit, lactate, glycemia, white blood cell

counts; 8) serum insulin and corticosterone; 9) survival rate. **RESULTS:** Treatment with HS reduced the number of animals with positive samples for the presence of *E. coli* (57%) and the number of CFU/g tissue ($p<0.05$) compared to LR treated rats or IO rats without treatment. Leukocyte-endothelial interactions and expression of the adhesion molecules, P-selectin and ICAM-1, were reduced after treatment with HS solution followed by enterectomy. Values attained matched those observed in Sham group ($p>0.05$). Both treatments, HS and LR associated with enterectomy, reduced serum levels of CINC-1 and CINC-2 to normal values ($p>0.05$ vs Sham). P_aCO_2 , pH, lactate, and glucose were normalized after treatment of the animals with HS or LR followed by enterectomy. The hypoinsulinemia observed in the IO rats was prevented by treatment of the animals with HS or LR. Corticosterone concentrations were normalized after treatment of the animals with HS associated with enterectomy. The magnitude of the intestinal lesion, characterized by basal membrane injury, edema, congestion, and inflammatory cells, was smaller in the HS group compared to LR group, both treatments associated with enterectomy. Serum urea and creatinine levels, and the activity of hepatic enzymes were normalized after treatment with HS and enterectomy. A significant increase in survival rate (86%, 15 days) and in the body weight gain ($p>0.05$ vs Sham) were observed after treatment of the animals with HS and enterectomy. **CONCLUSIONS:** Treatment of the animals with HS solution followed by enterectomy significantly increased the survival rate. HS solution reduced the magnitude of the local inflammatory response (leukocyte-endothelial interactions, and adhesion molecules expression in the mesenteric microcirculation, and the intestinal lesion) and the systemic inflammatory response (CINC-1 and CINC-2 serum levels, renal and hepatic dysfunctions).

Descriptors: 1. Intestinal obstruction; 2. Sepsis; 3. Leukocyte-endothelial interactions; 4. Bacterial translocation; 5. Hypertonic saline solution

1. INTRODUÇÃO

1.1. Considerações gerais

A sepse, o choque séptico e a disfunção de múltiplos órgãos e sistemas são condições de alta morbidade e mortalidade, associadas a uma grande variedade de condições clínico-cirúrgicas graves, como o politraumatismo, as grandes queimaduras e os procedimentos cirúrgicos extensos.

As infecções ocorrem, usualmente, a partir dos pulmões, do trato geniturinário e gastrintestinal (ESPER *et al.*, 2006). Os principais patógenos associados à sepse de origem gastrintestinal são as bactérias gram-negativas, sendo a *Escherichia coli* o agente infeccioso mais freqüente (MACFIE *et al.*, 1999).

1.2. Obstrução intestinal

A obstrução do intestino delgado resulta da presença de um obstáculo mecânico ou de uma alteração da motilidade intestinal que impedem que o conteúdo intraluminal entérico (gases, secreções, resíduos alimentares) atinja o cólon. As causas da obstrução intestinal mecânica (OIM) podem ser representadas por obstáculos intraluminares como, por exemplo, cálculos biliares, verminoses maciças, tumores e hematomas, ou se originam

externamente à alça intestinal, como consequência de hérnias, torções, tumores e aderências (POGGETTI *et al.*, 2004). De acordo com a localização do processo obstrutivo, a OIM pode ser classificada em *alta* – quando a obstrução se dá no intestino delgado proximal – ou *baixa*, quando o trânsito é interrompido no intestino delgado distal. Além da localização, a oclusão luminal pode ser incompleta (*obstrução parcial*) ou completa (*obstrução total*). Em função do tempo de instalação da obstrução intestinal, esta pode ser *aguda* ou *crônica* e dependendo do comprometimento vascular pode ser *simples* (quando o suprimento sanguíneo intestinal está íntegro) ou *estrangulada*, quando há oclusão dos vasos mesentéricos, levando à isquemia e necrose do segmento intestinal obstruído (LOPES FILHO & FERRARO, 2004; POGGETTI *et al.*, 2004).

No intestino saudável, o movimento de líquidos e eletrólitos ocorre por absorção, da luz intestinal para o sangue, ou por secreção, do sangue para o lúmen. Após a obstrução intestinal, o movimento de líquidos é predominantemente do sangue para o lúmen o que aumenta, de forma significativa, a quantidade de líquido e eletrólitos no intestino obstruído (POGGETTI *et al.*, 2004). Durante esta fase inicial, a distensão estimula o peristaltismo dos segmentos proximal e distal em relação ao ponto de obstrução. Quando a distensão intestinal se torna grave, ao ponto de elevar consideravelmente a pressão hidrostática intra-luminal, há também obstrução, por compressão, dos vasos linfáticos da mucosa levando ao desenvolvimento de edema da parede intestinal. O aumento da pressão hidrostática intra-luminal também contribui para a compressão de vênulas

pós-capilares, o que eleva a pressão hidrostática no leito capilar e aumenta, substancialmente, a difusão de fluido, eletrólitos e proteínas para a luz intestinal (HAYANGA *et al.*, 2005). Além da hipersecreção e do edema de parede intestinal, o extravasamento de líquidos para a cavidade peritoneal e o vômito também contribuem para a perda de líquido e eletrólitos (POGGETTI *et al.*, 2004). Todos estes fatores, somados, diminuem o fluido do espaço extracelular, sendo que a desidratação prolongada pode resultar em oligúria, azotemia e hemoconcentração, além de hipotensão e choque hipovolêmico. A distensão intestinal pode, também, elevar a pressão intra-abdominal, prejudicando a ventilação (compressão diafragmática) e reduzir o retorno venoso (compressão da veia cava), potencializando os efeitos da hipovolemia (HAYANGA *et al.*, 2005).

1.3. Lesão de isquemia e reperfusão

A lesão por isquemia/reperfusão (I/R) intestinal é importante fator associado com alta morbidade e mortalidade no choque séptico e hipovolêmico e em pacientes politraumatizados e submetidos à cirurgia para correção de aneurisma aórtico abdominal, revascularização do miocárdio, correção de hérnias estranguladas e transplante intestinal. Durante a fase isquêmica, a interrupção do suprimento sanguíneo inicia a lesão tecidual. Paradoxalmente, a restauração do fluxo sanguíneo para o tecido isquêmico desencadeia uma cascata de eventos que potencializa a lesão celular, conhecida como lesão de reperfusão. A lesão de reperfusão,

freqüentemente, excede o dano celular inicial (MALLICK *et al.*, 2004). A lesão provocada pela isquemia inicia-se com uma queda na produção mitocondrial de energia (síntese de ATP, fosforilação oxidativa). Devido à deficiência de energia ocorrem inúmeras alterações intracelulares, como distúrbios na homeostasia iônica, ativação de hidrolases (fosfolipases e proteases) e aumento da permeabilidade da membrana das células. O pH citosólico diminui devido diretamente à degradação do ATP e aumento da atividade glicolítica. A depleção de ATP prejudica o funcionamento da bomba de sódio e potássio (Na^+/K^+ -ATPase) levando a aumento da concentração de sódio intracelular e o surgimento de edema celular (DE GROOT & RAUEN, 2007).

A lesão por reperfusão caracteriza-se por intensa reação inflamatória, envolvendo macrófagos, células endoteliais, neutrófilos, linfócitos, plaquetas, células parenquimatosas e elementos não celulares, como o sistema complemento, a cascata de coagulação, espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, citocinas pró e anti-inflamatórias (DE GROOT & RAUEN, 2007; VINTEN-JOHANSEN *et al.*, 2007).

Entre os órgãos internos o intestino é, provavelmente, o mais sensível à lesão de I/R. Suas células lábeis são facilmente lesadas durante episódios de isquemia e a reperfusão intestinal resulta em dano adicional à mucosa. Além do mais, existem evidências de que a mucosa intestinal é um sítio de produção de proteínas de fase aguda, hormônios e citocinas, as quais não influenciam somente o intestino, mas também podem afetar o funcionamento e a integridade de órgãos distantes. A produção e liberação destas

substâncias levam ao desenvolvimento da síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS) a qual pode evoluir com disfunção e falência orgânica (MALLICK *et al.*, 2004).

1.4. Translocação bacteriana

O trato gastrointestinal é colonizado por centenas de espécies diferentes de bactérias (BALZAN *et al.*, 2007). Em condições normais, a mucosa do trato gastrointestinal funciona como barreira para que as bactérias residentes e/ou seus produtos tóxicos não cheguem à circulação sistêmica. A eficiência desta barreira é demonstrada pelo fato de que o conteúdo cecal tem uma concentração bacteriana de 10^{12} microorganismos/mL, enquanto o sangue portal e os linfonodos mesentéricos (LNM) são, usualmente, estéreis. Esta função intestinal serve para gerenciar os antígenos luminiais, o que favorece uma relação simbiótica entre o homem e a bactéria intestinal, enquanto o meio interno permanece estéril. (GATT *et al.*, 2007).

A lesão por isquemia e reperfusão da célula epitelial intestinal vem sendo postulada como o principal mecanismo envolvido no fenômeno da translocação bacteriana (TB) (BALZAN *et al.*, 2007). Este delicado equilíbrio homeostático entre os microorganismos intra-luminiais e a barreira intestinal é perturbado na obstrução intestinal (GATT *et al.*, 2007).

1.5. Tratamento clínico-cirúrgico da obstrução intestinal

Os pacientes com obstrução intestinal têm depleção do volume intravascular por diminuição da ingestão de água, pelos episódios de vômitos, e pelo próprio seqüestro de líquidos para o lúmen e para a parede intestinal. Isto faz com que estes pacientes necessitem de reposição hídrica/eletrolítica agressiva, através da administração intravenosa de solução cristalóide, como o Ringer lactato (RL). A monitoração laboratorial dos níveis séricos de eletrólitos e creatinina e do hematócrito pode direcionar a reposição de fluidos (HAYANGA *et al.*, 2005). A estabilização do paciente com hidratação, a reposição das perdas eletrolíticas e a antibioticoterapia preventiva estão sempre indicadas nos pacientes com OIM (POGETTI *et al.*, 2004). Praticamente todos os pacientes com obstrução de intestino delgado devem se beneficiar do uso de sucção nasointestinal, o que promove alívio sintomático imediato da náusea e vômito, além de reduzir, frequentemente, a dor abdominal e prevenir a aspiração durante a indução da anestesia (HAYANGA *et al.*, 2005).

O tratamento cirúrgico é indicado, em condição de urgência, para todos os doentes com diagnóstico de OIM completa. Obstrução com peritonite, hérnias encarceradas estranguladas, estrangulação intestinal sem hérnia, pneumatose intestinal e volvo são as causas mais comuns que levam à cirurgia nestes pacientes. Na abordagem cirúrgica da obstrução intestinal, a exploração cuidadosa da cavidade peritoneal, a identificação da causa e do nível da obstrução e a avaliação da viabilidade das alças intestinais são

importantes aspectos que devem ser considerados. Deve-se dar prioridade ao restabelecimento imediato do trânsito intestinal, realizando a ressecção do segmento comprometido, seguido de anastomose. As complicações do tratamento cirúrgico incluem a formação de abscessos, intussuscepção, estenose da anastomose, hérnia interna e obstrução no local do estroma, sendo todas situações que exigem novo procedimento cirúrgico (POGETTI *et al.*, 2004).

1.6. Solução salina hipertônica

Pequenos volumes de soluções hipertônicas têm a capacidade de promover expansão intravascular imediata, restaurar o débito cardíaco e o fluxo sanguíneo regional, melhorar a microcirculação e modular a resposta imune, atenuando a resposta inflamatória induzida pelo choque e trauma.

VELASCO *et al.* (1980) demonstraram que, após uma única administração de 4 mL/kg de solução salina hipertônica (SH, NaCl 7,5%), foi possível restaurar a pressão arterial, o débito cardíaco, o fluxo regional mesentérico e a sobrevivência em animais que sofreram choque hemorrágico grave, com perda de 40 mL/kg de sangue. Neste mesmo ano FELIPPE *et al.* (1980), em estudo pioneiro, verificaram que a administração de alíquotas de 50 mL de NaCl 7,5% a pacientes com choque refratário determina o restabelecimento dos parâmetros hemodinâmicos.

A expansão plasmática é o efeito inicial da administração de SH, devido ao gradiente osmótico que se estabelece. O endotélio e as hemácias

são os principais alvos desta expansão, por estarem em contato íntimo com a hipertonicidade plasmática induzida pela SH. Observa-se redução do volume de células endoteliais e hemácias e restauração do fluxo microcirculatório (POLI DE FIGUEIREDO *et al.*, 2006). Os efeitos físicos e fisiológicos da administração de pequenos volumes de SH têm curto tempo de duração. Os efeitos tardios relacionam-se a benefícios na resposta imune. A adição de SH ao meio de cultura de linfócitos, em concentrações próximas àsquelas obtidas com infusão de 4 mL/kg de NaCl 7,5% em humanos, determina aumento da proliferação destas células (COIMBRA *et al.*, 1995). A adição de prostaglandina E₂ (PGE₂) ao meio de cultura, na ausência de SH, causa uma redução na proliferação de linfócitos T, o que é revertido quando se adiciona SH ao meio de cultura contendo PGE₂ (COIMBRA *et al.*, 1996). Em modelo de choque hemorrágico em ratos, o infiltrado celular inflamatório, o edema e a hemorragia pulmonar, observados após tratamento dos animais com RL, reduzem-se após tratamento com SH. Em paralelo, o número de leucócitos aderidos ao endotélio microvascular (fáscia espermática interna) reduz-se de modo significativo após tratamento com SH, comparado ao tratamento padrão com RL (YADA-LANGUI *et al.*, 2004). Em modelo de dupla lesão, choque hemorrágico seguido de inflamação pulmonar por lipopolissacarídeo (LPS), o tratamento com SH reduz o número de leucócitos no lavado broncoalveolar e a expressão de CD11b e L-selectina no leucócito, comparado ao RL (RIZOLI *et al.*, 1998).

Em resposta ao LPS, leucócitos e células endoteliais liberam mediadores responsáveis pelos efeitos observados nos pacientes sépticos,

como febre, coagulação intravascular, depressão miocárdica e hipotensão (MAYEUX, 1997, BLATTEIS *et al.*, 2005). Estes mediadores incluem, por exemplo, o fator de necrose tumoral (TNF)- α , interleucina (IL)-1 e IL-6 e o óxido nítrico (NO). Em ratos com SIRS não infecciosa, a produção *ex vivo* de TNF- α por macrófagos alveolares reduz-se no grupo tratado com SH, em comparação ao grupo tratado com RL (STAUDENMAYER *et al.*, 2005). Ainda neste estudo verificou-se menor produção de TNF- α pelos macrófagos estimulados *ex vivo* com LPS no grupo tratado com SH.

A apresentação clínica heterogênea associada à complexa fisiopatologia da sepse têm sido considerada na investigação de tratamentos alternativos baseados na terapia combinada de drogas. COIMBRA *et al.* (2006) demonstraram que o tratamento com SH associada à pentoxifilina reduz, de modo significativo, a concentração das citocinas TNF- α e IL-1 β no lavado broncoalveolar de ratos submetidos ao choque hemorrágico, em comparação ao tratamento com RL.

Em função do exposto, pretende-se neste estudo investigar os efeitos da SH em modelo de obstrução intestinal e isquemia em ratos. Eventuais efeitos benéficos decorrentes do tratamento com SH poderiam resultar de menor translocação bacteriana do intestino para o sangue; de redução no número de colônias bacterianas presentes nos LNM, fígado e baço; de atenuação da lesão ao nível da microcirculação mesentérica; de redução na expressão de moléculas de adesão (P-selectina e *Intercellular adhesion molecule* [ICAM]-1) no mesentério e de redução na concentração de citocinas pró-inflamatórias no soro.

2. OBJETIVOS

Este trabalho tem como objetivo geral estudar os efeitos da solução salina hipertônica sobre a translocação bacteriana intestinal em ratos Wistar submetidos à obstrução intestinal com isquemia.

Os objetivos específicos são:

- a) investigar as interações leucócito-endotélio na microcirculação mesentérica;
- b) verificar a expressão de moléculas de adesão (P-selectina e ICAM-1) no endotélio da microcirculação;
- c) verificar a participação de citocinas (TNF- α , IL-1 β , IL-6, e IL-10) e das quimiocinas *cytokine-induced neutrophil chemoattractant* (CINC-1 e CINC-2) – família da IL-8 – através da determinação de suas concentrações no soro dos animais;
- d) proceder a histologia intestinal e bioquímica sérica e;
- e) determinar a concentração de insulina e corticosterona séricas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais

Foram utilizados ratos Wistar, machos, provenientes do Biotério da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, com peso aproximado de 250 a 300 g. Os animais foram mantidos, nas fases pré e pós-experimental, em ambiente controlado para temperatura ($23 \pm 2^{\circ}\text{C}$), umidade e exposição à luz artificial, com ciclo claro/escuro de 12 horas, com livre acesso a ração e água.

3.2. Protocolo experimental

3.3. Anestesia e preparo dos animais

Os animais foram submetidos à anestesia geral com pentobarbital sódico (50 mg/kg) administrado pela via intraperitoneal. Doses complementares de pentobarbital sódico foram administradas (4 mg/kg) pela via endovenosa (veia jugular), quando necessário, para a manutenção do plano anestésico. Os animais anestesiados foram imobilizados em decúbito dorsal, realizando-se a tricotomia e anti-sepsia, com iodopovidine, da parede abdominal e colocação de campo fenestrado. Ainda posicionados em decúbito dorsal, foram realizadas a antissepsia e tricotomia da região cervical ventral, para dissecação e cateterização da artéria carótida e veia jugular (catéter de polietileno PE-50).

3.4. Grupos experimentais.

Os animais foram randomizados para os seguintes grupos experimentais:

Grupo controle falso operado (FO)

Os animais foram anestesiados conforme descrito, a veia jugular e a artéria carótida cateterizadas, a cavidade peritoneal foi aberta e, em seguida, a parede abdominal suturada com fio de nylon 4-0 (Ethicon, Brasil).

Grupo submetido à obstrução intestinal e isquemia (OI)

Os animais, devidamente anestesiados, foram submetidos à laparotomia mediana, com secção da parede abdominal por planos anatômicos. Após revisão da cavidade peritoneal, o ceco e o íleo terminal foram exteriorizados, procedendo-se a oclusão do lúmen intestinal por ligadura ao nível do íleo terminal (obstrução intestinal), distante 1,0 cm do ceco. A seguir, procedeu-se a ligadura de alguns ramos da artéria mesentérica (isquemia) correspondentes à irrigação de aproximadamente 7 – 10 cm do íleo, proximal à ligadura intestinal. Terminados estes procedimentos, a parede abdominal foi suturada em dois planos (muscular e pele). Todas as ligaduras e planos de sutura foram realizados com fio de nylon 4-0 (Ethicon, Brasil).

Grupos tratados

Os animais submetidos à obstrução intestinal e isquemia receberam, 2 horas após, dose única (4 mL/kg, durante 5 minutos), pela via endovenosa de: (a) solução Ringer com lactato (RL) 28mM (273 mOsm/L, Baxter, Brasil); ou (b) solução salina hipertônica, NaCl 7,5% (SH, 2400 mOsm/L).

3.5. Ressecção intestinal.

Os animais submetidos à obstrução intestinal e isquemia, tratados ou não (grupos OI, RL e SH), foram submetidos a uma nova cirurgia, 24 horas após o procedimento cirúrgico inicial, com o intuito de remover o segmento

intestinal necrosado. A remoção deste segmento foi realizada através de enterectomia com enteroanastomose término-terminal de íleo distal. A sutura intestinal foi realizada de forma interrompida com fio nylon 7-0 (Ethicon, Brasil)

3.6. Medidas hemodinâmicas e gasometria

Os animais foram anestesiados, conforme descrito, e o catéter da artéria carótida foi conectado a um transdutor de pressão (P23XL ViggoSpectramed Statham, CA, USA), ligado a um sistema de multicanal computadorizado de aquisição de dados biológicos (Acqknowledge, Biopac Systems, Inc Goleta, CA, USA). Através deste sistema foram registrados curvas e valores de pressão arterial sistêmica, pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca durante 2 horas. Amostras de sangue foram coletadas da artéria carótida para a determinação dos parâmetros P_aO_2 , P_aCO_2 , pH, íons Na^+ e K^+ , e lactato (Radiometer ABL 555, Radiometer Medical, Copenhagen, Denmark).

3.7. Leucograma e glicemia

Amostras de sangue (20 μ L), coletadas da cauda do animal, foram diluídas em solução de Turk (1:20) e posteriormente colocadas em câmara de Neubauer para contagem total de leucócitos. Também foram coletadas amostras para a realização de esfregaço sangüíneo que, corados pelo

método de Giemsa/May-Grünwald, serviram para contagem diferencial de leucócitos. Foram contadas 100 células por lâmina, diferenciando-se os tipos celulares (neutrófilos, linfócitos, monócitos, eosinófilos). Dividindo-se o número absoluto de neutrófilos pelo número absoluto de linfócitos, foi estabelecida uma razão neutrófilo/linfócito (N/L) no sangue periférico. A glicemia foi determinada (monitor de glicose Advantage, Lilly, São Paulo, SP) em amostras de sangue, coletadas da cauda dos animais.

3.8. Ensaios microbiológicos

Amostras dos LNM, fígado e baço foram obtidas dos animais, 24 horas após o procedimento cirúrgico inicial. Estes tecidos foram macerados e homogeneizados em solução salina fisiológica 0,9% estéril. As amostras foram semeadas em meio de cultura Mac Conkey (MC) (Difco®) e incubadas por 24 a 48 horas a 37°C. As colônias de *E. coli* foram identificadas e contadas manualmente, sendo expressas em unidades formadoras de colônias (UFC) por grama de tecido.

Amostras de sangue (1 mL), obtidas por punção da aorta abdominal foram inoculadas em frascos de hemocultura (Hemocult® I, Laborclin, PR, Brasil) e incubadas a 37°C, por até 7 dias. A cada dia, amostras da cultura foram retiradas do frasco e semeadas em ágar MC para verificar a presença de *E. coli*.

A translocação bacteriana foi caracterizada por cultura bacteriana positiva no complexo linfonodal mesentérico, e concomitante presença de bactérias nas amostras de sangue, fígado ou baço.

3.9. Microscopia Intravital (*in situ*) de mesentério

Quarenta e oito horas após os procedimentos cirúrgicos iniciais, os animais foram anestesiados (pentobarbital sódico, 50 mg/kg, i.p.) e uma incisão cutânea e muscular na porção lateral direita do abdome foi realizada, 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 tampão (pH 7,2 a 7,4) com a seguinte composição (mM): 113 NaCl, 4,7 KCl, 2,5 CaCl₂.2H₂O, 25 NaHCO₃, 1,1 MgSO₄, 1,1 KH₂PO₄, 5 glicose, saturada com uma mistura de gases (N₂ 95% e CO₂ 5%)

A interação dos leucócitos com a superfície luminal do endotélio venular (vênulas pós-capilares de 20 a 25 µm de diâmetro) foi estudada em segmento escolhido do vaso, conforme descrito anteriormente (NAKAGAWA *et al.*, 2006). O número de leucócitos que se movem na periferia, em contato com o endotélio, foi determinado durante 10 minutos. O número de células que permaneceram aderidas ao endotélio, por mais de 30 segundos, foi determinado em extensão de 100 µm da vênula. Leucócitos migrados para o

tecido perivascular foram contados em área equivalente a 5.000 μm^2 . A velocidade de rolamento leucocitário foi determinada e expressa em $\mu\text{m/s}$.

3.10. Quantificação das moléculas de adesão por imunofluorescência

Sob anestesia com pentobarbital sódico (50 mg/kg), os animais foram exsanguinados por punção da aorta abdominal. O mesentério foi removido, imerso em hexano sob nitrogênio líquido e mantido a -70°C . Cortes de 8 μm foram fixados em acetona gelada, durante 10 minutos, e estocados a -20°C para processamento posterior. O processamento incluiu o bloqueio da peroxidase endógena com H_2O_2 a 3%. Em seguida, os sítios inespecíficos foram bloqueados pela incubação dos cortes em solução tampão (*SuperBlock Buffer*, Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA), por período de 16 horas a 4°C . Anticorpos primários anti-ICAM-1 (CD54, Seikagaku Co., Tokyo, Japan), e anti-P-selectina (CD62P, R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA), previamente conjugados à biotina, foram diluídos em tampão fosfato salina (PBS) com tween-20 a 0,3% na proporção de 1:100 e sobrepostos aos cortes para incubação por 16 horas a 4°C . Após lavagens sucessivas com PBS, as amostras foram incubadas por 1 hora à temperatura ambiente com o complexo estreptavidina fluoresceína diluído em PBS na proporção de 1:200. Após novas lavagens, as amostras foram recobertas com meio especial de iodeto de propídeo (24 horas, 4°C) e os cortes recobertos por lamínulas. A reação imunohistoquímica foi avaliada em

sistema de análise de imagens com auxílio de *software* Image Pro-plus®, versão 4.1 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA). Os resultados são expressos em intensidade média de fluorescência.

3.11. Quantificação de citocinas e quimiocinas por enzima-imunoensaio

A quantificação de citocinas (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10) e das quimiocinas CINC-1 e CINC-2 foi realizada em amostras de soro obtidas dos animais dos quatro grupos experimentais 24 horas após a obstrução intestinal e 24 horas pós-enterectomia, utilizando-se o método de ELISA por Duo-set (R & D Systems, Inc., Minneapolis, MN, USA). Inicialmente, na placa com 96 poços, foram adicionados 100 μ L/poço do anticorpo de captura, anti-TNF- α (4 μ g/mL) ou anti-IL-1 β (0,8 μ g/mL), ou anti-IL-6 (4 μ g/mL), ou anti-IL-10 (4 μ g/mL), ou anti-CINC-1 (0,4 μ g/mL) ou anti-CINC-2 (2 μ g/mL). Após incubação durante uma noite à 4°C, o sobrenadante foi desprezado e a placa lavada 3 vezes com o tampão de lavagem (aproximadamente 300 μ L/poço). Em seguida, foi realizada a reação de bloqueio adicionando-se 200 μ L/poço de albumina sérica bovina a 2% em PBS e incubação por 1 hora à temperatura ambiente (20 a 26°C). A placa foi novamente lavada 3 vezes com o tampão de lavagem. Adicionaram-se, em duplicata, 100 μ L/poço do padrão e das amostras procedendo-se à incubação da placa por 2 horas à temperatura ambiente. Para a curva padrão utilizaram-se TNF- α , ou IL-1 β , ou IL-6, ou IL-10, ou CINC-1 ou CINC-2 recombinantes nas

concentrações de 15,625; 31,25; 62,50; 125; 250; 500; 1000; e 2000 pg/mL. Após repetir o procedimento de lavagem da placa, foram adicionados 100 µL/poço do anticorpo de detecção biotinilado para TNF- α (100 ng/mL), ou IL-1 β (350 ng/mL), ou IL-6 (400 ng/mL), ou IL-10 (300 ng/mL), ou CINC-1 (50 ng/mL) ou CINC-2 (100 ng/mL) e a placa incubada por 2 horas à temperatura ambiente. Ao término da incubação, o ciclo de lavagem da placa foi repetido e, em seguida, adicionaram-se 100 µL/poço da enzima estreptoavidina peroxidase na proporção 1:200 de enzima:PBS com 0,05% de tween-20, e incubação por 1 hora à temperatura ambiente e protegida da luz. Em seguida, o ciclo de lavagem da placa foi repetido e a reação revelada pela adição de 100 µL/poço de 3,3',5,5'-tetramethylbenzidina (TMB) e incubação de 30 minutos a 1 hora à temperatura ambiente e protegida da luz. A reação foi bloqueada adicionando-se 50 µL/poço de H₂SO₄ (1N), avaliando-se a densidade óptica das amostras a 450 nm imediatamente após o bloqueio da reação.

3.12. Histologia intestinal

Fragmentos do íleo foram obtidos da porção proximal à área de obstrução e isquemia, fixados em paraformaldeído a 4% por 24 horas, submetidos à desidratação (etanol 70%, 95% e 100%), à diafanização (xilol) e incluídos em blocos de parafina. Cortes de 5 µm de espessura foram corados com hematoxilina-eosina. Um sistema de pontuação para o grau de lesão intestinal foi elaborado com base nos seguintes parâmetros: grau de

lesão à lâmina basal, edema, congestão e infiltrado inflamatório. Cada parâmetro recebeu uma pontuação de 0 (nenhum), 1 (leve), 2 (moderada) ou 3 (grave). Os escores totais foram calculados como a soma dos escores individuais para cada parâmetro da amostra. Os escores médios e os erros padrão foram calculados para cada grupo de animais.

3.13. Bioquímica sérica

Amostras de sangue foram obtidas através de punção da aorta abdominal, 24 e 48 horas após o início dos experimentos, para a determinação dos níveis séricos de uréia, creatinina e bilirrubinas e da atividade das enzimas alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), fosfatase alcalina (FA) e lactato desidrogenase (LDH). As dosagens foram realizadas junto ao Laboratório Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, através de *kits* de uso comercial (Modular Analytics, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany).

3.14. Determinação da concentração sérica de insulina

A insulinemia foi determinada em amostras de soro obtidas dos animais dos quatro grupos experimentais 24 horas após a obstrução intestinal e 24 horas pós-enterectomia, utilizando-se o “*Rat insulin Enzyme Immunoassay Kit*” (SPIbio, Massy Cedex, France), que se baseia na

capacidade da insulina, presente nas amostras de soro, em competir com a insulina de rato ligada a acetilcolinesterase (traçador), pela ligação ao anticorpo específico (reação imunológica). A leitura foi realizada a 414 nm e os resultados estão expressos em ng/mL.

3.15. Determinação da concentração sérica de corticosterona

A quantificação de corticosterona foi realizada em amostras de soro obtidas dos animais dos quatro grupos experimentais 24 horas após a obstrução intestinal e 24 horas pós-enterectomia, utilizando-se o “*Corticosterone Immunoassay Kit*” (R & D Systems, Inc., Minneapolis, MN, USA), que se baseia na capacidade da corticosterona, presente nas amostras de soro, em competir com a corticosterona ligada a fosfatase alcalina (traçador), pela ligação ao anticorpo específico (reação imunológica). A leitura foi realizada a 405 nm e os resultados estão expressos em pg/mL.

3.16. Análise estatística

Os resultados foram avaliados por análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de múltiplas comparações de Tukey-Kramer ou teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis. Diferenças entre proporções foram analisadas pelo teste de qui-quadrado. Considerou-se significativo $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. Características gerais e sobrevida dos animais

Todos os animais submetidos à obstrução intestinal com isquemia morreram em até 72 horas, enquanto não houve mortalidade no grupo controle avaliada até 15 dias pós-cirurgia. O tratamento com SH, associado à remoção cirúrgica do segmento intestinal necrosado, aumentou significativamente a sobrevida (86% em 15 dias, $p<0,01$) em comparação aos animais não submetidos à remoção cirúrgica do segmento intestinal necrosado. Os animais submetidos somente à enterectomia ou tratados com RL e submetidos à enterectomia apresentaram menor sobrevida (40% em 15 dias, $p<0,01$), conforme ilustrado na *Figura 1*.

Considerando-se os animais sobreviventes, ao longo de 15 dias de observação, verificou-se que ratos OI submetidos somente à enterectomia ou tratados previamente com RL exibiram significativa redução no ganho de peso corpóreo, em comparação ao grupo FO ($p<0,05$). O grupo tratado com SH associada à cirurgia apresentou ganho de peso corpóreo, para o mesmo período, semelhante àquele observado no grupo FO (*Figura 2*).

Para os animais dos quatro grupos, não houve diferenças significativas nos valores de PAM durante os primeiros 120 minutos de experimento. Os animais tratados com SH, no entanto, exibiram um leve aumento na PAM decorridos 5 minutos do tratamento, em comparação aos grupos FO e OI ($p<0,05$), a qual retornou aos valores normais aos 140 minutos (*Figura 3*).

4.2. Análise dos gases arteriais, eletrólitos, lactato e glicemia

A análise dos gases arteriais, pH, eletrólitos (sódio e potássio), lactato, glicemia e hematócrito (*Tabela 1*) nas 24 horas de evolução pós-cirúrgica indica que: a) não houve alterações significativas nos valores P_aO_2 nos grupos OI, RL e SH; b) houve redução significativa ($p<0,05$) nos valores de P_aCO_2 nos grupos OI, RL e SH; c) houve aumento ($p<0,05$) do pH sanguíneo médio nos grupos OI, RL e SH; d) a concentração sérica de potássio aumentou ($p<0,05$) no grupo OI, sem alterações séricas de sódio em todos os grupos; e) o lactato sanguíneo aumentou em todos os grupos, OI, RL e SH, particularmente no grupo OI; f) ratos OI, RL e SH exibiram hiperglicemia, mais evidente no grupo OI sem tratamento; g) o hematócrito não se alterou. Todas as variáveis avaliadas não se modificaram 24 horas após no grupo FO, como esperado.

Ao se proceder à mesma análise, 24 horas após a enterectomia, verificou-se que os parâmetros avaliados normalizaram-se em todos os grupos de animais, a exceção de discreta hiperglicemia observada no grupo OI sem tratamento prévio com RL ou SH (*Tabela 2*).

4.3. Translocação bacteriana intestinal

Nesta fase avaliou-se o efeito do tratamento dos animais com RL ou SH sobre a translocação bacteriana 24 horas após. A *Tabela 3* apresenta os dados referentes ao cultivo e quantificação de *E. coli* nas amostras de LNM,

fígado, baço e sangue dos animais. Apenas a amostra de LNM de um animal do grupo controle apresentou crescimento bacteriano (57 UFC/g). Nos animais dos grupos OI, RL e SH, a proporção de animais com amostras positivas (LNM) aumentou significativamente (86%, 100% e 86%, respectivamente), com elevada contagem de colônias bacterianas (2.939 ± 1.751 UFC/g, 1.862 ± 1.178 UFC/g e 2.371 ± 1.451 UFC/g, respectivamente). Amostras de fígado, estéreis nos animais controle, apresentaram crescimento bacteriano (953 ± 525 UFC/g) em 86% dos animais do grupo OI. O tratamento com SH reduziu para 43% o número de animais com amostras de fígado positivas e diminuiu a quantidade de colônias bacterianas (104 ± 67 UFC/g), enquanto o tratamento com RL manteve em 71% o número de animais com amostras positivas e aumentou de modo significativo a quantidade de colônias bacterianas (3.080 ± 1.832 UFC/g). Nas amostras de baço, 86% dos animais dos grupos OI e RL apresentaram crescimento bacteriano, com grande quantidade de colônias bacterianas (4.616 ± 1.973 UFC/g e 4.376 ± 2.836 UFC/g, respectivamente). O tratamento com SH reduziu a incidência de animais com amostras positivas (57%) e a quantidade de colônias bacterianas (174 ± 75 UFC/g, $p < 0,05$). As amostras de baço dos animais controles se mostraram estéreis. Enquanto nenhum animal do grupo controle apresentou bacteremia, este evento foi observado em mais da metade dos animais dos grupos OI e RL (57% e 86%, respectivamente). O tratamento dos animais com SH, entretanto, reduziu a 14% a incidência de bacteremia.

4.4. Interações leucócito-endotélio na microcirculação mesentérica

Com o objetivo de se investigar as alterações microcirculatórias decorrentes da obstrução intestinal e isquemia, procedeu-se à observação da microcirculação mesentérica dos animais por técnica de microscopia intravital. As vênulas estudadas tinham diâmetro entre 25 e 30 μm . Verificou-se que ratos OI sem tratamento exibiram, 24 horas após, intenso processo inflamatório caracterizado por aumento de leucócitos *rollers*, aderidos ao endotélio e migrados para o tecido perivascular. Os valores (média $\pm$ epm, $n=5$) obtidos foram: 320 ± 7 *rollers*/10 min; 14 ± 1 leucócitos aderidos/100 μm da vênula; $11,0 \pm 0,4$ leucócitos migrados/5.000 μm^2 , comparados aos valores observados no grupo FO ($n=5$): 136 ± 7 *rollers*/10 min ($p < 0,001$); $3,0 \pm 0,5$ leucócitos aderidos/100 μm da vênula ($p < 0,001$); $1,0 \pm 0,2$ leucócitos migrados/5.000 μm^2 ($p < 0,001$). Estas alterações acompanharam-se de redução na velocidade de rolamento dos leucócitos (OI: 13 ± 1 $\mu\text{m/s}$ e FO: 17 ± 1 $\mu\text{m/s}$, $p < 0,05$), e leucocitose no período pós-cirurgia (OI: 0 h, 12.493 ± 1.193 leucócitos/ mm^3 ; 24 h, 16.200 ± 1.882 leucócitos/ mm^3 ; $n=7$, $p < 0,05$) com aumento da relação N/L (OI: 0 h, $0,4 \pm 0,07$; 24 h, $4,3 \pm 0,52$; $n=7$, $p < 0,001$).

Analisando-se as interações leucócito-endotélio na microcirculação mesentérica pós-enterectomia pôde-se avaliar os efeitos do tratamento prévio com RL ou SH. Os dados, resumidos na *Tabela 4*, indicam que ratos OI submetidos à enterectomia, porém sem tratamento prévio, exibiram

aumento significativo do número de leucócitos *rollers* (1,4 vezes), leucócitos aderidos (3,7 vezes), leucócitos migrados (10 vezes) e redução na velocidade de rolamento dos leucócitos, comparado aos ratos controles FO. O tratamento prévio dos animais com RL não resultou em melhora da reação inflamatória. Os valores observados neste grupo não diferiram daqueles obtidos no grupo OI sem tratamento. O tratamento prévio com SH, no entanto, reduziu por completo a inflamação. Os valores observados nos ratos tratados com SH e submetidos à enterectomia não diferiram dos valores obtidos no grupo controle FO. Além do mais, embora sem diferenças significativas no número de leucócitos totais no sangue periférico entre os grupos, houve aumento significativo na relação N/L no grupo tratado com RL e submetido à enterectomia.

4.5. Expressão de moléculas de adesão em vasos da microcirculação mesentérica

Procedendo-se à quantificação de P-selectina ao nível da microcirculação mesentérica verificou-se que 24 horas após a obstrução intestinal e isquemia houve aumento significativo (~3 vezes) da expressão de P-selectina comparado ao grupo controle FO. O tratamento com RL provocou um aumento equivalente. O tratamento com SH, no entanto, reduziu a expressão desta molécula a valores observados no grupo controle FO (*Figura 4A*). Analisando-se a expressão de P-selectina pós-enterectomia pôde-se avaliar os efeitos do tratamento prévio com RL ou SH. Os dados

indicam que ratos OI submetidos à enterectomia, porém sem tratamento prévio exibiram, ainda, aumento significativo na expressão desta molécula de adesão. Resultado semelhante foi observado após tratamento prévio dos animais com RL. O tratamento prévio com SH reduziu a expressão de P-selectina a valores próximos aos observados nos ratos FO (*Figura 4B*). Fotomicrografias de cada grupo encontram-se ilustradas na *Figura 5*.

Situação análoga foi observada ao se proceder à quantificação de ICAM-1 ao nível da microcirculação mesentérica. Verificou-se que, 24 horas após a obstrução intestinal e isquemia, houve aumento significativo (~ 3 vezes, $p < 0,05$) da expressão de ICAM-1 comparado ao grupo FO. O tratamento com RL provocou um aumento, ainda maior, ao observado no grupo FO ($p < 0,001$). O tratamento com SH, no entanto, reduziu a expressão desta molécula a valores observados no grupo controle FO (*Figura 6A*). Analisando-se a expressão de ICAM-1 pós-enterectomia pôde-se avaliar os efeitos do tratamento prévio com RL ou SH. Os dados indicam que ratos OI submetidos à enterectomia, porém sem tratamento prévio exibiram, ainda, aumento acentuado na expressão desta molécula de adesão. Resultado semelhante foi observado após tratamento prévio dos animais com RL. O tratamento prévio com SH reduziu a expressão de ICAM-1 a valores próximos aos observados nos ratos FO (*Figura 6B*). Fotomicrografias de cada grupo encontram-se ilustradas na *Figura 7*.

4.6. Quantificação de citocinas e das quimiocinas CINC-1 e CINC-2 no soro

Os resultados da dosagem da quimiocina CINC-1 são apresentados na *Figura 8*. Ratos submetidos à obstrução intestinal e isquemia exibiram um aumento de 9 vezes na concentração de CINC-1, por comparação com o grupo controle FO. O tratamento com RL não reduziu, de forma significativa, as concentrações desta quimiocina. O tratamento com SH, no entanto, reduziu (55%) a concentração de CINC-1 comparado aos valores observados no grupo OI (*Figura 8A*). Vinte e quatro horas após o tratamento cirúrgico dos animais obstruídos, os valores de CINC-1 se normalizam (*Figura 8B*).

Os resultados da dosagem da quimiocina CINC-2 são apresentados na *Figura 9*. Ratos submetidos à obstrução intestinal e isquemia exibiram um aumento de 16 vezes na concentração de CINC-2, por comparação com o grupo controle FO. Os tratamentos com RL e SH reduziram 45% e 65%, respectivamente, as concentrações de CINC-2 por comparação aos valores observados no grupo OI (*Figura 9A*). Vinte e quatro horas após o tratamento cirúrgico dos animais obstruídos, os valores de CINC-2 ainda se mantiveram elevados no grupo OI, enquanto se normalizaram nos grupos RL e SH (*Figura 9B*). Não se detectou a presença das citocinas TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10 24 ou 48 horas após OI e enterectomia.

4.7. Histologia intestinal

Procedendo a análise histológica do íleo terminal, 24 horas após a enterectomia, observou-se lesão intestinal evidenciada pelo elevado escore referente à lesão de membrana basal, edema, congestão e presença de células inflamatórias, nos grupos OI, RL e SH, por comparação ao grupo FO (*Figura 10*). Apesar da lesão evidente, a sua magnitude foi significativamente menor no grupo SH comparado ao grupo RL.

4.8. Bioquímica sérica

A fim de se avaliar a disfunção renal e a lesão hepática, avaliaram-se as concentrações de uréia, creatinina e bilirrubinas, e as atividades da ALT, AST, FA e LDH no soro dos animais. Verificou-se que ratos OI sem tratamento exibiram, 24 horas após, elevada concentração sérica de uréia e creatinina e aumento na atividade das enzimas ALT, AST e FA, por comparação aos respectivos controles FO. Os animais tratados com RL e SH, neste mesmo período, exibiram redução significativa nestes valores, à exceção da ainda elevada concentração sérica de uréia no grupo tratado com RL. Não houve diferenças na atividade da LDH, bem como na concentração sérica de bilirrubinas, em todos os grupos (*Tabela 5*).

Em outra análise, realizada 24 horas após a enterectomia, verificou-se que por comparação aos respectivos controles FO, os ratos OI sem tratamento e submetidos à enterectomia apresentaram elevadas

concentrações séricas de uréia e creatinina, e aumento na atividade da AST, FA e LDH. Os animais tratados com RL e submetidos à enterectomia exibiram, ainda, aumento nas concentrações séricas de creatinina e bilirrubinas (indireta e total), além de atividades séricas elevadas de ALT, AST e FA. O tratamento prévio dos animais com SH normalizou todos os parâmetros analisados, à exceção da atividade da AST (*Tabela 6*).

4.9. Concentrações séricas de insulina e corticosterona

Determinando-se a insulinemia, verificou-se que os ratos OI exibiram redução de cerca de 50% na concentração sérica de insulina, por comparação com ratos controles FO. O tratamento prévio com RL ou SH preveniu o estado insulinopênico nestes animais (*Figura 11A*). Após o tratamento cirúrgico, os níveis séricos de insulina não diferiram entre os grupos (*Figura 11B*).

Quanto à concentração sérica de corticosterona, verificaram-se aumentos significativos nos animais dos grupos OI, RL e SH por comparação aos animais FO (*Figura 12A*). Após o tratamento cirúrgico, os animais dos grupos OI e RL exibiram, ainda, concentrações séricas elevadas de corticosterona por comparação ao grupo FO. O tratamento com SH, neste momento, normalizou estes valores (*Figura 12B*).

Tabela 1. Análise dos gases arteriais, eletrólitos, pH, lactato, glicose e hematócrito após o tratamento com Ringer lactato ou salina hipertônica

	FO			OI			RL			SH		
	0 h	24 h	0 h	24 h	0 h	24 h	0 h	24 h	0 h	24 h	0 h	24 h
pH	7,35 ± 0,01	7,40 ± 0,01	7,36 ± 0,01	7,49 ± 0,05 ^a	7,33 ± 0,02	7,47 ± 0,02 ^a	7,32 ± 0,01	7,44 ± 0,02 ^a				
P_aO₂ (mmHg)	77 ± 2	69 ± 3	92 ± 2	91 ± 14	77 ± 9	73 ± 7	76 ± 9	76 ± 8				
P_aCO₂ (mmHg)	49 ± 1	45 ± 1	44 ± 0	34 ± 7 ^a	50 ± 2	40 ± 2 ^a	50 ± 3	40 ± 3 ^a				
HCO₃⁻ (mmol/L)	26 ± 1	27 ± 0	24 ± 0	24 ± 3	25 ± 0	29 ± 1	25 ± 1	27 ± 2				
Sódio (mmol/L)	137 ± 5	143 ± 1	139 ± 3	136 ± 4	130 ± 2	134 ± 1	137 ± 6	140 ± 2				
Potássio (mmol/L)	4,0 ± 0,2	3,6 ± 0,2	4,5 ± 0,3	5,0 ± 0,3 ^c	4,0 ± 0,3	3,8 ± 0,1	4,1 ± 0,2	3,7 ± 0,3				
Lactato (mmol/L)	2,4 ± 0,2	2,4 ± 0,2	2,3 ± 0,2	4,8 ± 0,3 ^b	1,8 ± 0,1	4,1 ± 0,2 ^b	2,0 ± 0,3	3,2 ± 0,3 ^b				
Glicemia (mg/dL)	91 ± 4	96 ± 3	96 ± 2	196 ± 15 ^b	93 ± 2	126 ± 17 ^a	96 ± 2	124 ± 7 ^a				
Hematócrito (%)	43 ± 1	40 ± 1	42 ± 1	44 ± 2	43 ± 1	44 ± 2	40 ± 2	39 ± 4				

Ratos falso operados (FO); ratos submetidos à obstrução intestinal e isquemia (OI); ratos OI tratados com Ringer lactato (RL, 4 mL/kg, i.v., 2 horas após); ratos OI tratados com salina hipertônica 7,5% (SH, 4 mL/kg, i.v., 2 horas após). As análises foram realizadas antes e 24 horas após o início dos experimentos. Os valores representam a média ± epm para 7 animais por grupo na análise da glicemia e 5 animais por grupo nas demais análises. ^a*p*<0,05; ^b*p*<0,001 por comparação à 0 h no mesmo grupo; ^c*p*<0,05 por comparação aos valores correspondentes nos demais grupos.

Tabela 2. Análise dos gases arteriais, eletrólitos, pH, lactato, glicose e hematócrito após o tratamento com Ringer lactato ou salina hipertônica e enterectomia

	FO	OI	RL	SH
		Enterectomia		
pH	7,34 ± 0,04	7,46 ± 0,02	7,42 ± 0,02	7,43 ± 0,01
P_aO₂ (mmHg)	70 ± 3	81 ± 6	75 ± 1	72 ± 2
P_aCO₂ (mmHg)	44 ± 3	37 ± 1	41 ± 2	39 ± 1
HCO₃⁻ (mmol/L)	26 ± 1	26 ± 1	26 ± 1	25 ± 2
Sódio (mmol/L)	144 ± 0	134 ± 1	130 ± 2	132 ± 3
Potássio (mmol/L)	3,3 ± 0,2	3,9 ± 0,4	4,2 ± 0,2	3,5 ± 0,2
Lactato (mmol/L)	2,2 ± 0,2	2,8 ± 0,3	2,1 ± 0,2	1,8 ± 0,1
Glicemia (mg/dL)	94 ± 2	124 ± 5 ^a	109 ± 4	97 ± 4
Hematócrito (%)	43 ± 3	41 ± 1	40 ± 1	39 ± 2

Ratos falso operados (FO); ratos submetidos à obstrução intestinal e isquemia (OI) e à enterectomia 24 horas após (OI+Enterectomia); ratos tratados com Ringer lactato (RL, 4 mL/kg, i.v., 2 horas após) e submetidos à enterectomia 24 horas após (RL+Enterectomia); ratos OI tratados com salina hipertônica 7,5% (SH, 4 mL/kg, i.v., 2 horas após) e submetidos à enterectomia 24 horas após (SH+Enterectomia). As análises foram realizadas 48 horas após o início dos procedimentos. Os valores representam a média ± epm para 7 animais por grupo na análise da glicemia e 5 animais por grupo nas demais análises. ^a $p < 0,05$ por comparação aos grupos FO e SH+Enterec.

Tabela 3. Efeito dos tratamentos com Ringer lactato ou salina hipertônica sobre a translocação de *E. coli*

Grupos	Linfonodos mesentéricos		Fígado		Baço		Sangue	
	+ / n	UFC/g	+ / n	UFC/g	+ / n	UFC/g	+ / n	+ / n
FO	1 / 7	57	0 / 7	SC	0 / 7	SC	0 / 7	0 / 7
OI	6 / 7	2.939 ± 1.751 ^a	6 / 7	953 ± 525 ^a	6 / 7	4.616 ± 1.973 ^a	4 / 7	4 / 7
RL	7 / 7	1.862 ± 1.178 ^a	5 / 7	3.080 ± 1.832 ^a	6 / 7	4.376 ± 2.836 ^a	6 / 7	6 / 7
SH	6 / 7	2.371 ± 1.451 ^a	3 / 7	104 ± 67 ^{b,c}	4 / 7	174 ± 75 ^{a,b,c}	1 / 7	1 / 7

Ratos falso operados (FO); ratos submetidos à obstrução intestinal e isquemia (OI); ratos OI tratados com Ringer lactato (RL, 4 mL/kg, i.v., 2 horas após); ratos OI tratados com salina hipertônica 7,5% (SH, 4 mL/kg, i.v., 2 horas após). As amostras foram coletadas 24 horas após o início dos experimentos. +/-, número de animais com cultura positiva para *E. coli*/número total de animais; UFC/g, unidades formadoras de colônia por grama de tecido; SC, sem crescimento. Os valores representam a média ± epm para 7 animais em cada grupo. ^a $p < 0,05$ por comparação ao grupo FO, ^b $p < 0,05$ por comparação ao grupo OI, ^c $p < 0,05$ por comparação ao grupo RL.

Tabela 4. Análise das interações leucócito-endotélio na microcirculação mesentérica de ratos

	FO	OI	RL	SH
			Enterectomia	
Leucócitos Rollers (10 min)	128 ± 5	182 ± 3 ^a	193 ± 9 ^a	88 ± 7 ^b
Leucócitos Aderidos (100 µm de extensão venular)	3 ± 0	11 ± 1 ^a	10 ± 1 ^a	5 ± 1
Leucócitos Migrados (5.000 µm²)	1 ± 0,2	10 ± 0,7 ^a	8 ± 0,3 ^a	3 ± 0,2
Velocidade de rolamento do leucócito (µm/s)	19 ± 2	13 ± 0 ^b	16 ± 1	21 ± 1
Número de leucócitos no sangue periférico (mm³)	13.664 ± 601	15.800 ± 845	15.493 ± 641	14.079 ± 453
Razão neutrófilo / linfócito no sangue periférico	0,3 ± 0,01	0,7 ± 0,13	1,4 ± 0,41 ^b	0,8 ± 0,24

Ratos falso operados (FO); ratos submetidos à obstrução intestinal e isquemia (OI) e à enterectomia 24 horas após (OI+Enterectomia); ratos tratados com Ringer lactato (RL, 4 mL/kg, i.v., 2 horas após) e submetidos à enterectomia 24 horas após (RL+Enterectomia); ratos OI tratados com salina hipertônica 7,5% (SH, 4 mL/kg, i.v., 2 horas após) e submetidos à enterectomia 24 horas após (SH+Enterectomia). As análises foram realizadas 48 horas após o início dos procedimentos. Os valores representam a média ± epm de 5 animais/grupo na análise da microcirculação e de 7 animais/grupo na análise do leucograma. ^ap<0,001, ^bp<0,01 por comparação ao grupo FO.

Tabela 5. Atividade de enzimas hepáticas e níveis séricos de uréia, creatinina e bilirrubinas após o tratamento com Ringer lactato ou salina hipertônica

	FO	OI	RL	SH
Uréia (mg/dL)	44 ± 1	111 ± 22 ^a	86 ± 7 ^a	71 ± 10
Creatinina (mg/dL)	0,25 ± 0,01	0,63 ± 0,08 ^b	0,40 ± 0,04	0,38 ± 0,02
ALT (UI/L)	43 ± 5	84 ± 15 ^a	47 ± 3	52 ± 6
AST (UI/L)	124 ± 7	302 ± 60 ^a	174 ± 19	211 ± 28
FA (UI/L)	130 ± 6	274 ± 66 ^a	154 ± 10	164 ± 14
LDH (UI/L)	1904 ± 334	3067 ± 768	2506 ± 993	1991 ± 562
Bilirrubina (mg/dL)				
Indireta	0,1 ± 0,00	0,2 ± 0,05	0,2 ± 0,01	0,2 ± 0,01
Direta	0,1 ± 0,00	0,1 ± 0,02	0,1 ± 0,01	0,1 ± 0,01
Total	0,2 ± 0,01	0,3 ± 0,05	0,2 ± 0,00	0,2 ± 0,00

Ratos falso operados (FO); ratos submetidos à obstrução intestinal e isquemia (OI); ratos OI tratados com Ringer lactato (RL, 4 mL/kg, i.v., 2 horas após); ratos OI tratados com salina hipertônica 7,5% (SH, 4 mL/kg, i.v., 2 horas após); ALT, alanina aminotransferase; AST, aspartato aminotransferase; FA, fosfatase alcalina; LDH, lactato desidrogenase. As análises foram realizadas 24 horas após o início dos experimentos. Os valores representam a média ± epm para 5 animais em cada grupo. ^a $p < 0,05$; ^b $p < 0,01$ por comparação ao grupo FO.

Tabela 6. Atividade de enzimas hepáticas e níveis séricos de uréia, creatinina e bilirrubinas após o tratamento com Ringer lactato ou salina hipertônica e enterectomia

	FO	OI	RL	SH
	Enterectomia			
Uréia (mg/dL)	39 ± 1	71 ± 3 ^{a,b}	55 ± 4	42 ± 0
Creatinina (mg/dL)	0,27 ± 0,01	0,70 ± 0,03 ^a	0,76 ± 0,02 ^a	0,37 ± 0,03
ALT (UI/L)	41 ± 2	41 ± 1	60 ± 4 ^c	47 ± 1
AST (UI/L)	120 ± 7	228 ± 16 ^d	257 ± 8 ^d	203 ± 11 ^d
FA (UI/L)	117 ± 2	189 ± 14 ^d	261 ± 17 ^c	139 ± 2
LDH (UI/L)	1786 ± 149	2875 ± 192 ^d	1947 ± 304	1942 ± 208
Bilirrubina (mg/dL)				
Indireta	0,2 ± 0,01	0,2 ± 0,04	0,1 ± 0,02	0,1 ± 0,03
Direta	0,1 ± 0,00	0,2 ± 0,03	0,4 ± 0,03 ^d	0,3 ± 0,03
Total	0,3 ± 0,01	0,4 ± 0,02	0,5 ± 0,05 ^d	0,4 ± 0,05

Ratos falso operados (FO); ratos submetidos à obstrução intestinal e isquemia (OI) e à enterectomia 24 horas após (OI+Enterectomia); ratos tratados com Ringer lactato (RL, 4 mL/kg, i.v., 2 horas após) e submetidos à enterectomia 24 horas após (RL+Enterectomia); ratos OI tratados com salina hipertônica 7,5% (SH, 4 mL/kg, i.v., 2 horas após) e submetidos à enterectomia 24 horas após (SH+Enterectomia); ALT, alanina aminotransferase; AST, aspartato aminotransferase; FA, fosfatase alcalina; LDH, lactato desidrogenase. As análises foram realizadas 48 horas após o início dos experimentos. Os valores representam a média ± epm para 5 animais em cada grupo. ^a $p < 0,001$ por comparação aos grupos FO e SH+Enterec; ^b $p < 0,01$ por comparação ao grupo RL + Enterec; ^c $p < 0,001$ por comparação aos grupos FO e OI + Enterec; ^d $p < 0,001$ por comparação ao grupo FO.

Figura 1. Análise de sobrevivência de ratos controles falso-operados (FO, n=7); ratos submetidos à obstrução intestinal e isquemia (OI, n=7); ratos OI submetidos à enterectomia 24 horas após (OI + Enterectomia, n=7); ratos OI tratados com Ringer lactato (RL, 4 mL/kg, i.v., 2 horas após) e submetidos à enterectomia 24 horas após (RL + Enterectomia, n=7); ratos OI tratados com salina hipertônica 7,5% (SH, 4 mL/kg, i.v., 2 horas após) e submetidos à enterectomia 24 horas após (SH + Enterectomia, n=7). * $p<0,01$ por comparação ao grupo OI, † $p<0,05$, ‡ $p<0,001$ por comparação ao grupo FO.

Figura 2. Variação ponderal de ratos controles falso-operados (FO, n=7); ratos submetidos à obstrução intestinal e isquemia (OI) e submetidos à enterectomia 24 horas após (OI + Enterectomia, n=3); ratos OI tratados com Ringer lactato (RL, 4 mL/kg, i.v., 2 horas após) e submetidos à enterectomia 24 horas após (RL + Enterectomia, n=3); ratos OI tratados com salina hipertônica 7,5% (SH, 4 mL/kg, i.v., 2 horas após) e submetidos à enterectomia 24 horas após (SH + Enterectomia, n=6). Os valores representam a média $\pm$ epm. * $p < 0,05$ por comparação ao grupo FO.

Figura 3. Pressão arterial média de ratos controles falso-operados (FO); ratos submetidos à obstrução intestinal e isquemia (OI); ratos OI tratados com Ringer lactato (RL, 4 mL/kg, i.v., 2 horas após); ratos OI tratados com salina hipertônica 7,5% (SH, 4 mL/kg, i.v., 2 horas após). Os valores representam a média $\pm$ epm de 5 animais por grupo. * $p < 0,05$ por comparação ao grupo FO, † $p < 0,05$ por comparação ao grupo OI, decorridos 5 minutos do tratamento com SH.

Figura 4. Expressão de P-selectina em vasos da microcirculação mesentérica de ratos controles falso-operados (FO); antes (A) e após (B) a enterectomia em ratos submetidos à obstrução intestinal e isquemia (OI); ratos OI tratados com Ringer lactato (RL, 4 mL/kg, i.v., 2 horas após); ratos OI tratados com salina hipertônica 7,5% (SH, 4 mL/kg, i.v., 2 horas após). As amostras foram obtidas 24 e 48 horas após o início dos experimentos. Os valores representam a média $\pm$ epm de 6 amostras/rato e 3 ratos/grupo. * $p < 0,001$ por comparação ao grupo FO.

Figura 5. Expressão de P-selectina, por imunofluorescência, em vasos da microcirculação mesentérica de ratos: controle falso-operado (FO); antes (A) e após (B) a enterectomia de ratos submetidos à obstrução intestinal e isquemia (OI); ratos OI tratados com Ringer lactato (RL, 4 mL/kg, i.v., 2 horas após); ratos OI tratados com salina hipertônica 7,5% (SH, 4 mL/kg, i.v., 2 horas após). As amostras foram obtidas 24 e 48 horas após o início dos experimentos. * indica a luz do vaso. As setas indicam a presença de P-Selectina.

P-Selectina

A

FO

OI

RL

SH

B

FO

OI

RL

SH

Figura 6. Expressão de ICAM-1 em vasos da microcirculação mesentérica de ratos controles falso-operados (FO); antes (A) e após (B) a enterectomia de ratos submetidos à obstrução intestinal e isquemia (OI); ratos OI tratados com Ringer lactato (RL, 4 mL/kg, i.v., 2 horas após); ratos OI tratados com salina hipertônica 7,5% (SH, 4 mL/kg, i.v., 2 horas após). As amostras foram obtidas 24 e 48 horas após o início dos experimentos. Os valores representam a média $\pm$ epm de 6 amostras/rato e 3 ratos/grupo. * $p < 0,05$; † $p < 0,001$ por comparação ao grupo FO.

Figura 7. Expressão de ICAM-1, por imunofluorescência, em vasos da microcirculação mesentérica de ratos: controle falso-operado (FO); antes (A) e após (B) a enterectomia de ratos submetidos à obstrução intestinal e isquemia (OI); ratos OI tratados com Ringer lactato (RL, 4 mL/kg, i.v., 2 horas após); ratos OI tratados com salina hipertônica 7,5% (SH, 4 mL/kg, i.v., 2 horas após). As amostras foram obtidas 24 e 48 horas após o início dos experimentos. * indica a luz do vaso. As setas indicam a presença de ICAM-1.

Figura 8. Concentração sérica de CINC-1 em ratos controles falso-operados (FO); antes (A) e após (B) a enterectomia de ratos submetidos à obstrução intestinal e isquemia (OI); ratos OI tratados com Ringer lactato (RL, 4 mL/kg, i.v., 2 horas após); ratos OI tratados com salina hipertônica 7,5% (SH, 4 mL/kg, i.v., 2 horas após). As amostras foram obtidas 24 e 48 horas após o início dos experimentos. Os valores representam a média $\pm$ epm para 5 ratos/grupo. * $p < 0,001$, † $p < 0,01$ por comparação ao grupo FO, § $p < 0,01$ por comparação ao grupo OI

Figura 9. Concentração sérica de CINC-2 em ratos controles falso-operados (FO); antes (A) e após (B) a enterectomia de ratos submetidos à obstrução intestinal e isquemia (OI); ratos OI tratados com Ringer lactato (RL, 4 mL/kg, i.v., 2 horas após); ratos OI tratados com salina hipertônica 7,5% (SH, 4 mL/kg, i.v., 2 horas após) e submetidos à enterectomia 24 horas após. As amostras foram obtidas 24 e 48 horas após o início dos experimentos. Os valores representam a média $\pm$ epm para 5 ratos/grupo. * $p < 0,001$, † $p < 0,05$ por comparação ao grupo FO, § $p < 0,01$, # $p < 0,05$ por comparação ao grupo OI.

Figura 10. Escore total de lesão histológica intestinal (A) e médias do escore de lesão intestinal para cada parâmetro avaliado, por grupo (B) em ratos controles falso-operados (FO); ratos submetidos à obstrução intestinal e isquemia (OI); ratos OI tratados com Ringer lactato (RL, 4 mL/kg, i.v., 2 horas após); ratos OI tratados com salina hipertônica 7,5% (SH, 4 mL/kg, i.v., 2 horas após). As amostras foram coletadas 24 horas após a enterectomia. Os valores representam a média ± epm para 5 ratos/grupo. * $p<0,001$, † $p<0,01$ por comparação aos grupo FO, § $p<0,05$ por comparação ao grupo RL

Figura 11. Concentração sérica de insulina em ratos controles falso-operados (FO); antes (A) e após (B) a enterectomia de ratos submetidos à obstrução intestinal e isquemia (OI); ratos OI tratados com Ringer lactato (RL, 4 mL/kg, i.v., 2 horas após); ratos OI tratados com salina hipertônica 7,5% (SH, 4 mL/kg, i.v., 2 horas após). As amostras foram obtidas 24 e 48 horas após o início dos experimentos. Os valores representam a média $\pm$ epm para 5 ratos/grupo. * $p < 0,05$ por comparação aos demais grupos.

Figura 12. Concentração sérica de corticosterona em ratos controles falso-operados (FO); antes (A) e após (B) a enterectomia de ratos submetidos à obstrução intestinal e isquemia (OI); ratos OI tratados com Ringer lactato (RL, 4 mL/kg, i.v., 2 horas após); ratos OI tratados com salina hipertônica 7,5% (SH, 4 mL/kg, i.v., 2 horas após). As amostras foram obtidas 24 e 48 horas após o início dos experimentos. Os valores representam a média $\pm$ epm para 5 ratos/grupo. * $p<0,001$, † $p<0,01$ por comparação aos grupos FO, § $p<0,05$ por comparação aos grupos OI, ‡ $p<0,001$ por comparação aos grupos OI e RL.

5. DISCUSSÃO

Os dados apresentados sugerem que animais submetidos à obstrução intestinal associada à isquemia apresentaram resultados, em boa parte, compatíveis com uma infecção bacteriana generalizada relacionada à SIRS. A introdução de tratamentos como o RL e SH determinaram melhora nos parâmetros gerais de avaliação da gravidade da sepse. A SH merece destaque na estabilização pré-operatória, pois permitiu melhor recuperação após a resolução cirúrgica do segmento intestinal obstruído e necrosado aumentando, substancialmente, a sobrevida dos animais.

Os animais dos quatro grupos apresentaram ganho de peso corpóreo ao longo de 15 dias de observação, sendo que os animais controles FO e aqueles tratados com SH e submetidos à enterectomia ganharam de 3 a 4 vezes mais peso que os animais submetidos à enterectomia sem tratamento ou tratados previamente com RL. A inanição pós-cirúrgica é um dos motivos principais para a redução do ganho ponderal dos animais. Porém, aqueles que foram tratados com SH e submetidos à enterectomia recuperaram-se do estado de catabolismo, característico do período pós-operatório inicial, apresentando ganho de peso semelhante aos ratos FO.

Como era de se esperar, as pressões arteriais médias dos grupos FO e OI se mantiveram aproximadamente iguais durante 140 minutos, uma vez que as medidas foram realizadas nas mesmas condições e não ocorreram perdas volumétricas expressivas decorrentes do procedimento cirúrgico.

Oscilações na aferição da pressão arterial foram observadas principalmente no grupo SH em relação aos demais e, também, no grupo RL, em menor escala. O fato é explicado pelas características dos tratamentos implicados nos dois grupos, sendo baseados na reposição de volume por via endovenosa, o que previsivelmente aumenta o conteúdo vascular em relação ao continente no momento da infusão, aumentando a pressão arterial. O incremento na pressão arterial no grupo SH, estatisticamente significativo em relação aos grupos FO e OI, ocorre não devido à quantidade de volume infundido durante o tratamento, mas às propriedades osmóticas da SH a qual atua, muito rapidamente, seqüestrando o volume intracelular para o intravascular (ROCHA E SILVA *et al.*, 1986; ROCHA E SILVA & POLI DE FIGUEIREDO, 2005) justificando-se, deste modo, o pico de pressão observado aos 5 minutos da infusão com SH. É interessante notar que a SH não só redistribui com eficiência os volumes corpóreos, mas também leva à redução do edema celular que ocorre em qualquer tipo de choque. Nesta situação, a hipóxia pela hipoperfusão determina menor atividade de bombas e canais de transporte ativo de íons do meio intracelular para o meio extracelular, o que leva ao edema da célula endotelial e ao prejuízo da microcirculação (MATTEUCCI *et al.*, 1993; KRAMER, 2003). A infusão de RL eleva, de maneira mais discreta, a pressão arterial pela expansão volumétrica intravascular direta em indivíduos normotensos (TØLLØFSRUD *et al.*, 1993). Assim, diferentemente da SH, o RL não atua redistribuindo os volumes dos diversos compartimentos corpóreos e não reduz o edema celular.

A translocação bacteriana intestinal é um fenômeno caracterizado pela passagem de bactérias viáveis ou suas toxinas do trato gastrointestinal para os linfonodos mesentéricos, fígado, baço e sangue (BERG & GARLINGTON, 1979). Diversos modelos têm sido empregados para estudar a TB, como a icterícia obstrutiva (DEITCH *et al.*, 1990), pancreatite (VAN MINNEN *et al.*, 2007), cirrose (WUEST & GARCIA-TSAO, 2005), modificação na flora intestinal (KOH *et al.*, 2002), isquemia e reperfusão intestinal (MOORE-OLUFEMI *et al.*, 2005), choque hemorrágico (HIRSH *et al.*, 2002) e obstrução intestinal (ANTEQUERA *et al.*, 2000; CEVIKEL *et al.*, 2004; OLIVEIRA *et al.*, 2006; SAMEL *et al.*, 2002). Neste estudo, comprovou-se a eficácia do modelo de translocação bacteriana em ratos submetidos à obstrução intestinal associada à isquemia, uma vez que a maioria dos resultados apresentados pelo grupo OI é compatível com uma situação de infecção sistêmica por enterobactérias da flora intestinal (principalmente *Escherichia coli*). A análise microbiológica merece destaque. A positividade para *E. coli* nos animais do grupo OI indica o sucesso do modelo para o estudo da translocação bacteriana. No entanto, é importante ressaltar a possibilidade da TB ser apenas um epifenômeno (MOORE, 1999; ALVERDY *et al.*, 2003), de modo que uma relação de causa/efeito entre a presença de bactérias gram-negativas em hemoculturas e outros tecidos parenquimatosos e a SIRS necessitaria ser comprovada.

MACFIE (2004) enfatiza a ocorrência de translocação bacteriana em humanos, sendo mais freqüente naqueles pacientes com obstrução intestinal ou imunossuprimidos. DEITCH (1989) demonstrou, em um estudo com 42

pacientes, a ocorrência de TB para LNM em 59% de 17 pacientes com obstrução intestinal simples, em comparação com 4% de 25 pacientes operados por outros motivos. SAGAR *et al.* (1995) observaram que a translocação de bactérias intestinais é mais frequente em pacientes com obstrução intestinal. Em um estudo com 927 pacientes cirúrgicos MACFIE *et al.* (2006) demonstraram a ocorrência de TB em 14% destes pacientes, e maior incidência de sepse pós-operatória nos pacientes com TB (42,3%) em comparação aos pacientes sem TB (19,9%). Em outro estudo clínico REDDY *et al.* (2007) confirmaram a ocorrência de TB em 9% de pacientes submetidos à ressecção colônica e demonstraram que estas bactérias translocadas fazem parte da microbiota normal. Em humanos, a identificação da TB se restringe à cultura dos LNM, naqueles pacientes submetidos à laparotomia (GATT *et al.*, 2007).

No presente estudo destaca-se diferença importante na magnitude da TB entre RL e SH. No grupo tratado com RL, um número massivo de unidades formadoras de colônia foi encontrado em amostras de diferentes tecidos, inclusive no sangue, situação muito semelhante à apresentada pelos animais do grupo OI. Isto confirma a ineficácia do RL como tratamento efetivo nos estados de choque e hipoperfusão, levando à disfunção da barreira intestinal. Por outro lado, a administração de solução SH duas horas após o processo de obstrução e isquemia intestinal mostrou-se bastante eficiente na contenção da TB. Segundo a análise microbiológica, a solução salina hipertônica reduziu a positividade para *E.coli* em amostras de fígado de 86% (OI) para 43% (SH), no baço de 86% (OI) para 58% (SH). No

sangue o grupo tratado com SH apresentou apenas 14% de bacteremia, contra 58% (OI) e 86% (RL). Além de menor incidência de culturas positivas para *E. coli*, o grupo SH apresentou significativa redução no número de unidades formadoras de colônia naquelas amostras que, eventualmente, foram contaminadas. Tal fato sugere atividade restritiva da SH sobre a translocação bacteriana e sobre a proliferação bacteriana em tecidos contaminados, melhorando a resposta imunológica. O efeito benéfico da salina hipertônica na TB reduziria o impacto da bacteremia, passo fundamental para a infecção de múltiplos órgãos e sistemas, para a gênese da SIRS e para a evolução fatal da sepse.

Quase todas as amostras do complexo linfonodal mesentérico (CLM) apresentaram positividade para *E. coli*, observando-se grande número de UFC tanto no grupo OI, como nos grupos tratados, RL e SH, considerando-se que os linfonodos regionais do CLM fazem parte do circuito imunológico natural responsivo a agressões locais.

Variáveis sistêmicas também foram avaliadas durante o período de estudo. A oxigenação global não se alterou nos grupos OI, RL e SH. Houve um aumento considerável no pH sanguíneo, associado a uma diminuição da pressão parcial de CO_2 , provavelmente em decorrência de uma alcalose respiratória com hiperventilação (idéia reforçada pelos baixos valores de PaCO_2), o que corrigiu e excedeu a acidose metabólica por lactato (Ânion gap positivo), a qual se instala caracteristicamente na sepse aguda, resultando em valores superiores de pH sanguíneo. A medida do lactato sanguíneo é um importante parâmetro na avaliação do sofrimento tecidual

por hipoperfusão e/ou hipóxia (VALENZA *et al.*, 2005). Como apresentado, os animais do grupo OI apresentaram lactato sérico elevado no período de 24 horas após o procedimento cirúrgico inicial, assim como os grupos RL e SH, embora em menores proporções. A hipoperfusão do território intestinal é, provavelmente, o maior responsável pela elevação do lactato sanguíneo. A isquemia leva, conseqüentemente, à hipóxia celular e metabolismo anaeróbio que gera, entre outros compostos, o lactato. Nos casos de sepse grave, ocorre choque por vasodilatação sistêmica que cursa com hipotensão arterial e hipoperfusão, fazendo com que o lactato seja, também, oriundo de diversos outros tecidos comprometidos (HOTCHKISS & KARL, 2003). A infusão de SH no tratamento dos animais OI mostrou-se altamente eficaz na redução das concentrações séricas de lactato. O mesmo efeito não foi observado com a infusão de RL. A redistribuição do fluxo sanguíneo e não apenas a reposição de volume, provocada pela SH, determina uma melhor perfusão tecidual e menor edema celular (ROCHA E SILVA & POLI DE FIGUEIREDO, 2005), diminuindo a hipóxia e, conseqüentemente, a produção de lactato pelo metabolismo anaeróbio. A hiperpotassemia do grupo OI, após 24 horas, pode estar associada à acidose sanguínea, redução no pH provocada pelo aumento do lactato sérico, neste caso. Os grupos submetidos aos tratamentos com RL e SH tiveram, ambos, a reversão da hiperpotassemia, provavelmente devido à melhora das outras variáveis como pH e P_aCO_2 . Estes parâmetros normalizaram-se 24 horas após a ressecção do segmento intestinal necrosado.

A hiperglicemia de estresse é um achado comum em pacientes graves, estando associada a alta mortalidade (BAGSHAW *et al.*, 2009). O estado catabólico do período pós-cirúrgico (24 horas), caracterizado pelo aumento de processos como a glicogenólise e a neoglicogênese, entre outros, pode ser a causa da hiperglicemia observada nos grupos OI, RL e SH. O estresse associado ao doente grave é caracterizado pela ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, com liberação de cortisol pela glândula adrenal (MARICK & ZALOGA, 2002). Além do mais, há uma intensa liberação de catecolaminas e glucagon nestes pacientes (MARICK & RAGHAVAN, 2004). A resistência à insulina também pode estar presente (LI & MESSINA, 2009) e sabe-se que a própria sepse e outras doenças graves levam a estados hiperglicêmicos tóxicos para as células de diversos tecidos, cujos mecanismos ainda não foram completamente elucidados. Os tratamentos com RL e SH associados à enterectomia normalizaram a glicemia e a insulinemia e, particularmente o tratamento com SH normalizou os níveis séricos de corticosterona, sugerindo uma diminuição do estresse catabólico pós trauma cirúrgico. Além do mais, deve-se considerar que o trato gastrointestinal produz hormônios potencializadores da secreção de insulina no período pós-prandial, denominados incretinas, dentre os quais se destacam o *glucose-dependent insulintropic polypeptide* (GIP) e o *glucagon-like peptide-1* (GLP-1) (DEACON, 2005). Na sepse grave, caracterizada por uma resposta de estresse com elevados níveis plasmáticos de catecolaminas (GROVES *et al.*, 1973; WADDELL *et al.*, 1992; DÜNSER & HASIBEDER, 2009), a secreção das incretinas poderia

estar diminuída em decorrência de uma prevalência da atividade simpática sobre a atividade parassimpática. Dão suporte a esta hipótese evidências experimentais sobre o papel do nervo vago mediando a secreção de GIP e GLP-1 pelo intestino delgado do rato (DUMOULIN *et al.*, 1995; HERRMANN-RINKE *et al.*, 1995; ROCCA & BRUBAKER, 1999). Além da reposição de volume com colóides e cristalóides como o RL, o tratamento clínico da sepse inclui a insulinoterapia, visando a correção cuidadosa e rápida dos níveis glicêmicos do paciente (VAN DEN BERGHE *et al.*, 2001; DELLINGER *et al.*, 2008).

Disfunção orgânica seguida de falência de múltiplos órgãos ocorre com frequência em pacientes sépticos. Embora não totalmente esclarecidos, os mecanismos que delineiam estes processos iniciam-se por alterações no fluxo sanguíneo microvascular e oxigenação dos tecidos (VINCENT & DE BACKER, 2005). A vasoconstrição esplâncnica após o choque hemorrágico ou durante a redistribuição do fluxo sanguíneo no choque séptico são causas de hipoperfusão esplâncnica, levando à isquemia da mucosa e comprometendo a função da barreira intestinal (POLI DE FIGUEIREDO *et al.*, 2002; SILVA *et al.*, 2002). Na sepse grave experimental por infusão endovenosa de *E. coli* viva, a ressuscitação com grandes volumes de RL não tem efeito protetor sobre a mucosa intestinal (LAGOA *et al.*, 2004). Sobre as alterações metabólicas e cardiovasculares, como o débito cardíaco, hipotensão e hipoperfusão esplâncnica, o efeito do RL é parcial e transitório (GARRIDO *et al.*, 2006).

O papel crucial das interações dos leucócitos com as células endoteliais é enfatizado pelos efeitos benéficos das intervenções terapêuticas que agem nesse nível (HOTCHKISS & KARL, 2003). Durante a resposta inflamatória, os leucócitos rolam ao longo do endotélio de vênulas pós-capilares e aderem-se firmemente à parede vascular antes de migrarem para os tecidos. Disfunções microcirculatórias foram demonstradas *in vivo* por microscopia intravital (MIV), em modelos experimentais de sepse (SCHIMIDT *et al.*, 1996; SMALLEY *et al.*, 2000; NAKAGAWA *et al.*, 2006). Em modelo de isquemia e reperfusão regional, após analisar a microvasculatura intestinal, BOYD *et al.* (1994) observaram um grande acúmulo de leucócitos na mucosa, sendo que a maioria das células estão presentes na cripta, comparado à serosa e ao mesentério. Em modelo de sepse normotensiva, induzida por ligadura e punção cecal (CLP) em ratos, FARQUHAR *et al.* (1996) demonstraram redução no número de capilares perfundidos na mucosa do intestino delgado. Outro estudo (LEHMANN *et al.*, 2006), em modelo de peritonite em ratos, demonstrou um aumento no número de leucócitos aderidos a vênulas da submucosa intestinal e diminuição na densidade funcional de capilares da parede intestinal. NAKAGAWA *et al.* (2007) demonstraram que o número de leucócitos *rollers*, aderidos ao endotélio venular e migrados para o espaço extravascular, na microcirculação mesentérica, aumenta significativamente 24 após a indução de sepse por CLP em ratos.

No presente estudo, ratos com 24 horas de evolução da obstrução intestinal estrangulada apresentaram intensa reação inflamatória na

microcirculação mesentérica, evidenciada pelo grande número de leucócitos *rollers* e aderidos à parede venular e migrados para o espaço extravascular. Tais alterações são condizentes com a disfunção microcirculatória que acompanha a sepse e culmina na falência de órgãos.

Embora não tenha sido possível, neste momento, avaliar o efeito dos tratamentos sobre a resposta da microcirculação mesentérica pela técnica de MIV, a quantificação da expressão de moléculas de adesão P-selectina e ICAM-1 na microcirculação mesentérica comprovou as propriedades protetoras da SH, levando à regulação negativa dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos na migração de leucócitos do sangue para os tecidos. A análise da microvasculatura do grupo RL mostrou, pelo contrário, aumento na expressão de ambas moléculas de adesão. Este resultado sugere não só que o RL é ineficaz no tratamento da sepse, mas também que os efeitos desta solução podem ser deletérios para os diversos tecidos corpóreos, o que facilitaria a evolução da sepse grave para a insuficiência de múltiplos órgãos. Além do mais, os resultados obtidos mostram extrema concordância com as alterações microbiológicas teciduais discutidas até então.

Mesmo após a ressecção do segmento intestinal necrosado, que representa o tratamento definitivo para a obstrução intestinal estrangulada (POGETTI *et al.*, 2004), o comportamento leucocitário na microcirculação mesentérica mostrou-se alterado. Em 24 horas de evolução pós-enterectomia, ratos OI sem tratamento exibiram, ainda, marcado aumento no número de leucócitos *rollers*, aderidos ao endotélio e migrados para o

espaço extravascular. Em concordância com os resultados das outras análises, pode-se observar que o tratamento com RL é tão prejudicial quanto a ausência de qualquer tratamento. A solução hipertônica, no entanto, mostrou-se eficaz na redução da resposta inflamatória a nível microcirculatório, reduzindo as interações leucócito-endotélio aos valores observados no grupo controle FO. Em estudo sobre choque séptico induzido por peritonite em ratos, observou-se que a SH é capaz de prevenir a falência circulatória e a insuficiência orgânica, diminuindo a mortalidade dos animais (SHIH *et al.*, 2008).

Durante a reação inflamatória, a ativação e o recrutamento de leucócitos para os tecidos agredidos são dependentes da produção e liberação de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas (SPRINGER, 1994; LUSTER, 1998). Citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α e IL-1 β , liberadas no início da sepse, têm um papel importante no desenvolvimento do choque séptico e disfunção orgânica (BOZZA *et al.*, 2007). No presente estudo não foi possível detectar a presença das citocinas TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10 após 24 ou 48 horas da OI e da enterectomia, visto que estas citocinas apresentam um pico de secreção precoce, poucas horas após a agressão. Na análise de CINC-1 e CINC-2 (família da IL-8) observamos que após 24 ou 48 horas da OI e da enterectomia houve aumento expressivo na concentração destas quimiocinas. O tratamento dos animais com SH reduziu, de forma significativa, as concentrações de CINC-1 e CINC-2 após a OI e associado ao tratamento cirúrgico normalizou estes valores. Os efeitos benéficos tardios da SH têm sido relacionados à atividade anti-

inflamatória e imunomoduladora (POLI DE FIGUEIREDO *et al.*, 2006). Tais benefícios, a longo prazo, têm relevância para o manejo da sepse grave e do choque séptico (OLIVEIRA *et al.*, 2002). Estudos em modelo de choque hemorrágico demonstraram que ratos tratados com SH exibem redução na síntese e liberação de citocinas e quimiocinas (DEREE *et al.*, 2007a,b)

A consequência mais grave no curso da sepse é, sem dúvida, a disfunção e falência orgânica (VINCENT *et al.* 2007). A insuficiência renal aguda (IRA) está entre as complicações mais graves, por perturbar o metabolismo e limitar a escolha das medidas de suporte aos pacientes (WAN *et al.*, 2003). Embora os mecanismos exatos envolvidos na IRA durante a sepse ainda não estejam totalmente elucidados, as alterações hemodinâmicas que levam à hipoperfusão renal – vasodilatação sistêmica e vasoconstrição renal – são importantes (EL-ACHKAR *et al.*, 2008). Além disso, a ativação da cascata da coagulação induz a formação de microtrombos (COHEN, 2002). Juntos, estes fatores resultam em lesão renal isquêmica (SCHRIER & WANG, 2004). Pacientes com infecção bacteriana extra-hepática e sepse frequentemente apresentam colestase. Os achados laboratoriais comuns a estes pacientes incluem elevação na atividade sérica da FA e ALT, e hiperbilirrubinemia (SHIMIZU, 2008). Um estudo em 156 pacientes com bacteremia demonstrou que há aumento significativo na atividade das enzimas gama-glutamil-transpeptidase e fosfatase alcalina, e na concentração total de bilirrubinas nestes pacientes (KANAI *et al.*, 2008).

Com o objetivo de estudar as alterações que a obstrução intestinal e isquemia podem provocar em órgãos distantes – particularmente rim e

fígado – e como os tratamentos com RL ou SH podem interferir sobre estas alterações, procedemos à determinação da atividade de enzimas hepáticas e da concentração de algumas substâncias no soro dos animais, em 24 horas de evolução pós-obstrução e em 24 horas de evolução pós-enterectomia. Numa primeira análise, 24 horas pós-obstrução intestinal, um quadro compatível com lesão renal aguda se mostrou de forma clara através dos elevados níveis séricos de uréia e creatinina (ZAPPITELLI, 2008), observados nos ratos OI por comparação aos controles FO. A lesão hepática também pôde ser evidenciada no grupo OI, através do aumento da atividade das enzimas hepáticas ALT, AST e FA no soro destes animais. Uma das possíveis causas do aumento nestes valores seria a própria desidratação, onde a perda de líquido do espaço intravascular resultaria no aumento da concentração dos solutos ali presentes, fato que pode ser descartado em virtude dos valores normais do hematócrito. Nesta fase, ambos os tratamentos, RL ou SH, reduziram a lesão hepática, marcada pela diminuição da atividade sérica das enzimas analisadas em comparação ao grupo OI. Sobre a função renal, enquanto os tratamentos com RL ou SH reduziram as concentrações séricas de creatinina, a SH também se mostrou eficaz na redução da uréia sérica.

Mesmo após a enterectomia o perfil bioquímico dos animais OI é marcado por azotemia e atividade aumentada das enzimas hepáticas AST, FA e LDH. Corroborando com o fato de que o tratamento com RL pode ser deletério para os diversos tecidos corpóreos, observamos que a lesão hepática persiste após a enterectomia nos animais tratados com RL. Além

disso, a elevação da concentração sérica de creatinina sugere a instalação de disfunção renal.

Os resultados do tratamento com SH só reforçam suas propriedades protetoras – agora sobre os tecidos hepático e renal – onde, à exceção da enzima hepática AST, todos os demais parâmetros se normalizaram.

Algumas hipóteses acerca dos prejuízos sistêmicos causados pelo RL podem ser compreendidas com o auxílio de outros modelos animais. Estudos recentes em porcos mostraram que a utilização de RL como fluido de reposição leva a danos a nível tecidual principalmente pela baixa osmolaridade desta solução. A hiposmolaridade seria deletéria por dois mecanismos principais: edema intersticial e hemodiluição. O edema intersticial piora diretamente a função de muitos órgãos, principalmente o coração e pulmões através, respectivamente, da desorganização de miofibrilas contráteis e de edema pulmonar (OTSUKI *et al.*, 2006). A hemodiluição leva a menor concentração de hemácias por volume de sangue, favorecendo a hipóxia, o aumento do lactato sanguíneo e a acidose sistêmica (OTSUKI *et al.*, 2006).

Em suma, pôde-se observar que o tratamento baseado na infusão de SH (2400 mOsm/l de NaCl 7,5%) se mostrou bastante efetivo na estabilização de ratos submetidos à obstrução intestinal e isquemia, reduzindo a incidência da sepse grave e de suas complicações. O estudo das interações leucócito-endotélio, bem como da expressão das moléculas de adesão P-selectina e ICAM-1, em vasos da microcirculação mesentérica,

e o estudo das quimiocinas no soro ressaltam os efeitos benéficos do tratamento com SH pela ação antiinflamatória e inibição da translocação bacteriana. A elevada sobrevida (86%) observada nos animais tratados com SH e submetidos à enterectomia, associada à melhor recuperação pós-operatória e à contenção da disfunção hepática e renal, comprovam a superioridade do tratamento com SH, frente ao tratamento convencional com RL.

6. CONCLUSÕES

Com base nos resultados apresentados, conclui-se que:

1. O tratamento com solução salina hipertônica (NaCl 7,5%) foi eficiente na contenção da translocação bacteriana no curso da obstrução intestinal e isquemia.
2. A estabilização com solução hipertônica associada à enterectomia em ratos submetidos à obstrução intestinal e isquemia resultou na redução da resposta inflamatória local, atenuando as interações leucócito-endotélio e a expressão de moléculas de adesão na microcirculação mesentérica e a lesão intestinal, e sistêmica, reduzindo os níveis séricos de CINC-1 e CINC-2 e a disfunção renal e hepática.
3. A estabilização pré-operatória com solução hipertônica associada à enterectomia aumentou substancialmente a sobrevida de ratos com obstrução intestinal e isquemia.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVERDY, J.C.; LAUGHLIN, R.S.; WU, L. Influence of the critically ill state on host-pathogen interactions within the intestine: gut-derived sepsis redefined. *Crit. Care Med.*, 31:598-607, 2003.
- ANTEQUERA, R.; BRETANA, A.; CIRAC, A.; BRITO, A.; ROMERA, M.A.; ZAPATA, R. Disruption of the intestinal barrier and bacterial translocation in an experimental model of intestinal obstruction. *Acta Científica Venezolana*, 51:18-26, 2000.
- BAGSHAW, S.M.; EGI, M.; GEORGE, C.; BELLOMO, R.; AUSTRALIA NEW ZEALAND INTENSIVE CARE SOCIETY DATABASE MANAGEMENT COMMITTEE. Early blood glucose control and mortality in critically ill patients in Australia. *Crit. Care. Med.*, 37:463-70, 2009.
- BALZAN, S.; DE ALMEIDA QUADROS, C.; DE CLEVA, R.; ZILBERSTEIN, B.; CECCONELLO, I. Bacterial translocation: overview of mechanisms and clinical impact. *J. Gastroenterol. Hepatol.*, 22:464-71, 2007.
- BERG, R.D.; GARLINGTON, A.W. Translocation of certain indigenous bacteria from the gastrointestinal tract to the mesenteric lymph nodes and other organs in a gnotobiotic mouse model. *Infect. Immun.*, 23:403-11, 1979.

- BLATTEIS, C.M.; LI, S.; LI, Z.; FELEDER, C.; PERLIK, V. Cytokines, PGE2 and endotoxic fever: a re-assessment. *Prostaglandins Other Lipid. Mediat.* 76:1-18, 2005.
- BOYD, A.J.; SHERMAN, I.A.; SAIBIL, F.G. Intestinal microcirculation and leukocyte behavior in ischemia-reperfusion injury. *Microvasc. Res.*, 47:355-68, 1994.
- BOZZA, F.A.; SALLUH, J.I.; JAPIASSU, A.M.; SOARES, M.; ASSIS, E.F.; GOMES, R.N.; BOZZA, M.T.; CASTRO-FARIA-NETO, H.C.; BOZZA, P.T. Cytokine profiles as markers of disease severity in sepsis: a multiplex analysis. *Crit. Care*, 11:R49, 2007.
- CEVIKEL, M.H.; OZGUN, H.; BOYLU, S.; DEMIRKIRAN, A.E.; AYDIN, N.; SARI, C. C-reactive protein may be a marker of bacterial translocation in experimental intestinal obstruction. *ANZ J. Surg.*, 74:900-4, 2004.
- COHEN, J. The immunopathogenesis of sepsis. *Nature*. 420:885-91, 2002.
- COIMBRA, R.; JUNGER, W.G.; LIU, F.C.; LOOMIS, W.H.; HOYT, D.B. Hypertonic/hyperoncotic fluids reverse prostaglandin E2 (PGE2)-induced T-cell suppression. *Shock*, 4:45-9, 1995.
- COIMBRA, R.; JUNGER, W.G.; HOYT, D.B.; LIU, F.C.; LOOMIS, W.H.; EVERS, M.F. Hypertonic saline resuscitation restores hemorrhage-induced immunosuppression by decreasing

prostaglandin E2 and interleukin-4 production. *J. Surg. Res.*, 64:203-9, 1996.

COIMBRA, R.; PORCIDES, R.; LOOMIS, W.; MELBOSTAD, H.; LALL, R.; DERE, J.; WOLF, P.; HOYT, D.B. HSPTX protects against hemorrhagic shock resuscitation-induced tissue injury: an attractive alternative to Ringer's lactate. *J. Trauma*, 60:41-51, 2006.

DEACON, C.F. What do we know about the secretion and degradation of incretin hormones? *Regul. Pept.*, 15;128:117-24, 2005.

DE GROOT, H.; RAUEN, U. Ischemia-reperfusion injury: processes in pathogenetic networks: a review. *Transplant. Proc.*, 39:481-4, 2007.

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

DEITCH, E.A.; SITTIG, K.; LI, M.; BERG, R.; SPECIAN, R.D. Obstructive jaundice promotes bacterial translocation from the gut. *Am. J. Surg.*, 159:79-84, 1990.

DELLINGER, R.P.; LEVY, M.M.; CARLET, J.M.; *et al.* Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2008. *Crit. Care Med.*, 36:296-327, 2008.

DEREE, J.; MARTINS, J.O.; LEEDOM, A.; LAMON, B.; PUTNAM, J.;
DE CAMPOS, T.; HOYT, D.B.; WOLF, P.; COIMBRA, R.
Hypertonic saline and pentoxifylline reduces hemorrhagic shock
resuscitation-induced pulmonary inflammation through attenuation
of neutrophil degranulation and proinflammatory mediator
synthesis. *J. Trauma*, 62:104-11, 2007a.

DEREE, J.; DE CAMPOS, T.; SHENVI, E.; LOOMIS, W.H.; HOYT,
D.B.; COIMBRA, R. Hypertonic saline and pentoxifylline
attenuates gut injury after hemorrhagic shock: the kinder, gentler
resuscitation. *J. Trauma*, 62:818-27, 2007b.

DUMOULIN, V.; DAKKA, T.; PLAISANCIE, P.; CHAYVIALLE, J.A.;
CUBER, J.C. Regulation of glucagon-like peptide-1-(7-36) amide,
peptide YY, and neurotensin secretion by neurotransmitters and
gut hormones in the isolated vascularly perfused rat ileum.
Endocrinology, 136:5182-8, 1995.

DÜNSER, M.W.; HASIBEDER, W.R. Sympathetic overstimulation
during critical illness: adverse effects of adrenergic stress. *J.*
Intensive Care Med., 24:293-316, 2009.

EL-ACHKAR, T.M.; HOSEIN, M.; DAGHER, P.C. Pathways of renal
injury in systemic gram-negative sepsis. *Eur. J. Clin. Invest.* 38
Suppl 2:39-44, 2008.

- ESPER, A.M.; MOSS, M.; LEWIS, C.A.; NISBET, R.; MANNINO, D.M.; MARTIN, G.S. The role of infection and comorbidity: Factors that influence disparities in sepsis. *Crit. Care Med.*, 34:2576-82, 2006.
- FARQUHAR, I.; MARTIN, C.M.; LAM, C.; POTTER, R.; ELLIS, C.G.; SIBBALD, W.J. Decreased capillary density in vivo in bowel mucosa of rats with normotensive sepsis. *J. Surg. Res.*, 61:190-6, 1996.
- FELIPPE, J. JR.; TIMONER, J.; VELASCO, I.T.; LOPES, O.U.; ROCHA E SILVA, M. Treatment of refractory hypovolaemic shock by 7.5% sodium chloride injections. *Lancet*, 316:1002-4, 1980.
- GARRIDO, A. DEL P.; CRUZ JUNIOR, R.J.; POLI DE FIGUEIREDO, L.F.; ROCHA E SILVA, M. Small volume of hypertonic saline as the initial fluid replacement in experimental hypodynamic sepsis. *Crit. Care*, 10:R62, 2006.
- GATT, M.; REDDY, B.S.; MACFIE, J. Review article: bacterial translocation in the critically ill--evidence and methods of prevention. *Aliment. Pharmacol. Ther.*, 25:741-57, 2007.
- GROVES, A.C.; GRIFFITHS, J.; LEUNG, F.; MEEK, R.N. Plasma catecholamines in patients with serious postoperative infection. *Ann. Surg.*, 178:102-7, 1973.

- HAYANGA, A.J.; BASS-WILKINS, K.; BULKLEY, G.B. Current management of small-bowel obstruction. *Adv. Surg.*, 39:1-33, 2005.
- HERRMANN-RINKE, C.; VÖGE, A.; HESS, M.; GÖKE, B. Regulation of glucagon-like peptide-1 secretion from rat ileum by neurotransmitters and peptides. *J. Endocrinol.*, 147:25-31, 1995.
- HIRSH, M.; DYUGOVSKAYA, L.; BASHENKO, Y.; KRAUSZ, M.M. Reduced rate of bacterial translocation and improved variables of natural killer cell and T-cell activity in rats surviving controlled hemorrhagic shock and treated with hypertonic saline. *Crit. Care. Med.*, 30:861-7, 2002.
- HOTCHKISS, R.S.; KARL, I.E. The pathophysiology and treatment of sepsis. *N. Engl. J. Med.*, 348:138-50, 2003.
- KANAI, S.; HONDA, T.; UEHARA, T.; MATSUMOTO, T. Liver function tests in patients with bacteremia. *J. Clin. Lab. Anal.*, 22:66-9, 2008.
- KOH, I.H.; MENCHACA-DIAZ, J.L.; FARSKY, S.H.P.; SIQUEIRA, A.F.R.S.; RUIZ-SILVA, M.; JULIANA, P. Injuries to the Mesenteric Microcirculation Due to Bacterial Translocation. *Transplant. Proc.*, 34:1003-4, 2002.
- KRAMER, G.C. Hypertonic resuscitation: physiologic mechanisms and recommendations for trauma care. *J. Trauma*, 54:S89-99, 2003.

- LAGOA, C.E.; POLI DE FIGUEIREDO, L.F.; CRUZ, R.J. JR; SILVA, E.; ROCHA E SILVA, M. Effects of volume resuscitation on splanchnic perfusion in canine model of severe sepsis induced by live *Escherichia coli* infusion. *Crit. Care*, 8:R221-8, 2004.
- LEHMANN, C.; BAC, V.H.; PAVLOVIC, D.; LUSTIG, M.; MAIER, S.; FEYERHERD, F. Metronidazole improves intestinal microcirculation in septic rats independently of bacterial burden. *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 34:427-38, 2006.
- LI, L.; MESSINA, J.L. Acute insulin resistance following injury. *Trends Endocrinol. Metab.*, 20:429-35, 2009.
- LOPES FILHO, G.J.; FERRARO, J.R. "Abdome Agudo Obstrutivo". In: LOPES, A.C.; REIBSCHEID, S.; SZEJNFELD, J. *Abdome Agudo: Clínica e Imagem*. 1ª ed., São Paulo: Atheneu, 2004. p.111-28.
- LUSTER, A.D. Chemokines--chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N. Engl. J. Med.*, 338:436-45, 1998.
- MACFIE, J.; O'BOYLE, C.; MITCHELL, C.J.; BUCKLEY, P.M.; JOHNSTONE, D.; SUDWORTH, P. Gut origin of sepsis: a prospective study investigating associations between bacterial translocation, gastric microflora, and septic morbidity. *Gut*, 45:223-8, 1999.
- MACFIE J. Current status of bacterial translocation as a cause of surgical sepsis. *Br. Med. Bull.*, 71:1-11, 2004.

- MACFIE, J.; REDDY, B.S.; GATT, M.; JAIN, P.K.; SOWDI, R.; MITCHELL, C.J. Bacterial translocation studied in 927 patients over 13 years. *Br. J. Surg.*, 93:87-93, 2006.
- MALLICK, I.H.; YANG, W.; WINSLET, M.C.; SEIFALIAN, A.M. Ischemia-reperfusion injury of the intestine and protective strategies against injury. *Dig. Dis. Sci.*, 49:1359-77, 2004.
- MARIK, P.E.; ZALOGA, G.P. Adrenal insufficiency in the critically ill: a new look at an old problem. *Chest*, 122:1784-96, 2002.
- MARIK, P.E.; RAGHAVAN, M. Stress-hyperglycemia, insulin and immunomodulation in sepsis. *Intensive Care. Med.*, 30:748-56, 2004.
- MATTEUCCI, M.J.; WISNER, D.H.; GUNTHER, R.A.; WOOLLEY, D.E. Effects of hypertonic and isotonic fluid infusion on the flash evoked potential in rats: hemorrhage, resuscitation, and hypernatremia. *J. Trauma*, 34:1-7, 1993.
- MAYEUX, P.R. Pathobiology of Lipopolysaccharide. *J. Tox. Env. Health*, 51:415-35, 1997.
- MOORE, F.A. The role of the gastrointestinal tract in postinjury multiple organ failure. *Am. J. Surg.*, 178:449-53, 1999.
- MOORE-OLUFEMI, S.D.; KOZAR, R.A.; MOORE, F.A.; SATO, N.; HASSOUN, H.T.; COX JR, C.S. Ischemic preconditioning protects

against gut dysfunction and mucosal injury after ischemia/reperfusion injury. *Shock*, 23:258-63, 2005.

NAKAGAWA, N.K.; NOGUEIRA, R.A.; CORREIA, C.J.; SHIWA, S.R.; CRUZ, J.W.M.C.; POLI DE FIGUEIREDO, L.F.; ROCHA E SILVA, M.; SANNOMIYA, P. Leukocyte-endothelium interactions after hemorrhagic shock/reperfusion and cecal ligation/puncture: an intravital microscopic study in rat mesentery. *Shock*, 26:180-6, 2006.

NAKAGAWA, N.K.; JUKEMURA, J.; AIKAWA, P.; NOGUEIRA, R.A.; POLI DE FIGUEIREDO, L.F.; SANNOMIYA, P. In vivo observation of mesenteric leukocyte-endothelial interactions after cecal ligation/puncture and surgical sepsis source control. *Clinics*, 62:321-6, 2007.

OLIVEIRA, R.P.; VELASCO, I.; SORIANO, F.; FRIEDMAN, G. Clinical review: Hypertonic saline resuscitation in sepsis. *Crit. Care*, 6:418-23, 2002.

OLIVEIRA, M.A.; LEMOS, D.S.; DINIZ, S.O.; COELHO, J.V.; CARDOSO, V.N. Prevention of bacterial translocation using glutamine: a new strategy of investigation. *Nutrition*, 22:419-24, 2006.

OTSUKI, D.A.; FANTONI, D.T.; MARGARIDO, C.B.; MARUMO, C.K.; INTELIZANO, T.; PASQUALUCCI, C.A.; COSTA AULER, J.O. Jr.

Hydroxyethyl starch is superior to lactated Ringer as a replacement fluid in a pig model of acute normovolaemic haemodilution. *Br. J. Anaesth.*, 98:29-37, 2006.

POGETTI, R.S.; PORTA, R.M.P.; FONTES, B. "Obstrução". In: GAMA-RODRIGUES, J.J.; DEL GRANDE, J.C.; MARTINEZ, J.C. *Tratado de Clínica Cirúrgica do Sistema Digestório*. 2ª ed., São Paulo: Atheneu, 2004. p.1159-70.

POLI DE FIGUEIREDO, L.F.; SILVA, E.; CRUZ, R.J. Jr; ROCHA E SILVA, M. Gas tonometry for evaluation of gastrointestinal mucosal perfusion. Experimental models of trauma, shock and complex surgical maneuvers – Part 1. *Acta Cir. Bras.*, 17:211-9, 2002

POLI DE FIGUEIREDO, L.F.; CRUZ, R.J. 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*, 6:201-6, 2006.

REDDY, B.S.; MACFIE, J.; GATT, M.; MACFARLANE-SMITH, L.; BITZOPOULOU, K.; SNELLING, A.M. Commensal bacteria do translocate across the intestinal barrier in surgical patients. *Clin. Nutr.*, 26:208-15, 2007.

RIZOLI, S.B.; KAPUS, A.; FAN, J.; LI, Y.H.; MARSHALL, J.C.; ROTSTEIN, O.D. Immunomodulatory effects of hypertonic

resuscitation on the development of lung inflammation following hemorrhagic shock. *J. Immunol.*, 161:6288-96, 1998.

ROCCA, A.S.; BRUBAKER, P.L. Role of the vagus nerve in mediating proximal nutrient-induced glucagon-like peptide-1 secretion. *Endocrinology*, 140:1687-94, 1999.

ROCHA E SILVA, M.; NEGRAES, G.; SOARES, A.M.; PONTIERI, V.; LOPPNOW, L. Hypertonic resuscitation from severe hemorrhagic shock: patterns of regional circulation. *Circulatory Shock*, 19: 165-175, 1986.

ROCHA E SILVA, M.; POLI DE FIGUEIREDO, L.F. Small volume hypertonic resuscitation of circulatory shock. *Clinics*, 60:159-72, 2005.

SAGAR, P.M.; MACFIE, J.; SEDMAN, P.; MAY, J.; MANCEY-JONES, B.; JOHNSTONE, D. Intestinal obstruction promotes gut translocation of bacteria. *Dis. Colon Rectum*, 38:640-4, 1995.

SAMEL, S.; KEESE, M.; KLECZKA, M.; LANIG, S.; GRETZ, N.; HAFNER, M. Microscopy of bacterial translocation during small bowel obstruction and ischemia in vivo--a new animal model. *BMC Surg.*, 2:6, 2002.

SCHMIDT, H.; SECCHI, A.; WELLMANN, R.; BACH, A.; BÖHRER, H.; GEBHARD, M.M. Effect of endotoxemia on intestinal villus microcirculation in rats. *J. Surg. Res.*, 61:521-26, 1996.

SCHRIER, R.W.; WANG, W. Acute renal failure and sepsis. *N Engl J Med.* 351:159-69, 2004.

SHIH, C.; CHEN, S.; CHEN, A.; WU, J.Y.; LIAW, W.J.; WU, C.C. Therapeutic effects of hypertonic saline on peritonitis-induced septic shock with multiple organ dysfunction syndrome in rats. *Crit. Care. Med.*, 36:1864-1872, 2008.

SHIMIZU, Y. Liver in systemic disease. *World J. Gastroenterol.*, 14:4111-9, 2008.

SILVA, E.; POLI DE FIGUEIREDO, L.F.; CRUZ, R.J. Jr; ROCHA E SILVA, M. Gas tonometry for evaluation of gastrointestinal mucosal perfusion. Experimental and clinical sepsis – Part 2. *Acta Cir. Bras.*, 17:281-8, 2002

SMALLEY, D.M.; CHILDS, E.W.; CHEUNG, L.Y. The local effect of PAF on leukocyte adherence to small bowel mesenteric venules following intra-abdominal contamination. *Inflammation*, 24:399-410, 2000.

SPRINGER, T.A. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell*, 76:301-14, 1994.

STAUDENMAYER, K.L.; MAIER, R.V.; JELACIC, S.; BULGER, E.M. Hypertonic saline modulates innate immunity in a model of systemic inflammation. *Shock*, 23:459-63, 2005.

- TØLLØFSRUD, S.; BJERKELUND, C.E.; KONGSGAARD, U.; HALL, C.; NODDELAND, H. Cold and warm infusion of Ringer's acetate in healthy volunteers: the effects on haemodynamic parameters, transcapillary fluid balance, diuresis and atrial peptides. *Acta Anaesthesiol. Scand.*, 37:768-73, 1993.
- VALENZA, F.; ALETTI, G.; FOSSALI, T.; CHEVALLARD, G.; SACCONI, F.; IRACE, M.; GATTINONI, L. Lactate as a marker of energy failure in critically ill patients: hypothesis. *Crit. Care*, 9:588-93, 2005.
- VAN DEN BERGHE, G.; WOUTERS, P.; WEEKERS, F.; VERWAEST, C.; BRUYNINCKX, F.; SCHETZ, M.; VLASSELAERS, D.; FERDINANDE, P.; LAUWERS, P.; BOUILLON, R. Intensive insulin therapy in critically ill patients. *N. Engl. J. Med.*, 345: 1359-1367, 2001.
- VAN MINNEN, L.P.; TIMMERMAN, H.M.; LUTGENDORFF, F.; VERHEEM, A.; HARMSSEN, W.; KONSTANTINOV, S.R. Modification of intestinal flora with multispecies probiotics reduces bacterial translocation and improves clinical course in a rat model of acute pancreatitis. *Surgery*, 141:470-80, 2007.
- VELASCO, I.T.; PONTIERI, V.; ROCHA E SILVA, M.; LOPES, O.U. Hyperosmotic NaCl and severe hemorrhagic shock. *Am. J. Physiol.*, 239:H664-73, 1980.

VINCENT, J.L.; DE BACKER, D. Microvascular dysfunction as a cause of organ dysfunction in severe sepsis. *Crit. Care*, 9(Suppl. 4):S9-12, 2005.

VINCENT, J.L.; TACCONE, F.; SCHMIT, X. Classification, incidence, and outcomes of sepsis and multiple organ failure. *Contrib. Nephrol.*, 156:64-74, 2007.

VINTEN-JOHANSEN, J.; JIANG, R.; REEVES, J.G.; MYKYTENKO, J.; DENEVE, J.; JOBE, L.J. Inflammation, proinflammatory mediators and myocardial ischemia-reperfusion Injury. *Hematol. Oncol. Clin. North. Am.* 21:123-45, 2007.

WADDELL, S.C.; DAVISON, J.S.; BEFUS, A.D.; MATHISON, R.D. Role for the cervical sympathetic trunk in regulating anaphylactic and endotoxic shock. *J. Manipulative Physiol. Ther.*, 15:10-5, 1992.

WAN, L.; BELLOMO, R.; DI GIANTOMASSO, D.; RONCO, C.; The pathogenesis of septic acute renal failure. *Curr. Opin. Crit. Care*, 9:496-502, 2003.

WUEST, R.; GARCIA-TSAO, G. Bacterial translocation (BT) in cirrhosis. *Hepatology*, 41:422-33, 2005.

YADA-LANGUI, M.M.; ANJOS-VALOTTA, E.A.; 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., 229:684-93, 2004.

ZAPPITELLI, M. Epidemiology and diagnosis of acute kidney injury.

Semin. Nephrol., 28:436-46, 2008.