Célia Ivete Fernandes Nunes

**Efeito da solução hipertônica (NaCl–7,5%)
na resposta imune inata em modelo de
isquemia e reperfusão**

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

Área de concentração: Emergências Clínicas
Orientador: Prof. Dr. Heraldo Possolo de Souza

**São Paulo
2006**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Nunes, Celia Ivete Fernandes

Efeito da solução hipertônica (NaCl-7,5%) na resposta imune inata em modelo de isquemia e reperfusão / Celia Ivete Fernandes Nunes. -- São Paulo, 2006.

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

Departamento de Clínica Médica.

Área de concentração: Emergências Clínicas.

Orientador: Heraldo Possolo de Souza.

Descritores: 1.Choque hemorrágico 2.Isquemia 3.Traumatismo por reperfusão
4.Solução salina hipertônica 5.Imunidade natural

USP/FM/SBD-233/06

Aos meus pais Paulo Fernandes (*In memoriam*) e Antonia Simões
Fernandes, minha referência e exemplo de caráter

As minhas irmãs, em especial a Cida, pelo apoio e incentivo, pelos
conselhos dados, pela ajuda e principalmente pela nossa amizade

À minha família, pelo apoio e amizade, pelos momentos preciosos e pela
nossa união

Ao Ruy, meu amado, pelo apoio e compreensão em todos esses momentos.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Heraldo Possolo de Souza pela oportunidade que me foi dada para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Irineu Tadeu Velasco que permitiu a realização deste trabalho no Laboratório de Emergências Clínicas

Ao Prof. Dr. Luiz Carlos Salomao (*In memorian*) que me iniciou na carreira científica.

Aos pós graduandos do Laboratório de Investigação Médica pelos momentos de descontração durante um cafezinho e outro que eram momentos de total incentivo.

Aos colegas do Laboratório de Investigação Médica, pela amizade e apoio durante esse tempo em que passei no LIM 51.

Ao Luiz Cláudio Godoy, que mesmo à distância contribuiu para a realização deste trabalho.

A Ana lochabel e Suely, muito obrigada pela ajuda, fundamental na finalizacao deste trabalho.

A Fatima, pelo seu cuidado e atencao no preparo das laminas

Aos funcionários do Biotério pela amizade , colaboração e suporte no cuidado com os animais.

A todos aqueles que contribuíram para que a nossa convivencia se tornasse melhor o meu muito obrigada!

À FAPESP e CAPES pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Lista de Abreviaturas

Resumo

Summary

1. Introdução	1
1.1 Lesão Pulmonar Aguda	2
1.2 A Lesão de Isquemia-Reperfusão	4
1.3 Lesão de isquemia-reperfusão e resposta imune.....	5
1.4 Choque hemorrágico	17
1.5 Solução Hipertônica	20
1.6 Hipótese	25
2. Objetivos.....	27
2.1 Objetivo Geral	28
2.2 Objetivos específicos	28
3. Métodos	31
3.1 Animais.....	32
3.2 Preparação das cânulas.....	32
3.3 Implantação das cânulas.....	33
3.4 Choque hemorrágico.....	34
3.5 Infecção com <i>E. coli</i>	36
3.6 Lavado broncoalveolar (BAL)	37
3.8 Análise histológica pulmonar.....	40
3.9 Análise Estatística	42

4. Resultados	43
4.1 Parâmetros hemodinâmicos: Pressão Arterial Média (PAM)	44
4.2 Histologia Pulmonar	46
4.4 Expressão de TLR-2 e TLR-4 nas células do lavado broncoalveolar	57
4.5 Expressão de CD40 e CD40L nas células do lavado broncoalveolar	61
5. Discussão	65
6. Conclusões	78
8. Referências	80

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Desenho do protocolo experimental.....	35
Figura 2. Cortes histológicos de pulmões, corados com hematoxilina-eosina e observados em microscópio óptico com aumento de 100x.	49
Figura 3. Cortes histológicos de pulmões, corados com hematoxilina-eosina e observados em microscópio óptico com aumento de 200x.	50
Figura 4. Cortes histológicos de pulmões, corados com hematoxilina-eosina e observados em microscópio óptico com aumento de 400X.	51
Figura 5. Representação quantitativa dos neutrófilos em pulmão de ratos na região septal e alveolar.	54
Figura 6. Expressão de RNAm para TLR-2 em células do lavado broncoalveolar.	59
Figura 7. Expressão de RNAm para TLR-4 em células do lavado broncoalveolar	60
Figura 8. Quando os ratos foram submetidos a I-R com solução isotônica ou hipertônica (SS e HS), não houve aumento na expressão do receptor, sugerindo que a solução de reposição não afeta a expressão de CD40..	63
Figura 9. A lesão de I-R não afetou a expressão de RNAm para CD40L (SS e HS).....	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Ligantes dos receptores Toll-like humanos e os patógenos relacionados.....	8
Tabela 2. A tabela mostra os diferentes grupos experimentais conforme o tratamento administrado.	37
Tabela 3. Seqüência dos primers e procedimentos usados na amplificação do RNAm para TLRs, CD40 e CD40L utilizados em nossos experimentos	40
Tabela 4. Pressão arterial média, em mmHg (média + EPM), em animais submetidos a choque hemorrágico por 60 minutos e distribuídos nos diferentes grupos conforme o tratamento administrado apos o choque.	45
Tabela 5. Diferencial das células recuperadas no BAL.....	56

LISTA DE ABREVIATURAS

ACTH - hormônio adrenocorticotrópico

ICAM – molécula de adesão intercelular

IL – interleucina

I-R - isquemia-reperfusão

LPA - Lesão Pulmonar Aguda

LPS - Lipopolissacarídeo

PAMPs - padrões moleculares associados a patógenos

PBS – tampão fosfato salino

PEEP – pressão expiratória pulmonar final

SARA - Síndrome da Angústia Respiratória Aguda

TRL - receptores toll-like

RESUMO

Nunes CIF. *Efeito da solução hipertônica (NaCl–7,5%) na resposta imune inata em modelo de isquemia e reperfusão [tese]*. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2005. 93 p.

O choque e ressuscitação predispõe os pacientes a uma maior susceptibilidade a uma lesão pulmonar aguda devido a uma exagerada resposta imune a um segundo estímulo inflamatório, conhecida como lesão das duas agressões, cujos mecanismos tem sido extensivamente pesquisados, mas ainda permanecem sem entendimento. Sendo assim, o principal objetivo deste estudo foi investigar a resposta inflamatória em modelo das duas agressões, no qual a primeira é representada pela I-R e a segunda pela instilação intratraqueal de bactérias vivas. O modelo de choque com animais acordados e hemorragia controlada, seguido de inoculação intratraqueal de bactérias vivas *E. coli* foi utilizado neste estudo. Todos os animais apresentaram variáveis hemodinâmicas similares, onde a PAM alcançou valores de aproximadamente 40 mmHg depois do sangramento. Solução hipertônica (HS, NaCl – 7,5%) ou isotônica (SS, NaCl – 0,9%) foram usadas como soluções de reperfusão, com resultados hemodinâmicos semelhantes. A inflamação pulmonar foi mais evidente nos animais submetidos a I-R e ressuscitados com solução isotônica (grupo SS) antes da inoculação da bactéria (grupo SEC). Animais que receberam solução hipertônica (grupo HS) apresentaram menos inflamação comparados com os animais do grupo SEC. RNAm para TLR2/4 e CD40/CD40L tiveram suas expressões aumentadas depois da instilação com a bactéria. Quando esses animais foram submetidos somente a lesão de I-R o mesmo não ocorreu. Animais do grupo HEC apresentaram maior expressão desses receptores que o grupo SEC. Nos concluímos que a lesão de I-R aumenta a resposta a uma segunda agressão e que a HS pode modular favoravelmente esta resposta.

SUMMARY

Nunes CIF. *The Effects of the Hypertonic Solution (NaCl-7,5%) in the Inate Immune Response of Ischemia-Reperfusion Model [thesis]*. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2006. 93 p.

Shock and resuscitation renders patients more susceptible to acute lung injury due to an exaggerated immune response to late inflammatory stimuli, the so-called two-hit model, whose mechanisms have been extensively researched, but are still not completely understood. Therefore, the main objective of this study was to investigate the inflammatory response in a two-hit model, in which the first injury is represented by ischemia and reperfusion (I-R), and the second challenge by live bacteria injection. A shock model, with conscious rats and controlled hemorrhage, followed by intratracheal inoculation of live *E.coli* bacteria was used in this study. All animals showed similar hemodynamic variables, with the mean arterial pressure decreasing to about 40 mmHg after bleeding. Hypertonic saline (HS, NaCl 7,5%) or isotonic saline (SS, NaCl 0,9%) were used as resuscitation fluids, with equal hemodynamic results. Lung inflammation and damage was more evident in the animals submitted to I-R and resuscitated with SS before bacteria inoculation (SEC group). Animals receiving HS displayed less inflammation compared to SEC. TLR2 and TLR4 mRNA expression increased markedly after *E.coli* injection. When submitted to I-R, these proteins were not up-regulated (except TLR2) when challenged with bacteria. Animals in the HEC group showed higher expression of these modulators than animals in the SEC group. We conclude that I-R blunts inflammatory response, rendering animals more susceptible to damage by a second challenge. Resuscitation with hypertonic saline may favorably modulate this response.

1. Introdução

1.1 Lesão Pulmonar Aguda

A Síndrome da Angústia Respiratória Aguda (SARA, também conhecida pela sigla em inglês, ARDS) foi descrita pela primeira vez há quase quarenta anos (Ashbaugh et al. 1967). Nesse artigo, os autores descreviam uma série de casos cujos achados clínicos foram incorporados à definição formal dessa síndrome, estabelecida em 1994 pelo American-European Consensus Conference (AECC) e usada em todo o mundo (Bernard et al. 1994). Atualmente SARA é diagnosticada em pacientes que têm hipoxemia, com uma relação $PAO_2/FiO_2 < 200$, qualquer que seja o PEEP, infiltrados bilaterais à radiografia frontal de tórax e sem evidência clínica de hipertensão de átrio esquerdo (ou pressão capilar pulmonar < 18 mmHg, quando medida) (Bernard, Artigas et al. 1994).

Apesar de todos os avanços na terapia e compreensão dessa síndrome, as taxas de mortalidade ainda permanecem altas, variando de 26 a 74%, com a maioria das mortes sendo atribuídas não só à hipoxemia causada pela SARA, mas, principalmente, às condições desencadeantes, como sepsis (Fan et al. 2005).

A síndrome não é definida por uma patogênese específica, mas reflete a resposta pulmonar a uma série de fatores precipitantes.

Morfologicamente, a lesão se manifesta pelo acúmulo de fluido alveolar e intersticial, hemorragia alveolar, depósito de fibrina e seqüestro de neutrófilos no parênquima pulmonar. De uma perspectiva fisiopatológica, este acúmulo de neutrófilos na vasculatura pulmonar, interstício e espaço alveolar é considerado um evento crítico e tem sido alvo de várias estratégias preventivas (Fernandes et al. 2005).

Embora seja usado com freqüência como sinônimo de lesão pulmonar aguda, o termo SARA deveria ser reservado para descrever os casos situados no extremo mais grave no espectro das lesões pulmonares agudas (Bernard, Artigas et al. 1994). Durante todo esse texto, iremos usar o termo mais genérico Lesão Pulmonar Aguda (LPA) para definir os achados histológicos e moleculares aqui descritos.

Inicialmente se acreditava que a LPA e SARA eram conseqüências de uma agressão direta ao pulmão. Posteriormente se demonstrou que um insulto menos severo “prepara” ou “ativa” (traduções imprecisas do termo inglês “to prime”) o hospedeiro, de tal maneira que uma segunda agressão, às vezes trivial, pode precipitar a inflamação pulmonar mais grave observada na SARA. A esse novo paradigma para se explicar a ocorrência da LPA e SARA, se deu o nome de “lesão de duas agressões”, mais conhecida pelo seu nome em inglês “two-hit injury” (Moore et al. 1995). É preciso esclarecer que esse modelo foi aplicado não somente à SARA, mas a outros eventos que ocorrem nos pacientes críticos, como a sepse severa e a falência de múltiplos órgãos.

A partir desses novos achados, a atenção se voltou para os eventos clínicos iniciais com potencial de “preparar” o paciente para uma segunda agressão. Seguindo dados clínicos, demonstrou-se que algumas das principais situações clínicas após as quais pode ocorrer LPA ou SARA são infecções, trauma e a lesão de isquemia-reperfusão .

1.2 A Lesão de Isquemia-Reperfusão

A isquemia tecidual leva à morte celular por necrose, devido à privação dos substratos energéticos. É necessário, portanto, reverter a isquemia seja ela regional (por exemplo, através da angioplastia ou trombólise no infarto agudo do miocárdio) ou global (por exemplo na parada cardíaco-respiratória ou no choque). O período que cada célula resiste à isquemia varia de tecido para tecido, mas o objetivo é restabelecer a perfusão sangüínea o mais rapidamente possível. Paradoxalmente, a reperfusão traz para o tecido reperfundido uma nova ameaça. Uma vez restabelecido o fluxo sangüíneo, a reperfusão desencadeia, nas células viáveis, uma série de eventos intracelulares que podem ser fatais e irreversíveis, levando-as à morte por necrose ou, mais comumente, por apoptose (Cotran et al. 1999).

São múltiplos os mecanismos descritos como responsáveis pela lesão celular na isquemia-reperfusão:

- produção de espécies reativas de oxigênio no momento da reperfusão (Zweier et al. 1987; Flaherty et al. 1991)
- aumento da geração de óxido nítrico, com conseqüente geração do potente oxidante peroxinitrito (Wang et al. 1996)
- disfunção endotelial (Verma et al. 2002), com diminuição da atividade da óxido nítrico sintase endotelial (Giraldez et al. 1997) e aumento da expressão de moléculas de adesão (Granger 1999)
- alterações no metabolismo de cálcio (Kukreja et al. 1997; Silomon et al. 1999)
- infiltração de células do sistema imune no tecido reperfundido, levando à lesão celular pelo processo inflamatório local (Dutilleul et al. 2001; Anaya-Prado et al. 2002)

Os mecanismos que ligam a lesão de isquemia-reperfusão a uma gravidade maior de uma segunda lesão posterior (“two-hits”) ainda não estão completamente esclarecidos, entretanto, é interessante notar que a lesão de isquemia-reperfusão por si só, pode alterar a resposta imune do hospedeiro.

1.3 Lesão de isquemia-reperfusão e resposta imune

As interações entre a lesão de isquemia-reprfusão (I-R) e resposta imune é extensamente estudada no campo da imunologia dos transplantes, pois a I-R é uma condição inflamatória independente de antígeno que afeta

profundamente a função do órgão transplantado tanto a curto quanto a longo prazo (Boros et al. 2006).

A resposta imune é didaticamente dividida em inata e adquirida, embora hoje saibamos que existe uma grande sobreposição entre elas (Iwasaki et al. 2004).

O sistema imune inato é responsável pela resposta inicial do organismo a fatores potencialmente perigosos, como, por exemplo, patógenos. A resposta inata independe do tipo de antígeno e utiliza receptores inespecíficos para o reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) conservados em diversas classes de microorganismos. Nos organismos multicelulares, os receptores toll-like desempenham um papel primordial no reconhecimento inicial dos agentes agressores e desencadeamento da resposta inflamatória necessária para sua contenção (Janeway et al. 2002).

Após essa fase inicial, a resposta imune passa a ser efetuada de maneira mais especializada contra um determinado antígeno, com um arsenal que inclui anticorpos mais específicos e células com maior poder de discriminação. Essa resposta imune adaptativa depende de células capazes de selecionar antígenos específicos, diferentes daqueles contidos no hospedeiro e ativar linfócitos capazes de eliminar o agente agressor com mínima lesão ao organismo do hospedeiro (Mellman et al. 2001). A ativação dessas células apresentadoras de antígenos depende de uma série de mecanismos, altamente complexos, para evitar sua ativação inadvertida, controlados por vias de sinalização independentes. Entre essas vias de

sinalização, destaca-se aquela representada pelo receptor de membrana CD40 e seu ligante CD40L, ou CD154 (Daoussis et al. 2004).

A seguir discutiremos com mais detalhes os achados experimentais e clínicos ligando a lesão de isquemia-reperfusão a esses diferentes aspectos da resposta imune.

1.3.1 Receptores Toll-like

Os receptores toll-like (TRL) são componentes da resposta inata, iniciadores da resposta imune que atuam precocemente no reconhecimento de patógenos (Janeway and Medzhitov 2002). Inicialmente descritos como sendo parte do sistema imune da mosca de frutas *Drosophila* (Stein et al. 1991), foram posteriormente reconhecidos homólogos desses receptores em humanos e receberam o nome de receptores toll-like (TLRs) (Medzhitov et al. 1997). Estes receptores compreendem uma ampla família com especificidade para diferentes componentes de patógenos (Medzhitov et al. 2000; Kaisho et al. 2004), capazes de desencadear a cascata de sinalização que resulta na ativação da resposta imune inata, secreção de citocinas e ativação celular (Janeway and Medzhitov 2002; Lien et al. 2002; Takeda et al. 2005).

Determinar os componentes dos patógenos que são responsáveis por iniciar a resposta do hospedeiro tem sido importante não só para se entender os mecanismos envolvidos na resposta, mas também para se desenhar estratégias terapêuticas. Esses sítios microbianos reconhecidos

pelo sistema imune inato são chamados de padrões moleculares associados a patógeno (PAMPs) (Janeway and Medzhitov 2002). Os PAMPs são estruturas moleculares altamente conservadas nos diferentes grupos de patógenos. Na Tabela 1 estão discriminados alguns dos ligantes já conhecidos para os diferentes receptores Toll-Like.

Tabela 1. Ligantes dos receptores Toll-like humanos e os patógenos relacionados

Receptores	Ligantes	Origem do ligante
TLR1-TLR2	Fatores solúveis liberados por bactérias	<i>Neisseria meningitidis</i>
TLR2-TLRX	Lipoproteínas	Several bactéria species
	Ácido lipoteicóico	<i>Staphylococcus aureus</i>
	Lipoarabinomannan	Mycobactéria
	Fosfatidilinositol dimanosídeo	<i>Staphylococcus aureus</i>
	Âncoras de glicosilfosfatidilinositol	<i>Trypanosoma cruzi</i>
	Endotoxina (LPS)	<i>Leptospira interrogans</i> <i>Porphyromonas gingivalis</i>
TLR2-TLR6	Peptídeoglicano	Bactérias Gram positivas
	Fenol modulina solúvel	<i>Staphylococcus aureus</i>
	Zimosan	Fungos
	Lipopeptídeo-2 ativador de macrófagos (MALP-2)	<i>Mycoplasma fermentans</i>
TLR3	RNA de dupla hélice	Virus
TLR4	Endotoxina (lipopolisacáride)	Bactérias Gram negativas
	Taxol	Hervas
TLR5	Flagelina	Bactérias flageladas
TLR7	Compostos antivirais imidazoquinolina (imiquimoda and R-848)	Compostos químicos
TRL9	DNA GpG não metilado	Bactéria

(adaptado de (Bochud et al. 2003)

De todos os TLRs estudados, o TLR4 é o melhor compreendido. Seu principal ligante é o lipopolissacáride (LPS) da parede das bactérias gram-negativas (Medzhitov et al. 2000). O LPS, ao adentrar a corrente sanguínea é reconhecido por uma proteína circulante, a proteína ligante de LPS (LPB). O complexo LPS-LPB se liga então ao CD14, proteína de membrana ligada a um resíduo glicosilfosfatidilinositol na parede de macrófagos, monócitos e, em menor número, neutrófilos. Acredita-se que o CD14 forma um complexo com o LPS e o TLR4 na superfície celular, facilitando sua ativação (Muta et al. 2001; Dobrovolskaia et al. 2002).

Outra proteína relacionada à ligação do LPS ao TLR4 é a MD-2. Tal molécula parece estar relacionada à estabilização da ligação do LPS ao TLR4 ou da formação dos dímeros de TLR4 (Read et al. 2001). Assim, aparentemente, o complexo de reconhecimento de LPS possui três componentes: CD14, TLR4 e MD-2. TLR4 e MD-2 estão associados entre si, enquanto CD14 é recrutado ao complexo após a ligação do LPS (Medzhitov and Janeway 2000).

Após a ligação com TLR4, ocorre a dimerização e o recrutamento de uma proteína adaptadora (Myeloid Differentiation Protein -MyD88) com o segmento intracelular do receptor toll-like. Após esse contato, MyD88 se associa e ativa a quinase associada ao receptor de IL-1 (IL-1 receptor-associated kinase - IRAK). A fosforilação da IRAK leva ao recrutamento do fator associado ao receptor de TNF 6 (TNF receptor-associated factor-6 - TRAF-6), que, ao se oligomerizar, ativa uma quinase específica chamada quinase proteica ativada por mitógenos (mitogen-activated protein kinase

kinase kinase - MAP3K). Essa quinase leva à ativação das quinases IKB 1 (IKK1) e IKB 2 (IKK2). Essas quinases fosforilam resíduos de serina da IκB, levando à sua degradação e liberando NF-κB, que é translocado ao núcleo, onde induz a ativação de uma série de genes relacionados à inflamação e resposta imune (Aderem et al. 2000; Akira et al. 2004).

Tendo em vista a importância dos TLR4 no sistema imune inato, temos que a função dos TLR4s é necessária para a resposta adequada à infecção (Poltorak et al. 1998). Lorenz et al. demonstraram recentemente que o polimorfismo do gene humano do TLR4 poderia explicar em parte as diferentes evoluções dos pacientes com infecções por gram-negativos. Eles demonstraram que o alelo TLR4 Asp299Gly foi encontrado apenas em pacientes com choque séptico. Além disso, pacientes com alelos TLR4 Asp299Gly/Thr399Ile estariam mais relacionados a infecções por gram-negativos (Lorenz et al. 2002; Lorenz et al. 2005).

Alterações na expressão e atividade dos TLRs pela isquemia-reperfusão têm sido descritas em diversos modelos. Aumento da expressão de TLR4 (tanto do RNAm quanto da proteína) foi descrita em células de Kupffer imediatamente após reperfusão, em ratos submetidos a transplante ortotópico de fígado (Peng et al. 2004) e em rins de ratos que sofreram isquemia (Kim et al. 2005). Um papel similar foi estabelecido para os TLRs na isquemia miocárdica. TLR4 é constitutivamente expresso tanto em cardiomiócitos quanto em células da parede vascular e hipóxia aumenta marcadamente sua expressão (Boros and Bromberg 2006). Mais relevante é o fato de ocorrer diminuição do tamanho do infarto em camundongos

deficientes em TLR4 (Oyama et al. 2004) e um inibidor farmacológico específico de TLR4 (eritoran) diminuir o componente inflamatório da lesão I-R (Shimamoto et al. 2006).

Em um modelo experimental de isquemia-reperfusão global, semelhante ao usado por nós, outros autores obtiveram resultados interessantes. Inicialmente, mostraram que, em pulmões de ratos expostos a LPS a expressão de TLR4 diminui. Quando esses animais são previamente submetidos a choque hipovolêmico e reperfusão com solução salina isotônica, entretanto, o LPS não exerce mais esse efeito, sugerindo que a isquemia-reperfusão mantém a expressão de TLR4 elevada (Fan et al. 2002).

Em resumo, os dados publicados até o momento sugerem que ocorre sinalização, independente de antígeno exógeno, através de TLRs em órgãos submetidos à isquemia e reperfusão. A extensão do papel dos TLRs na I-R e a natureza dessa sinalização, se benéfica ou não, ainda não foi elucidado.

1.3.2 A via de sinalização CD40/CD40L

O receptor de membrana CD40 foi identificado pela primeira vez na década de 80, como uma molécula expressa em todos os estágios de desenvolvimento das células B, enquanto seu ligante, CD40L (renomeado posteriormente CDS154) foi descrito mais tarde em células T CD4+ (van Kooten et al. 2000). O interesse nessas moléculas só foi ser despertado quando se demonstrou que mutações nessa via de sinalização eram responsáveis pelo aparecimento da Síndrome Hiper-IgM, imunodeficiência

caracterizada, clinicamente, por infecções de repetição de vias aéreas por gemes oportunistas, disfunção hepática e diarreia crônica. Nessa síndrome, há pouca, ou nenhuma IgG, IgE ou IgA circulantes, com níveis normais ou aumentados de IgM. A causa é uma deficiência na interação entre células T e B, impedindo a maturação das últimas o “switching” do isotipo de Ig, devido a uma deficiência na sinalização via CD40-CD40L (Korthauer et al. 1993; Levy et al. 1997).

Estudos posteriores ampliaram o conhecimento sobre essa via de sinalização. Demonstrou-se que sua expressão é muito mais ampla do que se imaginava a princípio. CD40 é expresso principalmente por células apresentadoras de antígenos, macrófagos, monócitos, células dendríticas e também em células da parede vascular (van Kooten and Banchereau 2000). CD40L é expresso não só em linfócitos, mas em plaquetas (Henn et al. 1998), células da parede vascular (Mach et al. 1997) e ocorre também em uma forma solúvel, circulante no plasma (Graf et al. 1995).

Do ponto de vista funcional do sistema imune, a via de sinalização CD40-CD40L se mostrou fundamental na ativação, proliferação, diferenciação e produção de imunoglobulinas em células B maduras ou imaturas (Calderhead et al. 2000). Já em células apresentadoras de antígenos, a ligação do CD40 resulta em aumento na sobrevivência dessas células, secreção de citocinas (IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, TNF- α , MIP-1 α) e enzimas como metaloproteinase de matriz, aumento da atividade tóxica de monócitos e síntese de óxido nítrico (van Kooten and Banchereau 2000).

O controle da expressão de CD40/CD40L ocorre no nível da transcrição gênica e requer síntese protéica (Nguyen et al. 1998). Não se conhece, até o momento, modificações pós-translacionais sofridas por essas proteínas. Assim, a atividade dessa via de sinalização é controlada pela expressão das proteínas CD40 e CD40L.

Alguns autores inicialmente observaram que o antígeno CD40L é expresso na superfície de linfócitos T maduros, mas não naqueles em repouso (Armitage et al. 1992) e que essa expressão se iniciava 5 minutos após o estímulo, com um pico ocorrendo após 6 a 12 horas (Roy et al. 1993). Também foi descrito que a expressão de CD40L em linfócitos envolve mecanismos dependentes e independentes de co-estimulação através de outros receptores (Ding et al. 1995). Entretanto, mais relevante em nosso campo de interesse é o fato de que citocinas pró-inflamatórias podem modular a expressão de CD40L: interleucinas 1 β e 4 (IL-1 β e IL-4) e fator de necrose tumoral α (TNF- α), aumentam a expressão de CD40L em linfócitos e macrófagos (Armitage, Fanslow et al. 1992; Mach, Schonbeck et al. 1997). Nas células que compõem a parede vascular (células musculares lisas e endoteliais) IL-1 β e TNF- α exercem o mesmo efeito, aumentando a expressão de CD40L funcionalmente ativo, 12 a 24 horas após a estimulação (Mach, Schonbeck et al. 1997). Em transplantes cardíacos ou renais que sofreram rejeição (Reul et al. 1997; Kirk et al. 1999), locais onde há um ativo processo inflamatório, é detectado um aumento na expressão de CD40L e o mesmo fenômeno pode ser observado na placa aterosclerótica (Mach, Schonbeck et al. 1997).

CD40 é constitutivamente expresso, portanto, na maioria dos tipos celulares do sistema imune, incluindo macrófagos e linfócitos T ativados (Fanslow et al. 1994; Mach, Schonbeck et al. 1997). É também expresso constitutivamente em células endoteliais *in vitro* e *in situ*, porém sua expressão é aumentada nesse tipo celular após a estimulação pelas citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , TNF- α , IFN- γ (Hollenbaugh et al. 1995; Karmann et al. 1995; Yellin et al. 1995). Em células musculares lisas vasculares, a expressão de CD40 foi descrita primeiramente em lesões ateroscleróticas, porém também ocorre constitutivamente e pode ser modulada por citocinas (Mach, Schonbeck et al. 1997; Lazaar et al. 1998).

Além disso, em paralelo à expressão constitutiva, a expressão de CD40 também pode ser modulada. Ao contrário da expressão de CD40L, que se inicia rapidamente e chega ao pico após 6 horas, a de CD40 inicia-se 6 a 12 h após a estimulação, chega a um pico após 24 horas e persiste alta por 24 a 72 h (Schonbeck et al. 2001). São múltiplos os fatores que induzem a expressão de CD40. Citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , TNF- α , IL-4) (Hollenbaugh, Mischel-Petty et al. 1995; Karmann, Hughes et al. 1995; Yellin, Brett et al. 1995; Schonbeck and Libby 2001), fatores de crescimento (fator estimulante de colônias granulocíticas/macrofágicas, GM-CSF) (McLellan et al. 1996), HIV (Moses et al. 1997), exposição à luz ultravioleta (Gilliam et al. 1998), ésteres de forbol (Law et al. 1990), entre outros, podem induzir essa expressão.

Em nosso laboratório, demonstramos que espécies reativas de oxigênio (ERO) podem modular a expressão de CD40, mas não de CD40L,

em células da parede vascular. Exposição de células musculares lisas vasculares ou células endoteliais a fatores que aumentam a geração de ERO intracelulares, como, por exemplo, angiotensina II ou citocinas, causa aumento da expressão de CD40. O prévio tratamento dessas células com antioxidantes bloqueia esse fenômeno.

Como descrito acima, o receptor de membrana CD40 é expresso em células apresentadoras de antígenos do sistema imune (macrófagos, células dendríticas) bem como em células da parede vascular (células endoteliais, células musculares lisas) (van Kooten and Banchereau 2000). Quando ativado, através de seu ligante CD154 (comumente como CD40 ligante ou CD40L), desencadeia uma série de respostas celulares que culminam com a ativação das células onde é expresso. Ocorre, nessas células ativadas, aumento da expressão de citocinas (IL-1, IL-12), enzimas (metaloproteinases, ciclooxygenase), fator tecidual, entre outros fenômenos (Schonbeck and Libby 2001). Além disso, a via de sinalização CD40-CD40L é parte integral e fundamental no processo de ativação e maturação de linfócitos e células T. Distúrbios na sinalização via CD40-CD40L estão envolvidos na gênese de diversas doenças auto-imunes, na rejeição a transplante e na aterosclerose (Lutgens et al. 2002).

O papel da via de sinalização CD40/CD40L na patogênese da lesão de I/R ainda não está completamente esclarecido, embora haja indícios que sugiram sua participação nesse processo. Em fígados transplantados em camundongos (Shen et al. 2002) e que, portanto, foram isquemiados e reperfundidos, há aumento da expressão e atividade de CD40 e CD40L. O

envolvimento agudo de linfócitos na lesão de I/R em pulmões de ratos também dependeu da sinalização via CD40/CD40L. Em um modelo onde pulmões foram submetidos a I/R ex vivo, o tratamento com anticorpo bloqueador da via de sinalização CD40/CD40L diminuiu a migração de linfócitos e a lesão histológica (Moore et al. 2002).

Em modelos de I-R global, como por exemplo, no choque hipovolêmico, o papel da via de sinalização CD40/CD40L ainda não foi investigado.

1.3.3 Lesão de Isquemia-Reperfusão e Resposta Imune: Sumário

Pelo exposto acima, fica claro que começamos a entender um pouco melhor os mecanismos que governam a resposta imune desencadeada pela lesão de isquemia-reperfusão. Esse conhecimento tem aumentado nas últimas décadas, graças ao estudo da imunologia dos transplantes e de novas técnicas de reperfusão de tecidos isquemiados, como as terapias trombolíticas e angioplastia.

Muitos pontos fundamentais ainda não estão completamente esclarecidos, e só agora começam a ser explorados, como por exemplo, o papel da imunidade inata na lesão de isquemia-reperfusão e seu papel na ativação posterior da imunidade adquirida.

É necessário deixar claro que a importância desse assunto se deve ao fato da reperfusão oferecer uma “janela de oportunidade”, onde o tratamento adequado pode evitar algumas das complicações hoje

observadas na I-R. A seguir, discutiremos mais detalhadamente a principal causa de isquemia global (choque hemorrágico) e, em seguida, algumas das estratégias de reperfusão que visam diminuir a lesão I-R.

1.4 Choque hemorrágico

Choque hemorrágico é a principal e mais dramática causa de choque hipovolêmico. A perda sanguínea, externa ou interna, leva a uma diminuição na pressão e volume de enchimento diastólico cardíaco, resultando em diminuição acentuada no volume ejetado. Essa situação é detectada por barorreceptores dos seios carotídeo e arco aórtico e mecanorreceptores no átrio direito. Uma resposta neurohumoral é então desencadeada, a qual inclui ativação do sistema nervoso autônomo simpático, aumento da secreção pituitária de ACTH e hormônio antidiurético, aumento da liberação de epinefrina e cortisol pelas adrenais e ativação do sistema renina angiotensina (Shoemaker et al. 1996). O efeito desses mecanismos compõe uma resposta integrada: taquicardia compensatória, retenção de água e sódio e vasoconstrição periférica, numa tentativa de se elevar novamente o débito cardíaco e a pressão arterial, com o objetivo primordial de manter a perfusão tecidual, principalmente de cérebro e coração.

Entretanto, se a perda sangüínea excede 20 a 25% do volume intravascular, esses mecanismos compensatórios deixam de ser efetivos, ocorrendo então uma diminuição acentuada do débito cardíaco e da pressão

arterial. O que ocorre então são sinais de má perfusão tecidual, revelando-se assim em toda sua extensão a síndrome clínica de choque hipovolêmico, caracterizada por taquicardia, pulsos finos, taquipnéia, veias periféricas e jugulares com enchimento diminuído, extremidades pálidas e frias, palidez subcutânea, diminuição do débito urinário e alteração do nível de consciência, inicialmente com agitação, podendo chegar a torpor e coma (Shoemaker, Peitzman et al. 1996).

Ao nível celular, durante o choque ocorre inicialmente um aumento da extração do oxigênio arterial. Porém, se a hipovolemia persiste, esse mecanismo compensatório pode também ser suplantado, acarretando hipóxia tecidual, com ativação do pouco eficaz metabolismo anaeróbico, o que pode gerar acúmulo tecidual de ácido láctico e posterior acidose láctica (Orlinsky et al. 2001). Se a hipovolemia resultante da perda sangüínea não é corrigida, a lesão tecidual pode tornar-se irreversível (Falk et al. 1992; Astiz et al. 1993).

1.4.1 Tratamento do choque hemorrágico

Nas últimas 5 décadas, existia um consenso que preconizava o controle de um sangramento no menor tempo possível e a expansão volêmica adequada como intervenções fundamentais em casos de choque hemorrágico, cuja finalidade seria o restabelecimento da oxigenação e perfusão teciduais. A literatura era unânime em afirmar que tais intervenções poderiam reduzir significativamente a morbidade e mortalidade em pacientes vítimas de trauma ou submetidos a cirurgias de grande porte (Kreimeier 2000).

Uma variedade de fluidos, incluindo colóides como albumina e dextrana, cristalóides, como solução fisiológica, ou solução de Ringer lactato, têm sido utilizados na reposição volêmica, na tentativa de restabelecer o volume intravascular e a oferta periférica de oxigênio, melhorando assim a perfusão tecidual. Entretanto, mais recentemente, o uso de grandes volumes de solução isotônica na ressuscitação do choque hemorrágico tem sido criticada. Estudos com modelos animais têm levantado questionamentos sobre essa abordagem. Restauração da pressão arterial normal antes que o sangramento tenha sido controlado definitivamente está associada a uma maior perda sangüínea. Infusão agressiva de cristalóide resulta em diluição de hemácias e fatores de coagulação, resultando em coagulopatia, que na presença de uma pressão arterial normal, pode deslocar o coágulo hemostático e, por sua vez, agravar a hemorragia (Bilkovski et al. 2004).

Além disso, como discutido acima, a lesão de isquemia-reperfusão causada pela infusão de grandes volumes após o choque hemorrágico desencadeia alterações no sistema imune. Foi demonstrado que a hemorragia simples, seguida de adequada ressuscitação com sangue e soluções cristalóides, pode resultar em grave depressão da imunidade celular. Estudos em animais mostraram evidências de que esta imunodepressão, após o choque hemorrágico, mesmo sem lesão tecidual evidente, aumenta a susceptibilidade à sepse (Stephan et al. 1987; Chaudry et al. 1990). Outros autores demonstraram que a ressuscitação com Ringer lactato após choque hemorrágico produz ativação de neutrófilos por

aumento da liberação de espécies reativas de oxigênio e que a infusão de Ringer lactato em animais que não sofreram hemorragia também resulta na ativação de neutrófilos (Rhee et al. 1998).

Experimentos recentes sugerem que a lesão por I-R dos órgãos hipoperfundidos em uma situação de choque hemorrágico pode variar em função do fluido usado na reperfusão e que a infusão de pequenos volumes pode trazer benefícios no período pós ressuscitação (Orlinsky, Shoemaker et al. 2001; Stern 2001; Tremblay et al. 2001; Bilkovski, Rivers et al. 2004). A discussão ainda não está concluída e, por isso, é necessário um melhor conhecimento sobre os efeitos das diferentes soluções no componente inflamatório da lesão de isquemia-reperfusão.

1.5 Solução Hipertônica

Descrita inicialmente no início dos anos 80 (Velasco et al. 1980), a infusão de solução hipertônica (NaCl 7,5%, osmolaridade de 2400 mOsm) parece ser uma alternativa atraente para o tratamento do choque hemorrágico. Entre suas vantagens, podemos citar o menor tempo gasto para administração da solução (o que pode ser crucial no tratamento do paciente com sangramento severo), a facilidade de estocagem e a menor incidência de complicações da sobrecarga de volume (por exemplo, edema agudo de pulmão) que pode ocorrer no tratamento com grandes quantidades de solução isotônica .

Seus efeitos podem ser devidos a efeitos da osmolaridade ou a um componente neural.

Os efeitos devidos a osmolaridade são:

1. Rápida expansão volêmica

A administração de NaCl hipertônico produz uma imediata expansão plasmática. Durante a perda sangüínea ocorre transferência de fluido intravascular do interstício para dentro dos vasos, pois a pressão coloidosmótica é maior dentro do compartimento intravascular. Ocorre também entrada de líquidos provenientes do interstício para dentro da célula (Mazzoni et al. 1988).

A solução hipertônica produz um aumento da osmolaridade sangüínea de 20 a 30 mOsm/L. Uma vez que o endotélio capilar é permeável ao Na⁺ e a membrana plasmática não o é, ocorre uma redistribuição de líquidos nos compartimentos. Assim, podemos dizer que durante a ressuscitação com o uso de solução hipertônica ocorre maior fluxo de líquidos do espaço intracelular para o espaço intersticial e posteriormente para dentro dos vasos.

2. Vasodilatação pré-capilar

O tratamento do choque hemorrágico com solução hipertônica produz diminuição da resistência vascular periférica, devido principalmente à vasodilatação pré-capilar (Gazitua et al. 1969; Gazitua et al. 1971). Esse efeito pode ser atribuído ao aumento da osmolaridade já que pode ser observado *in vivo* e *in vitro* com diversos solutos (Stainsby et al. 1971).

3. Melhora do desempenho cardíaco:

A infusão de solução hipertônica acarreta aumento na contratilidade cardíaca. Esse efeito é devido não somente a um aumento da pré-carga, secundária ao aumento da volemia e obedecendo às leis de Starling, mas também a um efeito direto da solução hipertônica na contratilidade miocárdica (Kien et al. 1991).

4. Redução do edema das células endoteliais

Foi descrito um edema das células endoteliais durante o choque hemorrágico. Esse fenômeno causa obstrução ao fluxo sangüíneo, piorando ainda mais a perfusão tecidual (Mazzoni et al. 1989). A solução hipertônica pode diminuir esse edema das células endoteliais, um efeito diretamente relacionado à osmolaridade (Mazzoni et al. 1990).

A solução hipertônica pode também exercer seus efeitos através de um componente neural. Para que possa ser efetiva como agente pressórico, a solução hipertônica necessita ser administrada na circulação pré-pulmonar. Em cães em choque hemorrágico, a solução hipertônica administrada por essa via produz uma maior sobrevida e recuperação mantida da pressão arterial e do débito cardíaco do que a administração em artéria aorta ou átrio esquerdo (Lopes et al. 1981). Esse efeito protetor e pressor da administração de solução hipertônica foi abolido quando o nervo vago foi bloqueado através de resfriamento . A importância desse reflexo

neural pulmonar foi confirmada posteriormente, quando a denervação crônica de um pulmão impediu que a administração de solução hipertônica revertesse o choque hemorrágico quando aplicada na circulação pulmonar ipsilateral. Quando administrada na circulação do pulmão contralateral, que permanecera inervado, os efeitos da solução hipertônica eram completos (Younes et al. 1985).

Outros dados apontam que a ação através desse componente neural pode ser um efeito específico da solução hipertônica. A injeção de solução hipertônica na cisterna magna de ratos anestesiados ocasionou uma resposta pressora dependente da dose, enquanto outras substâncias osmoticamente ativas não suscitaram o mesmo efeito (Sasaki et al. 1984). Ocorrem alterações hemodinâmicas e ventilatórias precoces quando da administração de solução hipertônica e essas alterações correlacionam-se com a osmolaridade na artéria pulmonar (Baena et al. 1989; Baena et al. 1990).

Além desses efeitos descritos acima, também o sistema renina angiotensina central parece estar envolvido na resposta pressórica à solução hipertônica (Velasco et al. 1990).

Os efeitos macro-hemodinâmicos da solução hipertônica são relativamente bem compreendidos. No entanto, estudos mais recentes têm demonstrado uma ação anti-inflamatória, abrindo novas perspectivas do uso da solução hipertônica. Foi demonstrado, por exemplo, que um dos efeitos tardios da solução hipertônica é a reversão da supressão de linfócitos T provocado pela prostaglandina E2 *in vitro* e por choque hemorrágico *in vivo* (Coimbra et al. 1996; Coimbra et al. 1997). Além disso, em modelo das duas

lesões (choque hemorrágico seguido de sepse), o uso da solução hipertônica reduz a lesão pulmonar e aumenta a sobrevivência dos animais, quando comparados aos animais tratados com Ringer lactato (Coimbra, Hoyt et al. 1997).

Outro efeito benéfico da solução hipertônica está relacionado à modulação de neutrófilos. Em animais tratados com solução hipertônica, há uma menor infiltração de neutrófilos no pulmão conforme verificado no lavado broncoalveolar, reduzindo dessa maneira a lesão pulmonar (Angle et al. 1998; Angle et al. 2000; Yada-Langui et al. 2004). RIZOLI et al., 1998 demonstraram que o choque hemorrágico combinado com injeção endotraqueal de LPS mostra significativa redução na contagem de neutrófilos no lavado broncoalveolar, com subsequente redução da lesão pulmonar nos animais tratados com solução hipertônica (Rizoli et al. 1998). A exposição à hiperosmolaridade tanto *in vitro* quanto *in vivo* altera a expressão de moléculas de adesão celular (integrina CD11b, L-selectina e molécula de adesão intercelular ICAM-1 em neutrófilos e células endoteliais (Rizoli et al. 1999).

Em resumo, podemos afirmar que a solução hipertônica é capaz de restaurar os parâmetros hemodinâmicos após choque hemorrágico e parece interferir benéficamente na resposta inflamatória induzida pela isquemia-reperfusão. Os mecanismos dessa ação ainda não estão completamente esclarecidos.

1.6 Hipótese

Como discutido até o momento, nosso conhecimento atual sobre Lesão Pulmonar Aguda e Síndrome da Angústia Respiratória Aguda sugere que um evento inicial, por exemplo, lesão de isquemia-reperfusão, leva a alterações do sistema imune, de tal maneira que uma segunda agressão, por vezes banal, pode desencadear um grande processo inflamatório, levando à insuficiência respiratória ou falência de múltiplos órgãos.

Para estudar essa lesão de duas agressões (“two-hit injury”) desenvolvemos, em nosso laboratório, um modelo controlado de choque hemorrágico em ratos, o qual permite estudar mecanismos responsáveis pelo desenvolvimento da lesão de I-R, bem como procedimentos que poderiam modular a ativação do sistema imune neste contexto.

Em trabalhos anteriores realizados por nosso grupo, nos quais utilizou-se este modelo, foi constatado que a lesão de I-R ocasiona aumento das citocinas IL-6 e IL-10 e de espécies reativas de oxigênio, qualquer que seja o fluido usado na reperfusão (solução isotônica ou hipertônica) (Fernandez TR et al. Shock. in press).

Assim, no presente trabalho, procuramos ampliar a caracterização das alterações do quadro imunoinflamatório induzido pela I-R e sua possível participação na facilitação de uma segunda agressão.

Nossa hipótese inicial foi que vias de sinalização envolvidas nas respostas imune inata ou adaptativa pudessem ser moduladas pela lesão de isquemia-reperfusão. Essas alterações poderiam, então, ser as causadoras,

ou, pelo menos, participantes da resposta inflamatória aberrante observada na resposta a uma segunda agressão.

Tentamos também determinar se a solução hipertônica exerce algum efeito protetor nesse modelo experimental, quando comparada à solução isotônica.

2. Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Determinar se, num modelo experimental de choque hemorrágico, a ressuscitação com solução hipertônica NaCl 7,5% exerce algum efeito no processo inflamatório característico da lesão de isquemia reperusão, responsável por predispor o organismo a uma segunda lesão.

2.2 Objetivos específicos

2.2.1 Definir o modelo de duas agressões (“two-hit model”) em ratos

Estratégia: Será usado um modelo no qual o animal é submetido inicialmente ao choque hemorrágico seguido de reperusão e em seguida a uma segunda agressão (“two-hit model”). As vantagens desse modelo são tais que as alterações na resposta imune causadas pela isquemia e reperusão podem ser estudadas na resposta à segunda agressão, além de mimetizar o quadro clínico comum, onde o paciente que sofre a primeira agressão (trauma, choque, parada cardio-respiratória, pancreatite) evolui mais comumente para quadros infecciosos mais graves (pneumonia com edema pulmonar, choque séptico). Entretanto, diferente dos outros modelos

descritos na literatura (Fan, Kapus et al. 2002; Powers et al. 2003), como segunda agressão será feita a exposição a bactérias vivas. Essa estratégia, diferente do uso de LPS purificado, permite avaliar de maneira mais fidedigna a resposta imune à agressão.

2.2.2 Determinar se a lesão de isquemia e reperfusão modifica a expressão de componentes da resposta imune inata (TLR2 e TLR4)

Estratégia: Ratos serão submetidos a choque hemorrágico e reperfusão com solução isotônica. Em seguida, serão expostos a bactérias vivas injetadas na traquéia. Com o objetivo de estudar a imunidade inata, serão avaliados:

- o perfil do infiltrado de macrofagico alveolar e peritonal;
- a expressão de TLRs 2 e 4 pelas células inflamatórias.

2.2.3 Determinar se a lesão de isquemia e reperfusão modifica componentes específicos da resposta imune adquirida

Estratégia: Ratos serão submetidos a choque hemorrágico e reperfusão com solução salina isotônica e em seguida expostos a bactérias vivas injetadas na traquéia. Com o objetivo de estudar a imunidade adquirida, será estudada a expressão de CD40 e CD40L.

2.2.4 Determinar se a resuscitação do choque hemorrágico com solução hipertônica (NaCl 7,5%) influencia a resposta imune observada na lesão de I-R

Estratégia: Ratos serão submetidos a choque hemorrágico e reperfusão com solução hipertônica (NaCl 7,5%). Em seguida, serão expostos a bactérias vivas injetadas na traquéia. A resposta imune inata e adquirida serão avaliadas como descrito acima. Serão comparados os grupos reperfundidos com solução isotônica e hipertônica.

2.2.5 Determinar se a reperfusão com solução hipertônica (NaCl 7,5%) induz menor lesão tecidual após choque hemorrágico

Estratégia: Ratos serão submetidos a choque hemorrágico e reperfusão com solução isotônica (0,9%) ou hipertônica (NaCl 7,5%). Os pulmões serão coletados e as alterações histológicas serão avaliadas. Serão observados integridade da arquitetura tecidual e infiltração de células inflamatórias.

3. Métodos

Este trabalho foi previamente aprovado pela Comissão Ética da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Todos os animais foram tratados de acordo com as diretrizes do National Institutes of Health (1985) para o cuidado, manipulação e utilização de animais de laboratório.

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Investigação Médica (LIM) 51 da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

3.1 Animais

Ratos machos Wistar, pesando entre 280 a 350 gramas foram mantidos em biotério, com temperatura adequada, ciclos noite/dia de 12 horas e sem restrições de água ou ração.

A anestesia foi realizada com injeção intraperitoneal de quetamina (50mg/kg) e cloridrato de xilazina (50mg/kg).

3.2 Preparação das cânulas

As cânulas foram preparadas para serem introduzidas na artéria e veia femorais de ratos Wistar. Os materiais utilizados foram cateteres de tygon de diâmetro interno (ID) 0,50 e diâmetro externo (OD) de 1,50 mm e ID 0,28 x OD 0,61 mm de diâmetro, cortados em fragmentos de aproximadamente 15cm e 3cm de comprimento, respectivamente.

Em uma seringa de 10ml, com agulha de 30x10 mm e com a ponta previamente cortada, foram colocados aproximadamente 5ml de água. A agulha dessa seringa foi colocada em contato com um bico de solda aquecido.

Após o aquecimento da agulha, esta foi introduzida em uma das pontas do cateter de ID 0,50 x OD 1,50 mm, para abri-la. Um guia de arame de 0,25 mm, aproximadamente, foi colocada dentro da cânula pela região não aberta deixando uma parte do guia para fora da cânula na região aberta.

O cateter de ID 0,28 x OD 0,61 mm foi encaixado na ponta do guia de arame de modo que este entrasse no cateter de ID 0,50 x OD 1,50mm. Essa região em que os dois cateteres estão em contato foi devidamente soldada, tomando-se cuidado para não furar a cânula.

Após soldar, o guia de arame foi retirado e a cânula testada injetando água através de uma seringa.

O guia foi colocado novamente até o centro do cateter e a região oposta foi soldada, movimentando a cânula para que essa gire. Em seguida a região soldada foi pressionada com forças em sentidos contrários. Fez-se este último procedimento duas vezes, um ao lado do outro. O guia foi retirado e a cânula testada novamente com água.

3.3 Implantação das cânulas

No dia anterior ao choque, após indução anestésica, foi realizada a tricotomia da região inguinal do membro inferior esquerdo. Fez-se anti-sepsia

do local e foram realizadas as dissecações e canulações da artéria e veia femoral com cateteres preparados como descrito anteriormente, que foram identificados, preenchidos com solução fisiológica de NaCl a 0,9% e fechados em sua porção distal. Os cateteres foram então passados pela região subcutânea inguinal até o dorso e exteriorizados na região cervical posterior. Após recuperação da anestesia, os animais foram levados de volta ao biotério e mantidos novamente sem restrição a água ou ração por 24 horas.

3.4 Choque hemorrágico

Minutos antes do início do experimento, 50UI de heparina foram injetadas pela cânula arterial e os animais colocados em uma gaiola menor, onde foram mantidos acordados para se adequarem ao ambiente. Uma extensão liga a cânula da artéria a um transdutor de pressão arterial conectado ao Biopac Systems Inc. onde a pressão arterial média (PAM) e a frequência cardíaca (FC) foram monitoradas continuamente.

O choque hemorrágico foi realizado com os animais acordados e induzido pela retirada de 3,1mL/100g de sangue através do cateter arterial dividido em oito episódios por um período de 30 minutos. Os animais ainda acordados permaneceram em choque por mais um período de 30 minutos. Após esse tempo iniciou-se o tratamento (Figura 1). Durante todo esse período não se observou qualquer sinal de dor ou desconforto nos animais.

Em seguida os animais foram separados aleatoriamente e receberam tratamento com solução isotônica ou hipertônica.

Figura 1. Desenho do protocolo experimental.

Os animais foram preparados no dia anterior (implantação das cânulas) e no dia do experimento foram monitorizados para PAM e FC. A seguir iniciaram-se os procedimentos:

- ① Medida da PAM e FC basais
- Ⓐ Sangramento: 3,1 ml/100g de peso, divididos em oito episódios em 30 minutos
- ② Medidas de PAM e FC ao final do choque, randomização entre os grupos que receberam solução isotônica ou hipertônica, seguido por início da reperfusão com a solução sorteada
- Ⓑ Reperfusão com solução isotônica (NaCl 0,9 % - 3,4 ml/100g peso) ou solução hipertônica (NaCl 7,5% - 0,4 ml/100g peso). Volume total infundido em 10 minutos.
- ③ Medida de PAM e FC ao final da reperfusão
- ④ Randomização entre os grupos que receberiam infusão intratraqueal de PBS ou *E.coli* e execução do procedimento.
- ⑤ Sacrifício do animal, retirada dos pulmões.

3.5 Infecção com *E. coli*

As bactérias *Escherichia coli* O111-EPEC foram doadas pelo laboratório do Dr. Murilo Chiamolera e mantidas em alíquotas a -80°C (2×10^8 bact/mL). No dia anterior ao experimento, as alíquotas foram descongeladas e colocadas em meio BHI (8mL do meio e 30uL da suspensão de bactéria) e mantidas sob agitação a 36°C .

Uma hora após o tratamento com solução hipertônica ou solução isotônica, novamente esses animais foram separados aleatoriamente entre os grupos que receberam injeção intratraqueal de bactérias ou solução isotônica (ver Tabela 1). Os animais foram rapidamente anestesiados, a traquéia foi canulada sob visão direta e foi realizada uma infusão intratraqueal de 200uL da suspensão de *E.coli*, preparada em solução estéril de PBS. O grupo controle recebeu apenas PBS intratraqueal. A suspensão bacteriana foi estimada através de um espectrofotômetro a 540 nm para obter $1,1 \times 10^5$ bact/mL.

Após o procedimento, os animais foram mantidos em descanso por quatro horas. Ao final desse período foram sacrificados por overdose de pentobarbital.

Os animais foram então separados em grupos conforme o tratamento e infusão empregados, como segue :

Tabela 2. A tabela mostra os diferentes grupos experimentais conforme o tratamento administrado. Grupo **Sham** não houve choque, não houve solução de reposição e a injeção intra-traqueal foi com PBS. **EC** não houve choque, não houve solução de reposição e a injeção intra-traqueal foi com *E.coli*. **SS** houve choque, a solução de reposição foi solução isotônica e a injeção intra-traqueal foi PBS. **SEC** houve choque, a solução de reposição foi solução isotônica e a injeção intra-traqueal foi *E.coli*. **HS** houve choque, a solução de reposição foi solução hipertônica e a injeção intra-traqueal foi PBS. **HEC** houve choque, a solução de reposição foi solução hipertônica e a injeção intra-traqueal foi *E.coli*

Grupo	Choque	Solução Reposição	Injeção Intra-traqueal
Sham	Não	Não	PBS
EC	Não	Não	<i>E. coli</i>
SS	Choque	NaCl – 0,9%	PBS
SEC	Choque	NaCl – 0,9%	<i>E. coli</i>
HS	Choque	NaCl – 7,5%	PBS
HEC	Choque	NaCl – 7,5%	<i>E. coli</i>

3.6 Lavado broncoalveolar (BAL)

Imediatamente após o sacrifício foi realizada traqueotomia e os pulmões foram perfundidos por uma cânula contendo PBS gelado. Primeiramente, foram realizadas duas perfusões consecutivas com 10mL de PBS. Posteriormente, mais três alíquotas de 5 mL cada foram perfundidas,

perfazendo um total de 25 mL, sendo que na última perfusão houve massagem na região dos pulmões. Foram recuperados aproximadamente 80% do volume total. O fluido (BAL) foi centrifugado a 3.000 rpm por 10 minutos e o *pellet* de células resuspendido em meio de cultura RPMI sem soro. Uma alíquota dessa suspensão de células foi utilizada na confecção de 3 lâminas para contagem de neutrófilos e o restante semeado em placas de cultura de 6 poços, mantidos em estufa a 37° C por duas horas. Em seguida, o meio foi aspirado e a fração aderente de células foi ressuspendida em 1 mL de TRIzol e armazenado a -80°C para posterior processamento e análise.

3.6.1 Contagem de leucócitos do lavado broncoalveolar

Uma alíquota da suspensão de células do lavado broncoalveolar foi utilizada na confecção de três lâminas para contagem de leucócitos. Essas lâminas foram coradas em solução de hematoxilina-eosina e deixadas a temperatura ambiente até secagem completa. Após esse tempo, realizada a contagem de neutrófilos, linfócitos e macrófagos em microscópio óptico. As células foram identificadas por suas características morfológicas e contadas em vários campos perfazendo um total de 100 células.

3.7 Determinação de RNAm para TLR-2 e -4, CD40 e CD40L por RT-PCR

Para verificar possíveis alterações na expressão de moléculas envolvidas nas imunidades inata (TLR-2 e TLR-4) e adquirida (CD40 e CD40L) após choque, reperfusão e instilação de *E. coli*, foram realizadas análises de transcritos de RNAm nas frações aderentes de células do lavado broncoalveolar obtidas conforme descrito acima.

Para a extração do RNA total das células, foram adicionados 200 µL de clorofórmio para cada mL inicial de TRIzol. Após homogeneização e incubação por 10 minutos em temperatura ambiente, a mistura foi centrifugada por 15 minutos a 12.000 X g a 4°C. A fase superior foi então transferida para um outro tubo e 500µl de isopropanol foram adicionados por mL de TRIzol inicial, seguindo-se incubação por 10 minutos em temperatura ambiente e centrifugação por 10 minutos a 12.000 X g a 4°C. O sobrenadante foi desprezado, e ao *pellet* foi adicionado 1mL de etanol 70% (preparado com água contendo DEPC, dietilpirocarbonato, um inibidor de RNAase) para cada mL inicial de TRIzol, sendo este novamente centrifugado por 5 minutos a 7500 X g a 4°C. O álcool foi descartado, o *pellet* de RNA total resuspendido em água/DEPC e armazenado a -80°C por 24 horas antes de ser quantificado por espectrofotometria (260nm). O material foi finalmente submetido a RT-PCR com *primers* específicos para a obtenção do DNA complementar (cDNA) de TLR2, TLR4 e CD40, CD40L. A integridade dos géis foi averiguada em gel de agarose 1% a 80V por 50 minutos.

Tabela 3. Seqüência dos primers e procedimentos usados na amplificação do RNAm para TLRs, CD40 e CD40L utilizados em nossos experimentos

Primers	denaturation	annealing	elongation	cycles	bp
TLR4 sense: 5' AAG AGC TGG AAT ACC TGG AC 3'	94 °C	61,5 °C	72 °C	27	620b
TLR4 antisense: 5' GAA ATG CTA CAG TGG CTA CC 3'	3 min	1 min	30seg		p
TLR2 sense: 5' CAG CTG GAG AAC TCT GAC CC 3'	94 °C	60 °C	72 °C	27	193b
TLR2 antisense: 5' CAA AGA GCC TGA AGT GGG AG 3'	3 min	1 min	30seg		p
CD40 sense: 5' CTC AGG CGA ATT CTC AGC TC 3'	94 °C	65,8 °C	72 °C	30	250b
CD40 antisense: 5' GCA G GG TTG GCA GAC AGT AT 3'	3 min	1 min	30seg		p
CD40L sense: 5' TGA GGA CAA CAG TAA TGC AG 3'	94 °C	66,5 °C	72 °C	33	247b
CD40L antisense: 5' ATT CGC TGC CCT GAG TAA GA 3'	3 min	1 min	30seg		p

Todas as reações foram acompanhadas de um controle negativo e foram analisadas por eletroforese em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídeo. As bandas foram quantificadas por densitometria, usando software específico.

3.8 Análise histológica pulmonar

A fim de se caracterizar a lesão tecidual foi realizado estudo anatomopatológico do pulmão. Após 4 horas da injeção de *E.coli* os animais foram anestesiados e submetidos à traqueotomia e a ventilação pulmonar mecânica. Em seguida, foi feita laparotomia medial e os animais foram sacrificados por exsanguinação, através da secção dos grandes

vasos abdominais (aorta e cava inferior). Foi realizada a perfusão dos pulmões com solução fisiológica (NaCl 0.9%), via ventrículo direito, utilizando-se um jelco 22 G (0.9 x 25 mm) conectado a um sistema de perfusão. O pulmão foi rapidamente removido e imerso em formol a 10%. Os fragmentos do órgão foram fixados, desidratados em gradiente crescente de álcoois e incluídos em blocos de parafina. Cortes de 4-6 μ m foram montados sobre lâmina histológica, corados pela técnica de hematoxilina-eosina e analisados ao microscópio de luz Leica DMLB. Foram feitas análises histológicas de animais controle (grupo SHAM), animais que foram submetidos somente à exposição da bactéria (grupo EC) e dos animais com a lesão de I-R, com tratamento com solução isotônica e exposição a bactéria ou não, com tratamento com solução hipertônica e exposição a bactéria ou não. A celularidade alveolar foi avaliada pela contagem de neutrófilos (PMN) por área de septo alveolar. As lâminas foram analisadas no programa Leica Qwin V3. Foram considerados para quantificação de 10 a 15 campos. Foram analisadas 5 lâminas por grupo experimental. O resultado representa a média dos 10 campos de cada lâmina, representando n=5 por grupo experimental.

3.9 Análise Estatística

A análise estatística utilizada para a comparação entre os grupos foi com testes estatísticos paramétricos do tipo teste t de Student (duas séries de dados) ou análise de variância (ANOVA, mais de duas séries de dados). Foi considerado o valor de $p < 0,05$ como sendo estatisticamente significativo, representado pelo sinal de asterisco (*).

Os resultados estão expressos como a média $\pm$ erro padrão da média, para cada grupo.

4. Resultados

4.1 Parâmetros hemodinâmicos: Pressão Arterial Média (PAM)

A Tabela 2 mostra a evolução da pressão arterial durante o experimento nos diferentes grupos experimentais. Previamente à indução do choque hemorrágico, os animais em todos os grupos apresentaram valores semelhantes de PAM, acima de 90 mmHg. Durante a retirada de sangue, a PAM foi reduzida a cerca de 40 mmHg e assim manteve-se até o final do sangramento. É necessário notar que, em nosso modelo experimental o volume retirado é fixo. Mesmo assim, a resposta pressórica de todos os animais foi bastante homogênea. Não houve diferença entre a PAM ao final do sangramento nos quatro grupos que foram submetidos ao sangramento controlado. Também não foi observada diferença entre a frequência cardíaca em todos os grupos experimentais antes, durante, ou após tratamento do sangramento.

O tratamento com solução isotônica para reposição volêmica promoveu recuperação imediata da pressão arterial, alcançando os níveis medidos antes do sangramento. Não houve diferença entre os animais que, em seguida ao tratamento do choque receberam PBS ou *E.coli* intratraqueal (grupos SS e SEC). Os animais tratados com salina hipertônica exibiram recuperação semelhante da pressão arterial, alcançando os níveis

pressóricos observados antes da manipulação. Novamente não foi detectada diferença entre os grupos que foram randomizados e receberam PBS ou *E. coli* intratraqueal (grupos HS e HEC).

O volume de solução salina repostado foi baseado nos trabalhos pioneiros de Velasco et al. (Velasco, Pontieri et al. 1980; Velasco et al. 1989), e o volume infundido de cada solução foi calculado de tal maneira que todos os grupos receberam a mesma quantidade de sódio total ao final da reposição volêmica. Assim, podemos concluir que a solução hipertônica exerce um efeito semelhante à solução isotônica na recuperação dos parâmetros hemodinâmicos após choque hemorrágico.

Tabela 4. Pressão arterial média, em mmHg (média + EPM), em animais submetidos a choque hemorrágico por 60 minutos e distribuídos nos diferentes grupos conforme o tratamento administrado após o choque. Não houve diferença significativa nas variáveis hemodinâmicas entre os grupos (SS, SEC, HS e HEC) submetidos ao sangramento e reposição volêmica. O número entre parênteses corresponde ao momento em que foram realizadas as medidas, como mostrado na Figura 1

	Basal	Choque	Depois tratamento
Correspondente na Figura 1	(1)	(2)	(3)
SS	104.8 ± 2.6	39.0 ± 2.4	88.9 ± 3.4
SEC	110.1 ± 2.5	45.6 ± 3.5	95.5 ± 7.3
HS	106.3 ± 3.4	41.5 ± 8.1	104.4 ± 6.0
HEC	107.5 ± 3.4	41.8 ± 4.1	106.8 ± 6.0

4.2 Histologia Pulmonar

Com o objetivo de caracterizar a lesão pulmonar induzida pela I-R, associada ou não a um segundo insulto, foram analisados os pulmões dos animais dos diferentes grupos experimentais.

As Figuras 2A e 3A representam a estrutura de um pulmão normal, com arquitetura preservada, septos delgados, infiltrado inflamatório septal virtualmente ausente e nenhum infiltrado alveolar (grupo SHAM). Após instilação traqueal de *E.coli* (Figuras 2B e 3B), ocorre grande infiltrado inflamatório na região septal, com predominância de neutrófilos. Neutrófilos são também observados dentro dos alvéolos, o que caracteriza o quadro de pneumonia (grupo EC).

Depois do choque e reperfusão com solução isotônica, um proeminente infiltrado inflamatório foi observado, principalmente na região septal (Figuras 2C e 3C grupo SS). Podemos observar alargamento dos septos interalveolares, com discreta congestão arteriolar e pouca ou nenhuma exsudação para dentro do alvéolo. Observa-se também predominância de células da linhagem monocítica no infiltrado inflamatório.

Quando *E.coli* foi injetada após reperfusão com solução salina (grupo SEC), um grande infiltrado neutrofílico foi observado na região alveolar, com exsudação abundante, marcante congestão arteriolar e espessamento septal (Figuras 2D e 3D). A resposta inflamatória observada no grupo SEC, que sofreu isquemia e reperfusão prévia, foi muito mais exuberante do que aquela observada no grupo EC (Figura 3D vs. Figura 3B), validando o nosso modelo de duas agressões.

Quando a reperfusão após o choque foi realizada com a solução hipertônica (grupo HS), o infiltrado inflamatório foi menos proeminente, comparado com o grupo que recebeu solução isotônica (Figuras 2E e 3E). A região septal apresentou-se menos espessada, com menor congestão arteriolar e menor formação de exsudato. Também observou-se um menor número de células inflamatórias, particularmente neutrófilos. Quando, após a reperfusão com solução hipertônica, se instilou bactéria intratraqueal (grupo HEC), a resposta inflamatória observada também foi menos exuberante, quando comparada ao grupo SEC. Os pulmões dos animais do grupo HEC apresentavam septos mais delgados e menor formação de exsudato que os dos animais do grupo SEC. O dado mais interessante e evidente nesse grupo era o menor número de neutrófilos que migraram para dentro dos alvéolos, acompanhado de menor exsudato intraalveolar, sugerindo uma menor agressão tecidual.

Com o objetivo de se quantificar os dados qualitativos descritos acima realizou-se a contagem de células inflamatórias presentes nos cortes histológicos (Figura 4), conforme descrito em Métodos.

Nos pulmões de animais do grupo SHAM, detectamos uma pequena quantidade de neutrófilos, exclusivamente nos septos interalveolares e nenhum neutrófilo dentro dos alvéolos. Choque e reperfusão, *per se*, ocasionou um aumento da presença de neutrófilos, aumento este restrito aos septos interalveolares. O número de neutrófilos presentes nos septos após I-R era mais de três vezes o número de neutrófilos encontrado nos pulmões dos animais SHAM e não houve diferença entre a infiltração septal

de neutrófilos nos grupos que receberam isotônica ou hipertônica como líquido de reperfusão.

Nos grupos de animais desafiados com bactérias, o infiltrado neutrofilico de maior intensidade foi observado nos animais submetidos ao choque e reperfundidos com solução isotônica (grupo SEC), tanto na região septal, como na alveolar. Em contraste, animais que receberam solução hipertônica após o choque e foram instilados com bactérias (grupo HEC), apresentaram, comparativamente, tendência a um menor infiltrado no septo. Finalmente, este grupo também exibiu marcada diminuição na contagem de polimorfonucleares nos alvéolos (cerca de quatro vezes menor em relação ao grupo SEC).

O conjunto de dados acima inicialmente valida o nosso modelo de duas agressões, já que o choque hemorrágico seguido de reperfusão com solução isotônica predispõe os animais, quando submetidos a uma segunda agressão (*E. coli*) (grupo SEC), a uma reação inflamatória mais exuberante, quando comparado com os animais que não sofreram a primeira agressão (grupo EC). Outro achado importante é o fato de animais reperfundidos com solução hipertônica e expostos a uma segunda agressão (grupo HEC) apresentarem uma resposta inflamatória mais branda quando comparada com os animais reperfundidos com solução isotônica após o sangramento (grupo SEC).

A seguir, iniciamos uma investigação sobre os possíveis mecanismos moleculares responsáveis tanto pelo “priming” da resposta inflamatória após I-R, quanto pelos efeitos da solução hipertônica no fenômeno.

Figura 2.

Figura 3.

Figura 4.

Figuras 2, 3 e 4:

Os painéis A, nas Figuras 2, 3 e 4, representam a estrutura de um pulmão normal, com arquitetura preservada, septos delgados, infiltrado inflamatório septal virtualmente ausente e nenhum infiltrado alveolar (Grupo Sham). Painéis B, nas três figuras, mostram um pulmão de rato depois da instilação traqueal de *E.coli* (Grupo EC), com grande infiltrado inflamatório na região septal com predominância de neutrófilos. Neutrófilos também são observados dentro dos alvéolos, caracterizando um quadro de pneumonia. Os Painéis C, representam os pulmões de animais submetidos a choque e reperfusão com solução isotônica (Grupo SS), seguido por injeção de PBS, mostrando infiltrado inflamatório foi observado, principalmente na região septal. Podemos observar alargamento dos septos interalveolares, com discreta congestão arteriolar e pouca ou nenhuma exsudação para dentro do alvéolo. Observa-se predominância de células da linhagem monocítica no infiltrado inflamatório. Os Painéis D são representativos do grupo de animais que foram tratados com solução isotônica e desafiados com *E. coli* (Grupo SEC). Podemos observar um grande infiltrado neutrofílico na região alveolar, com exsudação abundante, marcante congestão arteriolar e espessamento septal. O processo inflamatório é mais importante que no grupo EC (Painéis B), confirmando nosso modelo de lesão de duas agressões. Os Painéis E mostram pulmões de animais que sofreram choque e foram reperfundidos com solução hipertônica (Grupo HS). Comparativamente ao grupo SS (Painéis C), observa-se um infiltrado menos proeminente, com a região septal menos espessada, menor congestão arteriolar e menor formação de exsudato.

Também observa-se um menor número de células inflamatórias, particularmente neutrófilos. Os Painéis F, em todas Figuras, são representativos de pulmões de animais que foram submetidos ao choque, reperfundidos com solução hipertônica e posteriormente expostos à *E.coli* (Grupo HEC). A resposta inflamatória foi menos exuberante, que a observada no grupo reperfundido com solução isotônica (Painéis D) com septos mais delgados e menor formação de exsudato e menor infiltração de neutrófilos, principalmente no espaço alveolar.

Figuras 2, 3 e 4 apresentam cortes histológicos de pulmões, corados com hematoxilina-eosina e observados em microscópio óptico com aumento de 100x (Figura 2), 200x (Figura 3) e 400X (Figura 4).

Figura 5. Representação quantitativa dos neutrófilos em pulmão de ratos na região septal e alveolar. Nos grupos onde só ocorreu a lesão de I-R (SS e HS) houve infiltração de neutrófilos somente na região septal. Na presença da bactéria (EC), os neutrófilos foram detectados também na região alveolar. Neutrófilos alveolares são encontrados em grande número no grupo onde a instilação da bactéria seguiu-se à lesão de I-R (SEC), comparado com o grupo EC, sugerindo a lesão das duas agressões nos pulmões. No grupo em que houve a lesão de I-R com solução hipertônica e a bactéria (HEC), ocorreu infiltrado neutrofílico 4 vezes menor comparado com o grupo SEC. Dados representam a media $\pm$ EPM, n=5.

*p < 0,05 vs. SHAM, infiltrado septal

**p < 0,05 vs. SHAM, infiltrado alveolar

*§p < 0,05 vs. EC, infiltrado septal

**§§p < 0,05 vs. EC, infiltrado alveolar

4.3 Análise do lavado broncoalveolar

As células obtidas no lavado broncoalveolar (BAL) foram identificadas pelas suas características morfológicas ao esfregaço, corado com hematoxilina-eosina.

- Neutrófilos foram identificados como células grandes, com citoplasma acidófilo (róseo), núcleo com vários lóbulos (2-3 lóbulos) conectados com filamento estreito.
- Linfócitos como células pequenas, com citoplasma escasso, núcleo redondo e podendo conter grânulos.
- Macrófagos como células grandes, com citoplasma acidófilo e núcleo redondo, podendo apresentar vacúolos no citoplasma.

A porcentagem de células identificadas em cada grupo experimental está apresentada na Tabela 2. No grupo SHAM observamos um predomínio de linfócitos, com presença pequena de neutrófilos. Os grupos que sofreram somente I-R, sem desafio com bactérias apresentavam ainda um predomínio de linfócitos, embora uma maior porcentagem de neutrófilos já pudessem ser identificados no BAL. Não havia diferença entre os grupos SS e HS, em relação à composição celular do BAL.

Quando os animais foram desafiados com bactérias vivas, houve uma mudança importante na composição do BAL, como era de se esperar. Os neutrófilos passam a predominar, sendo a grande maioria das células recuperadas, caracterizando uma pneumonia aguda, em consonância com os achados histológicos pulmonares.

Não se observou diferenças significativas entre os tipos celulares recuperados no BAL nos grupos EC, SEC e HEC..

Tabela 5. Diferencial das células recuperadas no BAL. Observa-se um aumento de neutrófilos em todos os grupos, comparados ao grupo SHAM. Não existe diferença entre os grupos EC, SEC e HEC em relação à composição do BAL

Grupo	Neutrófilos (%)	Linfócitos (%)	Macrófagos (%)
Sham	9 ± 5	85 ± 3	6 ± 4
EC	85 ± 3	10 ± 3	5 ± 2
SS	25 ± 9	75 ± 9	0 ± 0
SEC	67 ± 16	32 ± 15	1 ± 0.4
HS	39 ± 10	60 ± 11	1 ± 0.5
HEC	71 ± 20	26 ± 13	3 ± 0.5

4.4 Expressão de TLR-2 e TLR-4 nas células do lavado broncoalveolar

Com o objetivo de determinar os mecanismos responsáveis pelos achados histológicos, passamos a investigar alguns mecanismos envolvidos na resposta imune inata e adquirida que possam sofrer influência da lesão de isquemia-reperfusão. Inicialmente investigamos a expressão de TLR2 e 4 nas células do BAL, por RT-PCR semi-quantitativa.

As células do BAL do grupo SHAM apresentam uma expressão baixa de RNAm para TLR-2. A lesão de isquemia-reperfusão isoladamente, altera de maneira não significativa a transcrição do RNAm para TLR2, como observado na Figura 6. Também não existe diferença entre os grupos que foram reperfundidos com solução isotônica ou hipertônica (SS e HS).

Por outro lado, um marcado incremento nos valores de expressão de TLR-2 deu-se na presença de *E. coli*. A pneumonia causada pela injeção da bactéria intratraqueal aumenta a expressão de RNAm para TLR-2 de aproximadamente 8 vezes. É interessante notar que a transcrição de RNAm para TLR-2 não sofre interferência de uma lesão de isquemia-reperfusão prévia, nem do fluido usado na reperfusão. Os grupos SEC e HEC não apresentam diferença entre si, nem quando comparados ao grupo EC.

Em relação ao outro TLR estudado, o TLR-4, observamos um diferente padrão de expressão. A lesão de I-R, por si só, foi suficiente para elevar a expressão de RNAm acima do baixo nível basal apresentado nas células do BAL do grupo SHAM (Figura 7). No entanto não houve diferença

que possa ser atribuída ao fluido de reperfusão utilizado. Os valores encontrados nos grupos SS e HS não são diferentes.

A pneumonia por bactérias gram-negativas aumenta a expressão de RNAm para TLR-4 de maneira bastante significativa. No entanto, quando os animais eram submetidos previamente ao choque e reperfundidos com solução salina isotônica, a exposição a bactérias não foi mais capaz de induzir a um aumento na transcrição do RNAm para TLR-4 (Figura 5). Quando a reperfusão era efetuada com solução salina hipertônica, o fenômeno ainda era evidente, com diminuição significativa no grupo HEC, quando comparado ao grupo EC. O grupo HEC, entretanto, apresentava maior expressão de RNAm para TLR-4 que o grupo SEC, sugerindo que a solução hipertônica foi capaz de corrigir parcialmente, a disfunção da expressão de TLR-4 causada pela I-R.

Em conjunto, os dados sobre a expressão de TLRs em células de BAL indicam que TLR-2 e TLR-4 são regulados de modo bastante distinto em função da ocorrência de I-R, da tonicidade do líquido usado na reperfusão e da segunda agressão (pneumonia).

Figura 6. Expressão de RNAm para TLR-2 em células do lavado broncoalveolar.

O grupo SHAM apresenta níveis basais baixos de RNAm para TLR-2 e que a expressão de RNAm para esta molécula não aumentou significativamente nos grupos que sofreram lesão por I-R (SS e HS). Na presença de *E. coli* (EC) houve um marcado incremento nos valores de expressão de TLR-2. A lesão de isquemia-reperfusão, previamente à exposição a bactérias, não altera o perfil de expressão, independente do fluido usado na reperfusão.

Barras representam a média $\pm$ EPM, $n=5$ em cada grupo.

* $p < 0.05$ vs Sham, SS e HS

** p não significante vs Sham.

Figura 7. Expressão de RNAm para TLR-4 em células do lavado broncoalveolar

A expressão de RNAm para TLR-4 em níveis basais (grupo SHAM), é ainda mais baixa que a observada pra TLR-2. A lesão de I-R foi suficiente para elevar a expressão de RNAm, independente do fluido utilizado, pois não houve diferença significativa entre os grupos SS e HS. Uma elevada expressão de TLR-4 foi encontrada no grupo (EC). Nos animais submetidos previamente à I-R e depois desafiados com *E. coli*, houve diminuição na transcrição do RNAm para TLR-4. No entanto, essa diminuição era menos evidente quando a reperfusão era efetuada com solução salina hipertônica. Dados representam a media $\pm$ EP, n=5. *p < 0.05 vs Sham; **p < 0.05 vs EC.

4.5 Expressão de CD40 e CD40L nas células do lavado broncoalveolar

A via de sinalização associada ao receptor de membrana CD40 e seu ligante CD40L é fundamental para o funcionamento das respostas imunes inata e adaptativa, e foi também investigada neste trabalho.

O receptor CD40 tem uma expressão basal acima da expressão basal dos TLRs (grupo SHAM) e que foi pouco afetada pela lesão de I-R. Quando os ratos foram submetidos ao choque hipovolêmico e reperfundidos com solução isotônica ou hipertônica, não houve aumento na expressão do receptor, sugerindo que a solução de reposição não afeta a expressão de CD40 (Figura 8).

A pneumonia bacteriana causou um aumento de quatro vezes nos níveis de RNAm para CD40 em relação ao nível basal (Figura 8). Semelhante ao ocorrido com o TLR-4, lesão de isquemia e reperfusão anterior ao desafio bacteriano impede que ocorra um aumento na expressão de RNAm para TLR-4. Diferentemente do que aconteceu com o TLR-4, a solução usada na reperfusão não modifica essa resposta, como demonstrado pelo fato dos grupos SEC e HEC não apresentarem diferença.

Os dados obtidos na análise do ligante de CD40 (CD40L) foram essencialmente similares (Figura 9). Ocorre um aumento com a presença das bactérias, porém a isquemia-reperfusão prévia bloqueia essa elevação. Novamente, como observado para o receptor CD40, a tonicidade do fluido de reperfusão não altera a expressão de CD40L.

Em conjunto, estes resultados indicam que, neste modelo experimental, ocorre aumento da expressão e, portanto da atividade, da via de sinalização CD40-CD40L nos animais onde foi induzida uma pneumonia por bactérias gram-negativas. Os mecanismos que levam *E. coli* a estimular o aumento de fatores ligados à via CD40 estão suprimidos em animais submetidos que sofreram I-R, quer eles tenham sido tratados com solução isotônica ou hipertônica.

Figura 8. Quando os ratos foram submetidos a I-R com solução isotônica ou hipertônica (SS e HS), não houve aumento na expressão do receptor, sugerindo que a solução de reposição não afeta a expressão de CD40. A pneumonia bacteriana (EC) causou um aumento de quatro vezes nos níveis de RNAm para CD40 em relação ao nível basal (Sham). Entretanto, independentemente da solução de reposição volêmica empregada após o choque, o posterior estímulo secundário representado pela injeção de *E. coli* não mais induziu o aumento de CD40 nestas células (SEC e HEC). Dados representam a média $\pm$ EP, $n=5$. * $p < 0.05$ vs Sham, SS, SEC, HS e HEC.

Figura 9. A lesão de I-R não afetou a expressão de RNAm para CD40L (SS e HS). A pneumonia bacteriana (EC) causou um aumento de duas vezes nos níveis de RNAm para CD40L em relação ao nível basal (Sham). O posterior estímulo secundário representado pela injeção de *E. coli*, independente do tratamento empregado (SEC e HEC) não mais induziu o aumento de nos níveis de RNAm para CD40L. Dados representam a média $\pm$ EP, $n=5$. * $p < 0.05$ vs Sham, SEC e HEC.

5. Discussão

O choque hemorrágico leva à isquemia tecidual e, se não adequada e rapidamente tratado, à necrose do tecido isquemiado. Entretanto, a lesão de isquemia e reperfusão global, causada pela reposição volêmica rápida e vigorosa nesses pacientes, também pode exercer efeitos deletérios (Anaya-Prado, Toledo-Pereyra et al. 2002).

Os mecanismos complexos da lesão de isquemia e reperfusão ainda não estão completamente esclarecidos. Conhecemos apenas algumas peças desse quebra-cabeças: produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, ativação endotelial, com aumento da expressão de moléculas de adesão, levando a uma maior infiltração leucocitária no tecido reperfundido, alteração do metabolismo de cálcio (Anaya-Prado, Toledo-Pereyra et al. 2002). A resposta imune parece ser fundamental nesse fenômeno, porém a influência da lesão de isquemia-reperfusão nas células do sistema imune e nos mecanismos de sinalização utilizados por essas células ainda não foram completamente elucidados.

Assim, tentamos desenvolver um modelo de lesão de duas agressões (“two-hit injury”) com dois objetivos principais:

- determinar o efeito da isquemia-reperfusão nas células e função do sistema imunológico, observando a resposta imune a uma segunda agressão
- buscar estratégias que possam atenuar os efeitos da reperfusão em tecidos isquemiados.

Considerações sobre o modelo experimental

Inicialmente, algumas considerações sobre o nosso modelo são necessárias.

Não existe consenso entre os investigadores sobre qual o melhor modelo animal para pesquisa do choque e ressuscitação (Majde 2003). Modelos de animais acordados, como o que foi utilizado aqui, são os mais aceitos, uma vez que englobam os artefatos da anestesia, como o bloqueio da resposta simpatoexcitatória (Peng et al. 2006).

Outro dado é que a mortalidade em nosso modelo não foi alta (por volta de 10%). Como nosso objetivo era estudar a fisiopatologia da lesão de I-R e não a efetividade do nosso tratamento, essa baixa mortalidade mostrou que nossa lesão de I-R era agressiva, sem cruzar a barreira que a tornaria irreversível (se isso ocorresse, teríamos uma mortalidade muito maior).

Finalmente, devemos considerar o fato de que o volume e fluxo de sangramento foram uniformes para todos os animais. Podem ocorrer críticas ao fato desses parâmetros não terem sido individualizados para se alcançar níveis pressóricos pré-determinados. Entretanto, embora tivéssemos mantido constante o volume retirado, nossos dados hemodinâmicos são bastante homogêneos, mostrando que o sangramento efetuado ocasionou respostas muito uniformes.

Lesão de duas agressões

Escolhemos como órgão estudado o pulmão, por ser o alvo mais sensível à lesão de duas agressões. A SARA é uma situação clínica importante, que ocorre comumente como complicação de uma lesão de isquemia-reperusão global. A lesão pulmonar aguda é uma das principais complicações observadas após o choque hemorrágico. Em seu espectro mais grave, a SARA, é caracterizada clinicamente por hipoxemia severa, infiltrados difusos à avaliação radiológica, sem sinais de hipertensão capilar pulmonar (Bernard, Artigas et al. 1994). Do ponto de vista microscópico, observa-se infiltrado neutrofílico, presença marcante de exsudato na região alveolar, aumento da espessura do interstício e congestão capilar (Fernandes, Zin et al. 2005)

Em nosso modelo experimental pudemos caracterizar adequadamente todos esses achados. A lesão única, causada pela inoculação bacteriana diretamente na traquéia (grupo EC), apresenta achados histológicos semelhantes aos descritos por outros autores que caracterizaram a pneumonia grave por bactérias gram-negativas (Russo et al. 2000). Pudemos detectar crescimento bacteriano, lesão à arquitetura pulmonar e resposta inflamatória caracterizada por infiltrado neutrofílico, exsudato alveolar espessamento intersticial e congestão capilar.

Quando essa agressão era precedida por choque e reposição volêmica com solução salina (grupo SEC), estes aspectos mostraram-se bastante exacerbados. Nos pulmões desses animais pudemos demonstrar um exuberante infiltrado neutrofílico, presente não só nos septos, mas

também no interior dos alvéolos, um espessamento septal importante, congestão arteriolar e grande quantidade de material exsudativo, tanto no interior dos alvéolos quanto nos septos. Esses achados eram morfológicamente diferentes das lesões causadas somente por isquemia-reperfusão (nas quais o interior dos alvéolos não era comprometido), ao passo que diferiam da lesão única direta mais pela intensidade da resposta, caracterizando assim, adequadamente, o nosso modelo de duas agressões.

Outros autores publicaram modelos similares, onde ratos sofreram sangramento controlado e reperfusão com solução de Ringer lactato e em seguida foram expostos ao LPS intratraqueal (Fan et al. 1998). Embora a resposta histológica nesse modelo seja semelhante à descrita por nós, o uso de bactérias vivas provoca uma reação mais complexa do ponto de vista molecular, como será visto adiante.

Em resumo, podemos afirmar que o nosso modelo foi eficaz em reproduzir uma lesão de duas agressões, o que nos possibilitou o estudo da resposta imune na I-R.

Mecanismos da lesão de duas agressões

Os mecanismos responsáveis pela lesão das duas agressões têm sido alvo de extensa investigação (Rotstein 2003). Ativação de neutrófilos (Fan, Marshall et al. 1998), aumento na produção de citocinas (Fan et al. 2000) e estresse oxidativo (Eppinger et al. 1997) foram propostos como fatores que pré-dispõem a uma lesão pulmonar mais severa no contexto de isquemia e reperfusão. Em outro trabalho realizado por nosso grupo

(Fernandes et al. 2006) mostramos não haver diferença na produção de espécies reativas de oxigênio e citocinas (IL-6, TNF- α , IL-10) depois da reperfusão com solução hipertônica comparado com a solução isotônica (Fernandes, Pontieri et al. 2006). Como um dos objetivos é investigar a ação da solução hipertônica, o presente estudo teve como alvo outros prováveis moduladores específicos da resposta imunoinflamatória, como os receptores toll-like e a via de sinalização CD40/CD40L.

Os receptores Toll-like

A percepção inicial de microrganismos pelo sistema imune é mediada por receptores referidos como “receptores de reconhecimento de patógenos” (PRRs - *pattern-recognition receptors*). Os PRRs reconhecem padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs - *pathogen-associated molecular patterns*), seqüências moleculares compartilhadas por um grande grupo de microorganismos (Janeway and Medzhitov 2002). Lipopolissacarídeo (LPS), presente na parede celular de bactérias gram-negativas, e ácido lipoteicoico, em parede de bactérias gram-positivas, são exemplos desses PAMPs (Medzhitov and Janeway 2000). Os receptores toll-like reconhecem esses PAMPs e funcionam como desencadeantes da resposta imune.

A sinalização realizada a partir de cada um dos diferentes receptores toll-like tem aspectos distintos, dependendo em grande parte das moléculas adaptadoras e cascatas de sinalização recrutadas para a tarefa (Kaisho and Akira 2004). Pode ocorrer, porém, resposta cruzada entre esses receptores (Akira and Takeda 2004). TLR-2, por exemplo, liga-se a fatores derivados de

bactérias gram positivas, enquanto TLR-4 liga-se ao LPS de bactérias gram negativas (Medzhitov and Janeway 2000), porém foi proposto que podem agir sinergisticamente em situações específicas durante a resposta inflamatória (Akira et al. 2001).

Neste estudo, verificamos maior expressão de RNAm para TLR-2 e TLR-4 nas células do lavado broncoalveolar de animais expostos a bactérias gram-negativas. Outros autores, em modelos diversos de pneumonia bacteriana descreveram resultados similares. Utilizando um modelo de pneumonia por germes gram-positivos, em coelhos, Kajikawa e colaboradores demonstraram expressão aumentada de TLR-2 e TLR-4 (Kajikawa et al. 2005). Concluíram, então, que o aumento de TLR-2 e -4 pode ter papel fundamental na imunidade inata em resposta à infecção bacteriana no pulmão, proporcionando condições para reconhecimento e remoção do patógeno.

Camundongos geneticamente deficientes em TLR-4 apresentaram menor sobrevivência, quando infectados por bactérias gram-negativas, comparados aos camundongos selvagens (e, portanto, expressando TLR4 em seus pulmões), confirmando assim o efeito protetor dos receptores toll-like (Branger et al. 2004).

Em nossas condições experimentais, a isquemia e reperfusão (grupos SS e HS), por si só, não induziu aumento na expressão de RNAm para TLR-4, comparado ao grupo SHAM. O interessante é que nos ratos que receberam solução isotônica e em seguida foram expostos a bactérias (grupo SEC), a I-R bloqueou o aumento da expressão do TLR4 induzida por

bactérias. Esses achados podem explicar, em parte, a maior lesão observada nesse grupo de animais. Uma menor expressão de TLR4, ocasionada pela I-R deixaria o pulmão mais susceptível à agressão bacteriana.

Nossos achados diferem dos resultados encontrados por Fan et al. Esses autores demonstraram que a injeção intratraqueal de LPS induziu rápida redução na expressão de RNAm para TLR-4 em pulmão de ratos, efeito também observado em macrófagos alveolares. Quando esses animais eram submetidos a choque e ressuscitação prévios, essa diminuição na expressão de TLR4 não era mais observada após exposição ao LPS (Fan, Kapus et al. 2002). Condições experimentais diferentes podem ser a causa para algumas das discrepâncias entre os estudos. A principal delas é o fato de termos utilizado bactérias vivas e Fan et al. o lipopolissacarídeo isolado. Bactérias gram-negativas íntegras contém outros antígenos além do LPS e podem estimular outras vias de sinalização que podem se sobrepor e trocar informações (An et al. 2002).

É importante salientar que a isquemia-reperfusão prévia não afetou a expressão de TLR-2, isto é, a expressão de RNAm para TLR2 foi a mesma nos grupos EC, SEC ou HEC. Esse fenômeno pode representar um mecanismo protetor, uma vez que uma cooperação entre os TLRs tem sido descrita (Ozinsky et al. 2000). Exemplo dessa colaboração é o que ocorre em células da microglia estimuladas com LPS e peptoglicano. Nesse modelo experimental, o TLR-4 é absolutamente necessário para iniciar a resposta imune inata, enquanto o TLR-2 participa na regulação de genes para codificar TNF- α e IL-12 em um quadro de endotoxemia severa. Essa

colaboração entre TLR-2 e -4 pode ser determinante na interface da resposta imune inata e adaptativa dentro do sistema nervoso central de animais infectados (Laflamme et al. 2003). O mesmo mecanismo pode estar ocorrendo nos pulmões de animais expostos à bactérias gram-negativas.

A via de sinalização CD40-CD40L

A maioria dos relatos sobre CD40/CD40L tiveram como alvo a sinalização bidirecional mediada pelo CD40 e seu ligante CD40L no desenvolvimento da resposta imune adquirida (Quezada et al. 2004). Assim, é muito melhor conhecida a função dessa via de sinalização dependentes mais desse tipo de imunidade, como, por exemplo, as doenças auto-imunes, a rejeição a transplantes e a aterosclerose .

Como a via de sinalização CD40/CD40L responde a bactérias gram negativas ainda permanece controverso. Em um modelo experimental de peritonite por bactérias gram-negativas, o CD40 desempenha importante papel no processo de infiltração por células mononucleares (Mazar et al. 2005). Também se sabe que em pacientes com síndrome de hiper-IgM (que não tem a via de sinalização CD40/CD40L funcionando), a incidência de pneumonias é bastante alta (Winkelstein et al. 2003). Por outro lado, existem, na literatura trabalhos mostrando que o bloqueio da via CD40 melhora a lesão pulmonar e a síndrome da insuficiência respiratória aguda induzidos por LPS (Hashimoto et al. 2004).

No presente estudo mostramos que houve um aumento da expressão de CD40 e CD40L depois que a bactéria *Escherichia coli* foi inoculada. Esse fenômeno é interessante, pois essas moléculas atuam na interface da

resposta imune inata e adquirida. Uma maior atividade dessa via de sinalização pode representar uma resposta bacteriana mais eficaz. Em pacientes sépticos a expressão de CD40 em monócitos circulantes correlacionou-se com um melhor prognóstico (Sugimoto et al. 2003).

Em nosso modelo experimental, a expressão de RNAm para CD40/CD40L não foi afetada pela lesão de isquemia-reperfusão isoladamente (grupos SS e HS). Quando houve exposição de bactérias após I-R, porém, os animais desafiados não foram capazes de elevar a transcrição de RNAm para CD40, nem para CD40L. Esses dados lembram o perfil de expressão dos TLRs e podem também representar um dos mecanismos pelos quais a I-R predispõe a uma maior lesão diante de uma segunda agressão.

Em outro modelo de lesão de I-R, o bloqueio da sinalização por CD40 inibiu o acúmulo de linfócitos no pulmão (Moore, Shirah et al. 2002), um dado que sugere um nível de complexidade maior na regulação dessa via de sinalização.

Nossos dados não nos permitem concluir qual o mecanismo exato pelo qual a I-R global predispõe a uma maior lesão pulmonar quando desafiado com uma segunda agressão. Os mecanismos de controle das vias de sinalização parecem ser bastante complexos, redundantes e interligados, dificultando a análise em um modelo *in vivo* como o usado por nós. No entanto, nossos dados experimentais abrem diversos caminhos e questões que poderão ser úteis no melhor entendimento desse fenômeno.

A solução hipertônica (NaCl 7,5%)

Nossos dados dão suporte à hipótese de que a solução hipertônica (HS), quando usada na ressuscitação do choque hemorrágico possui propriedades anti-inflamatórias.

O uso da solução hipertônica provou ser efetivo na restauração dos parâmetros hemodinâmicos (Velasco, Pontieri et al. 1980), pressão arterial e na perfusão tecidual (Rocha e Silva et al. 1987; Velasco, Rocha e Silva et al. 1989) em animais submetidos a choque hemorrágico. A solução hipertônica apresenta também várias vantagens sobre a solução isotônica, como o menor tempo gasto para infusão (crucial no tratamento de pacientes com sangramentos graves), facilidade de estoque e menos complicações relacionadas ao pequeno volume (edema pulmonar cardíaco, por exemplo). Mais recentemente, outros modelos experimentais de choque hemorrágico levantaram a hipótese de que a ressuscitação com solução hipertônica modula favoravelmente a evolução da lesão de isquemia-reperfusão (Rizoli, Kapus et al. 1998; Murao et al. 2000; Murao et al. 2003).

Alguns mecanismos para esse efeito anti-inflamatório da solução hipertônica são a inibição do *burst* respiratório em neutrófilos (Angle, Hoyt et al. 1998), a prevenção da expressão de moléculas de adesão em neutrófilos (Angle, Hoyt et al. 1998; Rizoli, Kapus et al. 1998; Deitch et al. 2003) e em células endoteliais (Oreopoulos et al. 2000), aumento da secreção de IL-10 e diminuição da produção de TNF- α em macrófagos de ratos expostos ao LPS (Powers, Woo et al. 2003).

Os dados mais consistentes sobre o efeito da solução hipertônica na lesão pulmonar mostram que o uso da hipertonidade diminui a infiltração de neutrófilos e diminui a expressão de ICAM-1 depois do choque e ressuscitação (Yada-Langui, Anjos-Valotta et al. 2004). Esses dados histológicos são bem congruentes com aqueles mostrados por nós nesse trabalho. O interessante é que os autores descrevem as alterações histológicas somente 24 horas após a ressuscitação e nós temos demonstrado que essas alterações são bem mais precoces. Em nosso modelo, 4 horas após a ressuscitação já havia um grande infiltrado neutrofílico, que foi maciçamente reduzido pela administração de solução salina hipertônica durante a ressuscitação.

Em modelos de duas agressões, mais parecidos ao que utilizamos, também foram descritos efeitos benéficos da solução hipertônica. Pulmões de ratos tratados com solução hipertônica apresentaram menor infiltrado inflamatório e menor susceptibilidade a lesões pulmonares depois de expostos a bacteremia induzida por punção e ligadura cecal (Coimbra, Hoyt et al. 1997). Nesse trabalho, os autores deixaram inequívoco que a solução hipertônica diminui a expressão de moléculas de adesão, diminuindo assim a migração de neutrófilos para o espaço intersticial e alveolar, onde eles teriam maior potencial de causar lesão pulmonar através da ativação de metaloproteinases.

Não está completamente claro como a solução hipertônica afeta a transcrição do RNAm. Sabe-se, porém, que a hipertonidade afeta a expressão de vários genes envolvidos na regulação de volume (Burg et al.

1996), bem como a cascata de sinalização envolvida na resposta ao estresse (Kultz et al. 1998). Entretanto, em nosso laboratório demonstramos que a solução hipertônica é capaz de modular a expressão de outros genes envolvidos na resposta inflamatória, como as proteínas de choque térmico (heat shock proteins – HSPs) e metaloproteinases.

Em conclusão, nossos dados dão suporte à hipótese de que a reperfusão com solução hipertônica pode ser uma ferramenta clínica útil na modulação da resposta inflamatória da isquemia e reperfusão. Os mecanismos de ação parecem ser múltiplos .

6. Conclusões

-
- Nosso modelo foi eficaz em reproduzir uma lesão de duas agressões, o que nos possibilitou o estudo da resposta imune na I-R.
 - O tratamento com solução hipertônica produz uma diminuição do processo inflamatório pulmonar em comparação ao grupo tratado com solução isotônica
 - Diminuição da expressão de TLR4 e da via de sinalização CD40/CD40L ocorrem em pulmões que sofreram I-R antes da agressão bacteriana e podem ser mecanismos responsáveis pela maior lesão pulmonar observada na injúria de duas agressões.

8. Referências

- Aderem, A. and R. J. Ulevitch (2000). "Toll-like receptors in the induction of the innate immune response." *Nature*. 406(6797): 782-7.
- Akira, S. and K. Takeda (2004). "Toll-like receptor signalling." *Nat Rev Immunol*. 4(7): 499-511.
- Akira, S., K. Takeda, et al. (2001). "Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity." *Nat Immunol*. 2(8): 675-80.
- An, H., Y. Yu, et al. (2002). "Involvement of ERK, p38 and NF-kappaB signal transduction in regulation of TLR2, TLR4 and TLR9 gene expression induced by lipopolysaccharide in mouse dendritic cells." *Immunology*. 106(1): 38-45.
- Anaya-Prado, R., L. H. Toledo-Pereyra, et al. (2002). "Ischemia/reperfusion injury." *J Surg Res*. 105(2): 248-58.
- Angle, N., R. Cabello-Passini, et al. (2000). "Hypertonic saline infusion: can it regulate human neutrophil function?" *Shock*. 14(5): 503-8.
- Angle, N., D. B. Hoyt, et al. (1998). "Hypertonic saline resuscitation diminishes lung injury by suppressing neutrophil activation after hemorrhagic shock." *Shock*. 9(3): 164-70.
- Armitage, R. J., W. C. Fanslow, et al. (1992). "Molecular and biological characterization of a murine ligand for CD40." *Nature*. 357(6373): 80-2.
- Ashbaugh, D. G., D. B. Bigelow, et al. (1967). "Acute respiratory distress in adults." *Lancet*. 2(7511): 319-23.
- Astiz, M. E., E. C. Rackow, et al. (1993). "Pathophysiology and treatment of circulatory shock." *Crit Care Clin*. 9(2): 183-203.

Baena, R. C., R. Prist, et al. (1990). "Osmotic-induced hemodynamic and ventilatory alterations after hypertonic resuscitation from hemorrhagic shock." *Eur Surg Res.* 22: 306.

Baena, R. C., I. T. Velasco, et al. (1989). "Early hemodynamic and ventilatory alterations after hypertonic resuscitation from hemorrhagic shock in dogs." *Circ Shock.* 27: 344.

Bernard, G. R., A. Artigas, et al. (1994). "The American-European Consensus Conference on ARDS. Definitions, mechanisms, relevant outcomes, and clinical trial coordination." *Am J Respir Crit Care Med.* 149(3 Pt 1): 818-24.

Bilkovski, R. N., E. P. Rivers, et al. (2004). "Targeted resuscitation strategies after injury." *Curr Opin Crit Care.* 10(6): 529-38.

Bochud, P. Y. and T. Calandra (2003). "Pathogenesis of sepsis: new concepts and implications for future treatment." *Bmj.* 326(7383): 262-6.

Boros, P. and J. S. Bromberg (2006). "New cellular and molecular immune pathways in ischemia/reperfusion injury." *Am J Transplant.* 6(4): 652-8.

Branger, J., S. Knapp, et al. (2004). "Role of Toll-like receptor 4 in gram-positive and gram-negative pneumonia in mice." *Infect Immun.* 72(2): 788-94.

Burg, M. B., E. D. Kwon, et al. (1996). "Osmotic regulation of gene expression." *Faseb J.* 10(14): 1598-606.

Calderhead, D. M., Y. Kosaka, et al. (2000). "CD40-CD154 interactions in B-cell signaling." *Curr Top Microbiol Immunol.* 245(2): 73-99.

Chaudry, I. H., A. Ayala, et al. (1990). "Hemorrhage and resuscitation: immunological aspects." *Am J Physiol.* 259(4 Pt 2): R663-78.

Coimbra, R., D. B. Hoyt, et al. (1997). "Hypertonic saline resuscitation decreases susceptibility to sepsis after hemorrhagic shock." *J Trauma*. 42(4): 602-6; discussion 606-7.

Coimbra, R., W. G. Junger, et al. (1996). "Hypertonic saline resuscitation restores hemorrhage-induced immunosuppression by decreasing prostaglandin E2 and interleukin-4 production." *J Surg Res*. 64(2): 203-9.

Cotran, R. S., V. Kumar, et al. (1999). *Pathologic basis of disease*. Philadelphia, PA, W.B. Saunders Company.

Daoussis, D., A. P. Andonopoulos, et al. (2004). "Targeting CD40L: a promising therapeutic approach." *Clin Diagn Lab Immunol*. 11(4): 635-41.

Deitch, E. A., H. P. Shi, et al. (2003). "Hypertonic saline resuscitation limits neutrophil activation after trauma-hemorrhagic shock." *Shock*. 19(4): 328-33.

Ding, L., J. M. Green, et al. (1995). "B7/CD28-dependent and -independent induction of CD40 ligand expression." *J Immunol*. 155(11): 5124-32.

Dobrovolskaia, M. A. and S. N. Vogel (2002). "Toll receptors, CD14, and macrophage activation and deactivation by LPS." *Microbes Infect*. 4(9): 903-14.

Duilio, C., G. Ambrosio, et al. (2001). "Neutrophils are primary source of O2 radicals during reperfusion after prolonged myocardial ischemia." *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 280(6): H2649-57.

Eppinger, M. J., G. M. Deeb, et al. (1997). "Mediators of ischemia-reperfusion injury of rat lung." *Am J Pathol*. 150(5): 1773-84.

Falk, J. L., J. F. O'Brien, et al. (1992). "Fluid resuscitation in traumatic hemorrhagic shock." *Crit Care Clin*. 8(2): 323-40.

Fan, E., D. M. Needham, et al. (2005). "Ventilatory management of acute lung injury and acute respiratory distress syndrome." *Jama*. 294(22): 2889-96.

- Fan, J., A. Kapus, et al. (2000). "Priming for enhanced alveolar fibrin deposition after hemorrhagic shock: role of tumor necrosis factor." *Am J Respir Cell Mol Biol.* 22(4): 412-21.
- Fan, J., A. Kapus, et al. (2002). "Regulation of Toll-like receptor 4 expression in the lung following hemorrhagic shock and lipopolysaccharide." *J Immunol.* 168(10): 5252-9.
- Fan, J., J. C. Marshall, et al. (1998). "Hemorrhagic shock primes for increased expression of cytokine-induced neutrophil chemoattractant in the lung: role in pulmonary inflammation following lipopolysaccharide." *J Immunol.* 161(1): 440-7.
- Fanslow, W. C., K. N. Clifford, et al. (1994). "Recombinant CD40 ligand exerts potent biologic effects on T cells." *J Immunol.* 152(9): 4262-9.
- Fernandes, A. B., W. A. Zin, et al. (2005). "Corticosteroids in acute respiratory distress syndrome." *Braz J Med Biol Res.* 38(2): 147-59.
- Fernandes, T. R., V. Pontieri, et al. (2006). "Hypertonic Saline Solution Increases the Expression of Heat Shock Protein 70 and Improves Lung Inflammation Early After Reperfusion in a Rodent Model of Controlled Hemorrhage." *Shock.* in press.
- Flaherty, J. T. and J. L. Zweier (1991). "Role of oxygen radicals in myocardial reperfusion injury: experimental and clinical evidence." *Klin Wochenschr.* 69(21-23): 1061-5.
- Gazitua, S., J. B. Scott, et al. (1969). "Effect of osmolarity on canine renal vascular resistance." *Am J Physiol.* 217(4): 1216-23.
- Gazitua, S., J. B. Scott, et al. (1971). "Resistance responses to local changes in plasma osmolality in three vascular beds." *Am J Physiol.* 220(2): 384-91.

Gilliam, A. C., I. B. Kremer, et al. (1998). "The human hair follicle: a reservoir of CD40+ B7-deficient Langerhans cells that repopulate epidermis after UVB exposure." *J Invest Dermatol.* 110(4): 422-7.

Giraldez, R. R., A. Panda, et al. (1997). "Decreased nitric-oxide synthase activity causes impaired endothelium-dependent relaxation in the postischemic heart." *J Biol Chem.* 272(34): 21420-6.

Graf, D., S. Muller, et al. (1995). "A soluble form of TRAP (CD40 ligand) is rapidly released after T cell activation." *Eur J Immunol.* 25(6): 1749-54.

Granger, D. N. (1999). "Ischemia-reperfusion: mechanisms of microvascular dysfunction and the influence of risk factors for cardiovascular disease." *Microcirculation.* 6(3): 167-78.

Hashimoto, N., T. Kawabe, et al. (2004). "CD40 plays a crucial role in lipopolysaccharide-induced acute lung injury." *Am J Respir Cell Mol Biol.* 30(6): 808-15.

Henn, V., J. R. Slupsky, et al. (1998). "CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells." *Nature.* 391(6667): 591-4.

Hollenbaugh, D., N. Mischel-Petty, et al. (1995). "Expression of functional CD40 by vascular endothelial cells." *J Exp Med.* 182(1): 33-40.

Iwasaki, A. and R. Medzhitov (2004). "Toll-like receptor control of the adaptive immune responses." *Nat Immunol.* 5(10): 987-95.

Janeway, C. A., Jr. and R. Medzhitov (2002). "Innate immune recognition." *Annu Rev Immunol.* 20: 197-216.

Kaisho, T. and S. Akira (2004). "Pleiotropic function of Toll-like receptors." *Microbes Infect.* 6(15): 1388-94.

Kajikawa, O., C. W. Frevert, et al. (2005). "Gene expression of Toll-like receptor-2, Toll-like receptor-4, and MD2 is differentially regulated in rabbits with *Escherichia coli* pneumonia." *Gene*. 344: 193-202.

Karmann, K., C. C. Hughes, et al. (1995). "CD40 on human endothelial cells: inducibility by cytokines and functional regulation of adhesion molecule expression." *Proc Natl Acad Sci U S A*. 92(10): 4342-6.

Kien, N. D., J. A. Reitan, et al. (1991). "Cardiac contractility and blood flow distribution following resuscitation with 7.5% hypertonic saline in anesthetized dogs." *Circ Shock*. 35(2): 109-16.

Kim, B. S., S. W. Lim, et al. (2005). "Ischemia-reperfusion injury activates innate immunity in rat kidneys." *Transplantation*. 79(10): 1370-7.

Kirk, A. D., L. C. Burkly, et al. (1999). "Treatment with humanized monoclonal antibody against CD154 prevents acute renal allograft rejection in nonhuman primates." *Nat Med*. 5(6): 686-93.

Korthauer, U., D. Graf, et al. (1993). "Defective expression of T-cell CD40 ligand causes X-linked immunodeficiency with hyper-IgM." *Nature*. 361(6412): 539-41.

Kreimeier, U. (2000). "Pathophysiology of fluid imbalance." *Crit Care*. 4 Suppl 2: S3-7.

Kukreja, R. C. and Y. Janin (1997). "Reperfusion Injury: Basic Concepts and Protection Strategies." *J Thromb Thrombolysis*. 4(1): 7-24.

Kultz, D. and M. Burg (1998). "Evolution of osmotic stress signaling via MAP kinase cascades." *J Exp Biol*. 201(Pt 22): 3015-21.

Laflamme, N., H. Echchannaoui, et al. (2003). "Cooperation between toll-like receptor 2 and 4 in the brain of mice challenged with cell wall components derived from gram-negative and gram-positive bacteria." *Eur J Immunol*. 33(4): 1127-38.

- Law, C. L., B. Wormann, et al. (1990). "Analysis of expression and function of CD40 on normal and leukemic human B cell precursors." *Leukemia*. 4(11): 732-8.
- Lazaar, A. L., Y. Amrani, et al. (1998). "CD40-mediated signal transduction in human airway smooth muscle." *J Immunol*. 161(6): 3120-7.
- Levy, J., T. Espanol-Boren, et al. (1997). "Clinical spectrum of X-linked hyper-IgM syndrome." *J Pediatr*. 131(1 Pt 1): 47-54.
- Lien, E. and R. R. Ingalls (2002). "Toll-like receptors." *Crit Care Med*. 30(1 Suppl): S1-11.
- Lopes, O. U., V. Pontieri, et al. (1981). "Hyperosmotic NaCl and severe hemorrhagic shock: role of the innervated lung." *Am J Physiol*. 241(6): H883-90.
- Lorenz, E., D. C. Chemotti, et al. (2005). "Differential involvement of toll-like receptors 2 and 4 in the host response to acute respiratory infections with wild-type and mutant *Haemophilus influenzae* strains." *Infect Immun*. 73(4): 2075-82.
- Lorenz, E., J. P. Mira, et al. (2002). "Relevance of mutations in the TLR4 receptor in patients with gram-negative septic shock." *Arch Intern Med*. 162(9): 1028-32.
- Lutgens, E. and M. J. Daemen (2002). "CD40-CD40L interactions in atherosclerosis." *Trends Cardiovasc Med*. 12(1): 27-32.
- Mach, F., U. Schonbeck, et al. (1997). "Functional CD40 ligand is expressed on human vascular endothelial cells, smooth muscle cells, and macrophages: implications for CD40-CD40 ligand signaling in atherosclerosis." *Proc Natl Acad Sci U S A*. 94(5): 1931-6.
- Majde, J. A. (2003). "Animal models for hemorrhage and resuscitation research." *J Trauma*. 54(5 Suppl): S100-5.

Mazar, J., T. Agur, et al. (2005). "CD40 ligand (CD154) takes part in regulation of the transition to mononuclear cell dominance during peritonitis." *Kidney Int.* 67(4): 1340-9.

Mazzoni, M. C., P. Borgstrom, et al. (1988). "Dynamic fluid redistribution in hyperosmotic resuscitation of hypovolemic hemorrhage." *Am J Physiol.* 255(3 Pt 2): H629-37.

Mazzoni, M. C., P. Borgstrom, et al. (1990). "The efficacy of iso- and hyperosmotic fluids as volume expanders in fixed-volume and uncontrolled hemorrhage." *Ann Emerg Med.* 19(4): 350-8.

Mazzoni, M. C., P. Borgstrom, et al. (1989). "Luminal narrowing and endothelial cell swelling in skeletal muscle capillaries during hemorrhagic shock." *Circ Shock.* 29(1): 27-39.

McLellan, A. D., R. V. Sorg, et al. (1996). "Human dendritic cells activate T lymphocytes via a CD40: CD40 ligand-dependent pathway." *Eur J Immunol.* 26(6): 1204-10.

Medzhitov, R. and C. Janeway, Jr. (2000). "Innate immunity." *N Engl J Med.* 343(5): 338-44.

Medzhitov, R. and C. Janeway, Jr. (2000). "The Toll receptor family and microbial recognition." *Trends Microbiol.* 8(10): 452-6.

Medzhitov, R., P. Preston-Hurlburt, et al. (1997). "A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity." *Nature.* 388(6640): 394-7.

Mellman, I. and R. M. Steinman (2001). "Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines." *Cell.* 106(3): 255-8.

Moore, F. A. and E. E. Moore (1995). "Evolving concepts in the pathogenesis of postinjury multiple organ failure." *Surg Clin North Am.* 75(2): 257-77.

- Moore, T. M., W. B. Shirah, et al. (2002). "Involvement of CD40-CD40L signaling in postischemic lung injury." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 283(6): L1255-62.
- Moses, A. V., S. E. Williams, et al. (1997). "HIV-1 induction of CD40 on endothelial cells promotes the outgrowth of AIDS-associated B-cell lymphomas." *Nat Med*. 3(11): 1242-9.
- Murao, Y., D. B. Hoyt, et al. (2000). "Does the timing of hypertonic saline resuscitation affect its potential to prevent lung damage?" *Shock*. 14(1):18-23.
- Murao, Y., W. Loomis, et al. (2003). "Effect of dose of hypertonic saline on its potential to prevent lung tissue damage in a mouse model of hemorrhagic shock." *Shock*. 20(1): 29-34.
- Muta, T. and K. Takeshige (2001). "Essential roles of CD14 and lipopolysaccharide-binding protein for activation of toll-like receptor (TLR)2 as well as TLR4 Reconstitution of TLR2- and TLR4-activation by distinguishable ligands in LPS preparations." *Eur J Biochem*. 268(16): 4580-9.
- Nguyen, V. T., W. S. Walker, et al. (1998). "Post-transcriptional inhibition of CD40 gene expression in microglia by transforming growth factor-beta." *Eur J Immunol*. 28(8): 2537-48.
- Oreopoulos, G. D., J. Hamilton, et al. (2000). "In vivo and in vitro modulation of intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 expression by hypertonicity." *Shock*. 14(3): 409-14; discussion 414-5.
- Orlinsky, M., W. Shoemaker, et al. (2001). "Current controversies in shock and resuscitation." *Surg Clin North Am*. 81(6): 1217-62, xi-xii.
- Oyama, J., C. Blais, Jr., et al. (2004). "Reduced myocardial ischemia-reperfusion injury in toll-like receptor 4-deficient mice." *Circulation*. 109(6): 784-9.

- Ozinsky, A., D. M. Underhill, et al. (2000). "The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors." *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97(25): 13766-71.
- Peng, T. C., K. W. Liao, et al. (2006). "The physiological changes of cumulative hemorrhagic shock in conscious rats." *J Biomed Sci*. 13(3): 385-94.
- Peng, Y., J. P. Gong, et al. (2004). "Expression of toll-like receptor 4 and MD-2 gene and protein in Kupffer cells after ischemia-reperfusion in rat liver graft." *World J Gastroenterol*. 10(19): 2890-3.
- Poltorak, A., X. He, et al. (1998). "Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene." *Science*. 282(5396): 2085-8.
- Powers, K. A., J. Woo, et al. (2003). "Hypertonic resuscitation of hemorrhagic shock upregulates the anti-inflammatory response by alveolar macrophages." *Surgery*. 134(2): 312-8.
- Quezada, S. A., L. Z. Jarvinen, et al. (2004). "CD40/CD154 interactions at the interface of tolerance and immunity." *Annu Rev Immunol*. 22: 307-28.
- Read, R. C. and D. H. Wyllie (2001). "Toll receptors and sepsis." *Curr Opin Crit Care*. 7(5): 371-5.
- Reul, R. M., J. C. Fang, et al. (1997). "CD40 and CD40 ligand (CD154) are coexpressed on microvessels in vivo in human cardiac allograft rejection." *Transplantation*. 64(12): 1765-74.
- Rhee, P., D. Burris, et al. (1998). "Lactated Ringer's solution resuscitation causes neutrophil activation after hemorrhagic shock." *J Trauma*. 44(2):313-9.
- Rizoli, S. B., A. Kapus, et al. (1998). "Immunomodulatory effects of hypertonic resuscitation on the development of lung inflammation following hemorrhagic shock." *J Immunol*. 161(11): 6288-96.

Rizoli, S. B., A. Kapus, et al. (1999). "Hypertonicity prevents lipopolysaccharide-stimulated CD11b/CD18 expression in human neutrophils in vitro: role for p38 inhibition." *J Trauma*. 46(5): 794-8; discussion 798-9.

Rocha e Silva, M., I. T. Velasco, et al. (1987). "Hyperosmotic sodium salts reverse severe hemorrhagic shock: other solutes do not." *Am J Physiol*. 253(4 Pt 2): H751-62.

Rotstein, O. D. (2003). "Modeling the two-hit hypothesis for evaluating strategies to prevent organ injury after shock/resuscitation." *J Trauma*. 54(5 Suppl): S203-6.

Roy, M., T. Waldschmidt, et al. (1993). "The regulation of the expression of gp39, the CD40 ligand, on normal and cloned CD4+ T cells." *J Immunol*. 151(5): 2497-510.

Russo, T. A., B. A. Davidson, et al. (2000). "Capsular polysaccharide and O-specific antigen divergently modulate pulmonary neutrophil influx in an Escherichia coli model of gram-negative pneumonitis in rats." *Infect Immun*. 68(5): 2854-62.

Sasaki, S., K. Takeda, et al. (1984). "Pressor responses to intracisternal injection of hypertonic NaCl in rats." *J Cardiovasc Pharmacol*. 6(2): 349-54.

Schonbeck, U. and P. Libby (2001). "The CD40/CD154 receptor/ligand dyad." *Cell Mol Life Sci*. 58(1): 4-43.

Shen, X. D., B. Ke, et al. (2002). "CD154-CD40 T-cell costimulation pathway is required in the mechanism of hepatic ischemia/reperfusion injury, and its blockade facilitates and depends on heme oxygenase-1 mediated cytoprotection." *Transplantation*. 74(3): 315-9.

Shimamoto, A., A. J. Chong, et al. (2006). "Inhibition of Toll-like receptor 4 with eritoran attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury. Reduced myocardial ischemia-reperfusion injury in toll-like receptor 4-deficient mice." *Circulation*. 114(1 Suppl): I270-4.

Shoemaker, W. C., A. B. Peitzman, et al. (1996). "Resuscitation from severe hemorrhage." *Crit Care Med.* 24(2 Suppl): S12-23.

Silomon, M., A. Pizanis, et al. (1999). "Oxyradical-mediated hepatocellular Ca²⁺ alterations during hemorrhagic shock and resuscitation." *Shock.* 11(3): 193-8.

Stainsby, W. N. and J. K. Barclay (1971). "Effect of infusions of osmotically active substances on muscle blood flow and systemic blood pressure." *Circ Res.* 28: Suppl 1:33-8.

Stein, D., S. Roth, et al. (1991). "The polarity of the dorsoventral axis in the *Drosophila* embryo is defined by an extracellular signal." *Cell.* 65(5): 725-35.

Stephan, R. N., T. S. Kupper, et al. (1987). "Hemorrhage without tissue trauma produces immunosuppression and enhances susceptibility to sepsis." *Arch Surg.* 122(1): 62-8.

Stern, S. A. (2001). "Low-volume fluid resuscitation for presumed hemorrhagic shock: helpful or harmful?" *Curr Opin Crit Care.* 7(6): 422-30.

Sugimoto, K., C. Galle, et al. (2003). "Monocyte CD40 expression in severe sepsis." *Shock.* 19(1): 24-7.

Takeda, K. and S. Akira (2005). "Toll-like receptors in innate immunity." *Int Immunol.* 17(1): 1-14.

Tremblay, L. N., S. B. Rizoli, et al. (2001). "Advances in fluid resuscitation of hemorrhagic shock." *Can J Surg.* 44(3): 172-9.

van Kooten, C. and J. Banchereau (2000). "CD40-CD40 ligand." *J Leukoc Biol.* 67(1): 2-17.

Velasco, I. T., R. C. Baena, et al. (1990). "Central angiotensinergic system and hypertonic resuscitation from severe hemorrhage." *Am J Physiol.* 259(6 Pt 2): H1752-8.

Velasco, I. T., V. Pontieri, et al. (1980). "Hyperosmotic NaCl and severe hemorrhagic shock." *Am J Physiol.* 239(5): H664-73.

Velasco, I. T., M. Rocha e Silva, et al. (1989). "Hypertonic and hyperoncotic resuscitation from severe hemorrhagic shock in dogs: a comparative study." *Crit Care Med.* 17(3): 261-4.

Verma, S., P. W. Fedak, et al. (2002). "Fundamentals of reperfusion injury for the clinical cardiologist." *Circulation.* 105(20): 2332-6.

Wang, P. and J. L. Zweier (1996). "Measurement of nitric oxide and peroxynitrite generation in the postischemic heart. Evidence for peroxynitrite-mediated reperfusion injury." *J Biol Chem.* 271(46): 29223-30.

Winkelstein, J. A., M. C. Marino, et al. (2003). "The X-linked hyper-IgM syndrome: clinical and immunologic features of 79 patients." *Medicine (Baltimore).* 82(6): 373-84.

Yada-Langui, M. M., E. A. Anjos-Valotta, et al. (2004). "Resuscitation affects microcirculatory polymorphonuclear leukocyte behavior after hemorrhagic shock: role of hypertonic saline and pentoxifylline." *Exp Biol Med (Maywood).* 229(7): 684-93.

Yellin, M. J., J. Brett, et al. (1995). "Functional interactions of T cells with endothelial cells: the role of CD40L-CD40-mediated signals." *J Exp Med.* 182(6): 1857-64.

Younes, R. N., F. Aun, et al. (1985). "The role of lung innervation in the hemodynamic response to hypertonic sodium chloride solutions in hemorrhagic shock." *Surgery.* 98(5): 900-6.

Zweier, J. L., J. T. Flaherty, et al. (1987). "Direct measurement of free radical generation following reperfusion of ischemic myocardium." *Proc Natl Acad Sci U S A.* 84(5): 1404-7.