Rosângela Nascimento Pimentel

**Desenvolvimento do pré-condicionamento por estresse
hiperosmótico: estudo dos efeitos no modelo de
camundongos endotoxêmicos**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciências.

Programa de ciências médicas.

Área de concentração: Processos imunes e
infecciosos.

Orientador: Prof. Dr. Francisco Garcia Soriano

**São Paulo
2015**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Pimentel, Rosângela Nascimento

Desenvolvimento do pré-condicionamento por estresse hiperosmótico : estudo dos efeitos no modelo de camundongos endotoxêmicos / Rosângela Nascimento Pimentel. -- São Paulo, 2015.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Ciências Médicas. Área de Concentração: Processos Imunes e Infeciosos.

Orientador: Francisco Garcia Soriano.

Descritores: 1.Sepse 2.Endotoxemia 3.Inflamação 4.Solução salina hipertônica 5.Pressão osmótica 6.Concentração osmolar 7.Camundongos

USP/FM/DBD-453/15

Dedicatória

Aos meus pais, pois sem o apoio deles, nada em minha vida seria possível.

À minha filha, pois ela me ensinou o que é amor verdadeiro.

Aos meus irmãos sempre juntos, para os bons e maus momentos.
“#tamojunto”

Aceitação

“Você nasceu no lar que precisava nascer, vestiu o corpo físico que merecia, mora onde melhor Deus proporcionou, de acordo com teu adiantamento.

Você possui recursos financeiros coerentes com tuas necessidades... nem mais, nem menos, mas o justo para as tuas lutas terrenas.

Seu ambiente de trabalho é o que você elegeu espontaneamente para a sua realização.

Teus parentes e amigos são almas que você mesmo atraiu, com sua própria afinidade.

Portanto, teu destino está constantemente sob teu controle. Você escolhe, recolhe, elege, atrai, busca, expulsa, modifica tudo aquilo que te rodeia a existência.

Teus pensamentos e vontades são a chave de teus atos e atitudes. São as fontes de atração e repulsão na jornada da tua vivência.

Não reclame, nem se faça de vítima.

Antes de tudo, analisa e observa.

A mudança está em tuas mãos. **Reprograma tua meta**, busca o bem e você viverá melhor.

Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo começo, qualquer um pode começar agora e fazer um novo fim.”

Chico Xavier

Gratidão eterna

Ao professor Dr. Francisco Garcia Soriano, por sua orientação, apoio, dedicação, confiança, amizade e acima de tudo paciência. Minha eterna gratidão, Chico, por imensa oportunidade.

A minha linda família, Bartolomeu, Lindaura, Neusa, Carlos, Dilma, Rafael, Gabriel e Miguel. Especialmente a minha filha Álida, por ser o maior de todos os presentes que Deus me deu.

A minha avó Ester, por ter me ensinado tanto. A meus primos sempre presentes em minha vida.

Ao professor Dr. Heraldo Possolo de Souza por todas as oportunidades oferecidas.

Ao Professor Dr. Irineu Tadeu Velasco pela oportunidade oferecida.

As irmãs disfarçadas de amigas: SUELY, DENISE E KELLI.

Ao irmãozinho RICARDO, gratidão mais que eterna por estar presente em todos os experimentos e em minha vida, amigo d'alma!

Ao amigo Hermes, por carinhosa ajuda sempre!

Aos amigos do LIM 51 Thais, Clara, Mariana, André, Joleen, Anne, Vanessa, Wermerson, Vivian, Ester, Fátima, Geraldo e Dona Maria.

As secretárias Angélica e Rose verdadeiros anjos da pós-graduação.

Aos meus Amigos do Bem Sr. Carlos, Victor, Nanci, Silene, Reginaldo, Regina e Roberto sempre unidos em nome do Bem!

“Se não posso fazer tudo que devo. Devo ao menos fazer tudo que posso”

Amigos do Bem!

“If you think you can, you can.

If you think you can't,
you are absolutely right”

Henry Ford

Sumário

1. Introdução	1
1.1 Tolerância – Pré-condicionamento	1
1.2 Inflamação - Hiperosmolaridade	2
1.3 Solução Salina Hipertônica	4
1.4 Sistema imune - Inflamação	6
1.5 Imunidade Inata e adquirida	8
1.6 Inflamação LPS	9
1.7 LPS – Sepse mediadores inflamatórios	12
1.8 Inflamação - citocinas	14
1.8.1 Interleucina 1 α e 1 β	14
1.8.2 Interleucina 2	15
1.8.3 Interleucina 4	15
1.8.4 Interleucina 6	15
1.8.5 Interleucina 10	16
1.8.6 Interleucina 12p40 e 12p70	16
1.8.7 Interleucina 17 ^a e 17F	16
1.8.8 Interleucina 22	17
1.8.9 Interleucina 23	17
1.8.10 TNF α	18
1.8.11 Interferon γ	18
1.8.12 MIP α e MIP β	18
2. Objetivos Gerais	19
2.1 Objetivos Específicos	19
3. Métodos	20
3.1 Modelo Biológico	20
3.2 Anestesia	20
3.3 Eutanásia	20
3.4 Tempo de estudo	21
3.5 Constituição dos grupos	21
3.5.1 Sobrevida	21
3.5.2 Sobrevida com soluções isotônicas e hipertônicas	23
3.5.3 Sobrevida com soluções hiperosmóticas	24
3.5.4 Caracterização do modelo de inflamação no plasma	26

3.5.5 Efeito do pré-condicionamento com NaCl 7,5% na endotoxemia no plasma e tecido	27
3.6 Análise das citocinas por Milliplex	29
3.7 Análise das citocinas por ELISA	30
3.8 Quantificação de nitrito – Reação de Griess	31
3.9 Análise do infiltrado neutrofílico pelo método de quantificação de mieloperoxidase	32
3.10 Análise estatística	32
4. Resultados	34
5. Discussão	84
6. Conclusão	92
7. Referências	94

Lista de abreviaturas, símbolos e siglas

µg – microgramas

µL – microlitro

CD – do inglês “Cluster of differentiation” traduzido por conjunto de diferenciação

DAMP – do inglês “Damage associated molecular pattern” traduzido por Dano associado a padrão molecular

GPI – Glicofosfstidilinositol

H₂SO₄ – Ácido sulfúrico

IL – interleucina

iNOS – do inglês “Inducible nitric oxide synthase” traduzido por oxido nítrico sintase

IRAK – receptor associado a kinase IL1

LBP – do inglês “LPS binding protein” traduzido por proteína ligadora de LPS

LPS – Lipopolissacarídeo

MAPK – do inglês “Mitogen activated protein kinase” traduzido por proteína quinase ativada por mitógeno

MD2 – do inglês “Lymphocyte antigen 96” traduzido por antígeno de linfócito 96

mg – miligramas

MID88 – proteína de diferenciação mieloide 88

mL – mililitro

mOsm/kg – miliosmois por quilo

mOsm/L – miliosmois por litro

MSR – do inglês “Macrophage scavenger receptor”

NaCl – cloreto de sódio

NFκB – Fator de transcrição nuclear B

PAMP – do inglês “Pathogen associated molecular pattern” traduzido por padrão associado a patógeno

PRR – do inglês “Pattern recognition receptor” traduzido por receptor de reconhecimento padrão.

SSH – solução salina hipertônica

TIRAP – domínio TIR contendo adaptador de proteína.

TLR – do inglês “Toll like receptor” traduzido por receptor do tipo Toll like

TOLIP – proteína de interação Toll

Lista de Figuras

Figura 1 – Ativação de mediadores inflamatórios pelo LPS.....	11
Figura 2 – Esquema de aplicação do pré-condicionamento com diferentes volumes de NaCl 7,5%.....	22
Figura 3 – Esquema de pré-condicionamento com soluções isotônicas e hipertônicas.....	24
Figura 4 – Esquema de pré-condicionamento com soluções hiperosmóticas.....	26
Figura 5 – Esquema de análise de aplicação e eutanásia dos animais submetidos à análise inflamatória durante as doses do pré-condicionamento com solução salina hipertônica	27
Figura 6 – Esquema de pré-condicionamento com NaCl 7,5% e desafio endotoxêmico.....	29
Figura 7 – Efeito do pré-condicionamento com diferentes doses de NaCl 7,5% em animais endotoxêmicos.	34
Figura 8 – Concentrações de interleucina IL1 α durante pré-condicionamento com NaCl 7,5% em duas horas.....	35
Figura 9 – Concentrações de interleucina IL1 β durante pré-condicionamento com NaCl 7,5% em duas horas.....	36
Figura 10 – Concentrações de interleucina IL12p40 durante pré-condicionamento com NaCl 7,5% em duas horas.....	36
Figura 11 - Concentrações de interleucina IL12p70 durante pré-condicionamento com NaCl 7,5% em duas horas.....	37
Figura 12 - Concentrações de interleucina IL17A durante pré-condicionamento com NaCl 7,5% em duas horas.....	38
Figura 13 - Concentrações de interleucina IL17F durante pré-condicionamento com NaCl 7,5% em duas horas.....	38
Figura 14 - Concentrações de interleucina IL23 durante pré-condicionamento com NaCl 7,5% em duas horas.....	39
Figura 15 - Concentrações de interleucina IL4 durante pré-condicionamento com NaCl 7,5% em duas horas.....	40
Figura 16 - Concentrações de interleucina IL6 durante pré-condicionamento com NaCl 7,5% em duas horas.....	40

Figura 17 - Concentrações de interleucina 22 durante pré-condicionamento com NaCl 7,5% em duas horas.....	41
Figura 18 - Concentrações de TNF α durante pré-condicionamento com NaCl 7,5% em duas horas.....	42
Figura 19 - Concentrações de MIP α durante pré-condicionamento com NaCl 7,5% em duas horas.	42
Figura 20 - Concentrações de interleucina MIP β durante pré-condicionamento com NaCl 7,5% em duas horas.....	43
Figura 21 - Concentrações de interleucina IL10 durante pré-condicionamento com NaCl 7,5% em duas horas.....	43
Figura 22 - Concentrações de interleucina IL2 durante pré-condicionamento com NaCl 7,5% em duas horas	44
Figura 23 - Concentrações de interleucina IFN γ durante pré-condicionamento com NaCl 7,5% em duas horas.....	45
Figura 24 - Concentrações de interleucina IL1 β durante pré-condicionamento com NaCl 7,5% em quatro horas.....	46
Figura 25 - Concentrações de interleucina IL2 durante pré-condicionamento com NaCl 7,5% em quatro horas.....	46
Figura 26 - Concentrações de interleucina IL6 durante pré-condicionamento com NaCl 7,5% em quatro horas	47
Figura 27 - Concentrações de interleucina IL12p40 durante pré-condicionamento com NaCl 7,5% em quatro horas	47
Figura 28 - Concentrações de interleucina IL22 durante pré-condicionamento com NaCl 7,5% em quatro horas.....	48
Figura 29 - Concentrações de interleucina IFN γ durante pré-condicionamento com NaCl 7,5% em quatro horas.....	49
Figura 30 - Concentrações de interleucina IL1 α durante pré-condicionamento com NaCl 7,5% em quatro horas.....	49
Figura 31 - Concentrações de interleucina IL10 durante pré-condicionamento com NaCl 7,5% em quatro horas.....	50
Figura 32 - Concentrações de interleucina IL12p70 durante pré-condicionamento com NaCl 7,5% em quatro horas	50
Figura 33 - Concentrações de interleucina IL17A durante pré-condicionamento com NaCl 7,5% em quatro horas	51
Figura 34 - Concentrações de MIP α durante pré-condicionamento com NaCl 7,5%	

em quatro horas.....	52
Figura 35 - Concentrações de interleucina IL23 durante pré-condicionamento com NaCl 7,5% em quatro horas	52
Figura 36 - Concentrações de interleucina MIP β durante pré-condicionamento com NaCl 7,5% em quatro horas.....	53
Figura 37 - Concentrações de TNF α durante pré-condicionamento com NaCl 7,5% em quatro horas.....	53
Figura 38 - Concentrações de interleucina IL4 durante pré-condicionamento com NaCl 7,5% em quatro horas	54
Figura 39 - Concentrações de interleucina IL17F durante pré-condicionamento com NaCl 7,5% em quatro horas	54
Figura 40 – Sobrevida de camundongos Balb/c com pré-condicionamento usando soluções de baixa osmolaridade.....	55
Figura 41 - Sobrevida de camundongos Balb/c com pré-condicionamento usando soluções hiperosmóticas.....	56
Figura 42 – Concentrações em plasma de interleucina IL1 α e IL1 β após pré-condicionamento e desafio com LPS.	58
Figura 43 - Concentrações em plasma de interleucina IL2 α e IL6 após pré-condicionamento e desafio com LPS.	60
Figura 44 - Concentrações em plasma de interleucina IL12p40 e IL12p70 após pré-condicionamento e desafio com LPS.	62
Figura 45 - Concentrações em plasma de interleucina IL17A e IL17F após pré-condicionamento e desafio com LPS.	64
Figura 46 - Concentrações em plasma de interleucina IL22 e IL23 após pré-condicionamento e desafio com LPS.	65/66
Figura 47 - Concentrações em plasma de TNF α e IFN γ após pré-condicionamento e desafio com LPS.	67
Figura 48 - Concentrações em plasma de MIP α e MIP β após pré-condicionamento e desafio com LPS.	69
Figura 49 - Concentrações em plasma de interleucina IL4 e IL10 após pré-condicionamento e desafio com LPS.	70/71
Figura 50 - Concentrações de interleucina IL6 após pré-condicionamento e desafio com LPS em pulmão, baço e intestino.	72/73
Figura 51 - Concentrações de interleucina TNF α após pré-condicionamento e desafio com LPS em pulmão, baço e intestino.	75/76

Figura 52 - Concentrações de interleucina IL10 após pré-condicionamento e desafio com LPS em pulmão, baço e intestino.	77/78
Figura 53 - Concentrações de nitrito após pré-condicionamento e desafio com LPS em pulmão, baço e intestino.	80/81
Figura 54 - Concentrações de interleucina MPO após pré-condicionamento e desafio com LPS em pulmão, baço e intestino.	82/83

Resumo

Pimentel RN. Desenvolvimento do pré-condicionamento por estresse hiperosmótico: estudo dos efeitos no modelo de camundongos endotoxêmicos [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina; Universidade de São Paulo; 2015.

A tolerância ou pré-condicionamento é uma estratégia de defesa do hospedeiro que reduz o impacto negativo da infecção na saúde. Diminui a susceptibilidade a danos teciduais, causados pelos patógenos ou pela resposta imune. Um desbalanço no fluido e pressão osmótica intra e extracelular causa o estresse osmótico e liberação de mediadores inflamatórios. A solução salina hipertônica (SSH) tem sido utilizada na ressuscitação volêmica, mostrando-se benéfica em pacientes com danos cerebrais e pulmonares (3), melhora a contratilidade e perfusão microvascular. Utilizamos esta solução como possível agente indutor de pre-condicionamento ou tolerância. A SSH em doses crescentes de 4, 6 e 8 ml/kg levou a diminuição da mortalidade em camundongos endotoxêmicos o mesmo ocorrendo com outras soluções hiperosmóticas. Analisamos o padrão do perfil de produção de citocinas pró e anti-inflamatórias em períodos de 2 e 4 horas pós SSH e pós LPS. No estudo sistêmico do pré-condicionamento os resultados revelaram uma diminuição da resposta inflamatória causada pelo LPS nas dosagens plasmáticas, o mesmo ocorrendo nos tecidos estudados. Concluimos que o pré-condicionamento com SSH é promissor como um pré-tratamento na endotoxemia.

Descritores: Sepses, endotoxemia, inflamação, Solução salina hipertônica, pressão osmótica, concentração osmolar, camundongo.

Abstract

Pimentel Nascimento R. *Development of the preconditioning by hyperosmotic stress – Study of the effects in the endotoxemic mice model*. [Dissertaion]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2015

The tolerance or preconditioning is a host defense strategy able to reduce the infection negative effect in health. Decrease the tissue damage susceptibility caused by the imune response. A fluid imbalance and osmotic pressure intra and extracellular cause the osmotic stress and inflammatory mediators release. The hypertonic saline solution (SSH) has been used in fluid resuscitation, with good results in patients with brain and lung damage, it improves microvascular perfusion and contractility. We used this solution as a possible induct agent of preconditioning or tolerance. The Hypertonic saline solution in increasing doses of 4,6 and 8ml/kg was able to stablish a decrease in endotoxemic mice mortality, the same happened with other hyperosmotic solutions. We analyzed the pattern profile of inflammatory and anti-inflammatory cytokines in a period of two and four hours after SSH. In the systemic study of the preconditioning, the results showed a decrease in the inflammatory response caused by LPS in the plasmatic dosage, the same was observed in the studied tissues. We concluded that the preconditioning with SSH is a promising pre-treatment in endotoxemia.

Descriptors: sepsis; endotoxemia; inflammation; hypertonic saline solution; osmotic pressure; osmolar concentration; mice.

1. INTRODUÇÃO

O entendimento dos mecanismos inflamatórios na síndrome da resposta inflamatória sistêmica é fundamental para podermos avançar e produzir novas intervenções terapêuticas. Doenças como sepse, pancreatite, infarto do miocárdio apresentam alto risco ao desenvolvimento de SIRS e risco de evolução fatal. O desenvolvimento de terapias ou mecanismos de prevenção são focos de atenção dos pesquisadores.

1.1 Tolerância – Pré-condicionamento

Segundo Ruslan Medzhitov [1] o mecanismo de defesa do hospedeiro animal tradicionalmente reconhecida por detectar e eliminar patógenos, pode se valer de outras alternativas para se proteger. Esta variação é devido à capacidade diferencial de tolerar a presença de agentes patogênicos, constituiu uma estratégia distinta de defesa do hospedeiro. A resposta inflamatória habitual produz danos ao hospedeiro, por outro lado a tolerância é uma estratégia de defesa do hospedeiro que reduz o impacto negativo na saúde do hospedeiro decorrente da inflamação. Não afetando diretamente a carga de patógenos [2].

A tolerância a endotoxemia foi descrita nas décadas de 60 e 70 e foi observado que baixas doses de endotoxina bacteriana como pré-exposição, levaram a menor taxa de mortalidade dos animais quando subsequentemente expostos a uma dose letal da endotoxina. A seguir estudos sobre a produção de citocinas revelou que a tolerância é uma resposta adaptativos com menor liberação de mediadores pró-inflamatórios[3]. Os estudos revelaram uma inibição da

produção de MAPK e as subsequentes cascatas de sinalização e uma consequente menor liberação de TNF α [4].

1.2 Inflamação – Hiperosmolaridade

Em 1826 o médico francês Henri Dutrochet publicou a hipótese do fenômeno da circulação de fluidos entre as paredes dos vasos sanguíneos, aparentemente impermeáveis, que poderia se estender para as células. Postulando que esta circulação estava relacionada à existência de correntes, causadas pela própria diferença de densidade entre dois fluidos. Ele as batizou de “endosmosis” e “exosmosis” significando impulso, movimento [5]. De acordo com Kedem-Katchalski o fluxo molar do soluto e o fluxo do volume do solvente através da membrana semipermeável são obtidos do não equilíbrio termodinâmico da linearidade entre o fluxo e a força motriz [6].

Células e tecidos de mamíferos desenvolveram mecanismos adaptativos para compensar aumentos na osmolaridade extracelular. A habilidade de regular e preservar solutos de microambientes intra e extracelular é vital na manutenção da homeostasia. A osmolalidade do sangue humano é aproximadamente de 285 a 295 mOsm/kg e por convenção nomeado de isotônico porque descreve a osmolaridade encontrada na maioria dos tecidos [7].

Fluidos com osmolaridade maior ou menor que o mencionado acima são denominados hipertônico e hipotônico. Alguns tecidos, incluindo o rim, o trato gastrointestinal e estudos recentes mencionam os olhos, são expostos a oscilações na osmolaridade em um processo fisiológico. Um desbalanço no

fluido e pressão osmótica intra e extracelular causa o estresse osmótico. Por definição quando as concentrações de soluto intracelular excedem as concentrações extracelulares é denominado estresse hiposmótico.

Quando o soluto no fluido extracelular é maior que o intracelular as células e tecidos entram em estresse hiperósmico. Este desbalanço afeta danosamente o fluxo de água, o volume e homeostasia celular. Quando as respostas osmoadaptativas não conseguem compensar a assimetria na concentração de soluto, há consequências negativas que potencialmente contribuem para a inflamação [7, 8].

Os mecanismos de regulação do volume celular são similares em células de vários tecidos[9, 10]. Na hipotonicidade, após o inchaço da célula, a regulação consiste na liberação de osmólitos principalmente K^+ e Cl^- , seguida pela perda obrigatória de água por osmose, denominada de “Perda do Volume Regulatório” (RVD). Na hipertonicidade, depois do encolhimento celular, a regulação baseia-se na captação de osmólitos seguidos pelo ganho obrigatório de água, denominado “Aumento do Volume Regulatório” (RVI) [10, 11].

Os fluidos corporais rapidamente se equilibram sendo o sódio o maior cátion extracelular mantendo o volume deste compartimento pelo efeito osmótico. Os espaços intravasculares e intersticiais são dois compartimentos de eletrólitos extracelulares distintos e regulados separadamente [12]. Macrófagos apresentam funções na regulação de fluidos corporais internos [13]. Macrófagos se infiltram nos sítios onde há aumento de Na^+ e Cl^- que mostra um microambiente hipertônico, indicando que o gradiente de sal pode ser a força motriz da atração celular de macrófagos [14]. Estes macrófagos recrutados são sensíveis a composição eletrolítica intersticial, e

subsequentemente supra regulam o fator de transcrição denominado proteína de ligação do intensificador de tonicidade (TonEBP), também chamado de fator nuclear de ativação de célula T 5 (NFAT5). Este fator de transcrição é essencialmente necessário para a expressão de genes osmoprotetores em resposta a estresse hiperosmótico [15]. Estudos se referem a ativação do NFAT5 como o fator de transcrição responsável pela tradução da cascata que inclui a MAPK p38 (Proteínas quinases ativadas por mitógenos p. 38), que é ativada por estresse osmótico em mamíferos [16-18]. A ativação possivelmente ocorre através da MAPK-1 (MAPK fosfatase 1), que aumenta a sinalização MAPK p38 sob altas concentrações de NaCl [19]. Contudo, outras cascatas de sinalização ocorrem em resposta ao estresse hiperosmótico como fosfatidilinositol 3 quinase, [20] processo dependente da quinase A, [21] e Rac1/ suporte osmosensível. [12, 22]

A hiperosmolaridade atua como um estimulador na produção de citocinas pró-inflamatórias como IL1 beta em células do endotélio arterial, [23] IL6 em macrófago peritoneal em ratos, [24] IL8 em células sanguíneas periféricas mononucleares, [16] brônquicas e epiteliais intestinais humanas, [25] além de fibrose cística em célula da glândula aérea [26] e IL18 em linhagem de células epiteliais humanas [7, 8, 27].

1.3 Solução Salina Hipertônica (SSH)

Por definição, a hipertonidade ocorre quando solutos causam defluxo de água da célula e reduz seu volume. Isto requer um gradiente de soluto através da membrana semipermeável. A maioria das células tem uma membrana

permeável à água e muitos experimentos são baseados na adição de solutos impermeáveis seus resultados são observados em minutos ou horas. [28]

Estudos com a solução salina hipertônica em uso clínico e experimental são publicados desde 1900. Weed e Mc Kibben em 1919 usaram-na para a redução do volume craniano [29] e Velasco e colegas na década de 80 observaram que animais induzidos a choque hemorrágico apresentaram melhor recuperação nos parâmetros hemodinâmicos com o uso da Solução Salina Hipertônica 7,5%. [30]

A solução salina hipertônica além de reduzir a quantidade de fluido usado para ressuscitação, nos últimos anos tem demonstrado ter outros benefícios. Redução no sequestro do terceiro espaço, [31] benefício em pacientes com danos cerebrais e pulmonares [32], melhora contratilidade e perfusão microvascular. [33] Outros estudos mostraram que a solução salina hipertônica melhora os danos causados no tecido intestinal por isquemia e reperfusão, [34] inibição da lesão pulmonar aguda causada pela isquemia- reperfusão, choque hemorrágico e pancreatite aguda em modelos experimentais [35]. Estudos demonstraram que a SSH aumenta o volume plasmático [36], articula positivamente eventos celulares na SIRS (síndrome da resposta inflamatória sistêmica), inibe expressão de TNF alpha e aumenta a produção de IL10 em macrófagos alveolares. [35]

Estudos mostraram que a SSH diminuiu o infiltrado inflamatório e reduziu o nível de IL6 em tecido pulmonar em pesquisa experimental. [37] Demonstrou vantagens como fluido de expansão na clínica [38], como potencial imunomodulatório em pacientes com traumas e sepse, [39] e permite um balanço positivo entre citocinas pró e anti-inflamatórias, reduzindo a

inflamação. (40). Outros estudos mostraram que a SSH é redutora da síndrome do desconforto respiratório agudo em ratos endotoxêmicos [37] e da caspase 7, assim como, reguladora da HSP60 durante a pancreatite em ratos[40, 41].

Tendo em vista que a SSH pode ativar a cascata inflamatória de vias também utilizadas na endotoxemia, na tolerância ao LPS e no condicionamento a isquemia e reperfusão. Visamos analisar se é possível obter *in vivo*, um estado semelhante ao pré-condicionamento com a administração prévia de SSH. Se o efeito do pré-condicionamento com SSH pode durar dias antes de se aplicar um desafio endotoxêmico e ainda se outras soluções hipertônicas podem prevenir a letalidade do LPS. Além disto, avaliaremos o momento do pré-condicionamento e a intensidade da liberação de mediadores inflamatórios durante o pré-condicionamento.

Revisão da literatura sobre inflamação

1.4 Sistema imune - Inflamação

Inflamação é uma resposta benéfica a insultos externos ou a danos teciduais que culmina na restauração da função e da estrutura tecidual retornando ao estado de homeostasia. [42] Esta resposta requer a imunidade inata e em alguns casos a resposta imune adaptativa. A imunidade inata não atua apenas como a primeira linha de defesa contra material nocivo, mas após o reconhecimento de um estímulo apropriado, também fornece os sinais necessários para instruir o sistema imune adaptativo a criar uma resposta. [43] A resposta adaptativa necessita do sistema imune inato para providenciar os

efetores necessários, em forma de fagócitos e granulócitos para lidar com o estímulo inicial. [44]

O sistema imune pode ser visto como duas vias interconectadas; o sistema inato cujas células usam receptores para detectar e sinalizar a ocorrência de infecção microbiana estes sinais têm duas funções principais: iniciar uma cascata inflamatória que ajuda a conter a infecção e ativação da resposta imune adaptativo. [42] O maior desafio da inflamação é o reconhecimento de patógenos por receptores do sistema imune inato [45]. Este reconhecimento molecular é conceitualmente distinto do utilizado para componentes microbianos por receptores de antígenos dos linfócitos T e B.[42]

Esta estratégia é denominada reconhecimento de padrões (pattern recognition) e os receptores inatos que desempenham este papel de receptores de reconhecimento de padrões (pattern recognition receptor) PRR. O grupo dos PRR incluem os receptores do tipo Toll (Toll like receptors) TLR. Conceitualmente estes receptores têm duas características gerais; primeiramente, eles reconhecem diretamente antígenos determinantes das classes de patógenos – chamados de padrão molecular associado a patógeno (patogen associated molecular pattern) PAMP e iniciam a resposta imune. Segundo, eles também reconhecem ligantes endógenos liberados em células sob stress chamados de padrão molecular associado a dano (damage associated molecular pattern) DAMP.[46]

A imunologia moderna, em muitos aspectos é baseada em dois paradigmas principais: a teoria da seleção clonal e a teoria de reconhecimento de padrões. Desenvolvidas primeiramente em bases teóricas e comprovados mais tarde. A teoria da seleção clonal propõe que no sistema imune adaptativo de cada

linfócito tem um receptor Ag-específico distinto feito de forma aleatória e selecionado por cognatos Ags por sua capacidade para determinar a ativação e a expansão clonal . Este modelo, segundo Medzhitov, explica alguns dos grandes enigmas do sistema imunológico, incluindo a memória imunológica. /6/ O reconhecimento do sistema imune imato baseia-se na seleção não clonal, e sim em receptores de reconhecimento padrão (PRRs). Estes receptores detectam componentes conservados de microrganismos, ou padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), como o lipopolissacarídeo e os peptídioglicanos. [46, 47]

1.5 Imunidade inata e adquirida

A resposta imunológica é dividida em duas partes determinadas pela velocidade e especificidade da reação.[48] São chamadas de respostas inata e adaptativa, contudo na prática há muita interação entre elas. A característica da imunidade inata se refere a uma variedade de células mieloides e linfoides. [49, 50] Usualmente envolvem os elementos do sistema imune (neutrófilos, monócitos, macrófagos, sistema complemento, citocinas e proteínas de fase aguda), que fornece defesa imediata. A natureza conservadora desta resposta é vista na forma animal mais simples e provê sua sobrevivência. A imunidade adaptativa consiste em reações antígeno-específicas através de linfócitos T e linfócitos B.[50] Ao passo que a resposta inata é rápida, mas às vezes causa dano tecidual por falta de especificidade. A resposta adaptativa é mais precisa, mas leva dias ou semanas para se desenvolver, por outro lado apresenta “memória”, de tal forma que uma exposição subsequente leva a uma resposta mais rápida e vigorosa.[48, 50, 51] A resposta adaptativa é uma resposta codificada por elementos de gene que somaticamente se rearranjam para

montar moléculas de ligação de antígeno com especificidade para agentes microbianos e estruturas ambientais. [52]

É difícil determinar onde o sistema imune inato termina, em parte isso ocorre porque os mecanismos imunológicos inatos são dinâmicos em uma escala de tempo evolutiva. O ser é moldado pelas pressões seletivas que os micróbios impõem, e sobrevive da melhor forma possível.[53]

1.6 Inflamação – LPS

Exemplos de padrões microbianos são: peptidoglicano e lipopolissacarídeo (LPS) proveniente das paredes das bactérias gram positiva e gram negativa respectivamente. [54]

LPS, também conhecido como endotoxina, [54] é um componente fundamental da parede celular da bactéria gram negativa; que é composta de três camadas estruturais: oligossacarídeo, uma cadeia O-específica feita da sequência repetida de polissacarídeo e o componente lipídico A, que é responsável pelas propriedades pró-inflamatórias desta endotoxina. [55] LPS age estimulando as células do sistema imune a produzirem citocinas pró inflamatórias, proteases, eicosanoides, espécies reativas de oxigênio e nitrogênio.[54] A ativação celular promovida pela presença do LPS acontece de várias formas. Pode ocorrer pela presença do LBP (LPS binding protein) – proteína ligadora de LPS, que é uma proteína de fase aguda, que tem a função de trazer o LPS para a superfície celular através da ligação ternária com o receptor opsônico CD14.[55, 56] O CD14 presente na membrana mCD14 é um glicofosfatidilinositol (GPI) molécula ancorada na superfície da célula, mas também é encontrada na circulação como CD14 solúvel (sCD14).[56] Muitas células que apresentam negatividade

para o CD14, como células dendríticas, fibroblastos, células de músculo liso e endotélio vascular são capazes de responder ao LPS interagindo com sCD14. Encontrado no sangue de indivíduos saudáveis, contudo, há aumento nos níveis quando em sepse.[55, 56] A ligação ternária, LPS, LBP e CD14 é apresentada ao receptor transmembranico TLR4 [57, 58]. Contudo, é necessário a formação de um receptor agrupado com TLR4, uma proteína acessória, MD2 para transmitir a sinalização às células imunes desencadeando uma hiperativação da resposta imune.[59] Outras moléculas transmembrânicas são sensíveis ao LPS como o receptor de macrófago scavenger (MSR), CD11b/CD18 e canais iônicos. A sinalização intracelular depende da ligação do TLR intracelular com Toll/IL1 (receptor de domínio homológico) com IRAK (receptor associado de kinase IL1). Processo facilitado por duas proteínas adaptativas MyD88 – proteína de diferenciação mieloide 88 – e TIRAP (domínio TIR contendo adaptador de proteína) e inibido por uma terceira proteína TOLIP (proteína de interação Toll).[56] Além da via dependente MyD88, que precipita a ativação do NFkB e de citocinas pró-inflamatórias, TLR4 ativa subsequentemente uma segunda via com interação do TRAM, adaptador de classificação TRIF. Este segundo caminho é iniciado através de endocitose do receptor do compartimento endossomal, que desencadeia a translocação nuclear IRF3 e ativação tardia do NFkB e AP1 [60] ligado a uma proteína inibidora (Ikb). Quando ocorre ativação celular o Ikb é fosforilado e libera o dímero NFkB, que migra para o núcleo ativando a transcrição dos genes envolvidos na resposta imune, que culmina na produção de citocinas.[61] (Figura 1)

Figura 1 – Ativação de mediadores inflamatórios pelo LPS – Adaptada e modificada do Instituto Shanghai de Biologia.

São ativadas citocinas pró-inflamatórias IL-1, IL-6, IL-12, IL-15, IL-18, TNF- α , MIF, HMGB1 que ativam neutrófilos, linfócitos e endotélio vascular, além de induzir prostaglandinas, iNOS (óxido nítrico sintase) e proteínas de fase aguda que induzem a febre. Ativa também a citocina anti-inflamatória IL10 que regula negativamente estes efeitos. Ainda temos produção de quimiocinas IL-8, MIP-1 α , MIP-1 β , MCP-1, MCP-3 que mobilizam e ativam células inflamatórias, especialmente neutrófilos e macrófagos. Mediadores lipídicos também são liberados como fator de ativação de plaquetas, prostaglandinas, leucotrienos, tromboxano e fator tecidual; que agem sobre o endotélio vascular, regulam tônus vascular, ativam cascata de coagulação extrínseca. Radicais de

oxigênio como superóxido, radicais hidroxil, e óxido nítrico. Que tem propriedades antimicrobianas e de regulação do tônus vascular. [56, 62]

Novos estudos descrevem um processo de endocitose induzido por LPS que é dependente do CD14, mas independente do TLR4 e envolve a tirosina quinase SyK e seu efetor subsequente PLCy2 [62], a resposta específica celular ao LPS, neste caso acontece pela especificidade celular da coexpressão do TLR4 e CD14. [62]

1.7 LPS – Sepses mediadores inflamatórios

Sepses, a síndrome inflamatória sistêmica que ocorre em resposta a uma infecção, representa uma doença ainda sem solução, apesar dos inúmeros estudos sobre o assunto. A sepses pode progredir ainda para choque séptico, caracterizado por hipotensão refratária e perfusão deficiente de órgãos, associada a 80% na mortalidade. [63] O modelo endotoxêmico (LPS) é utilizado para mimetizar os sinais e sintomas da sepses.[64]

O evento central na cascata fisiopatológica da sepses é uma liberação sistêmica excessiva de citocinas pró-inflamatórias, tais como: TNF- α , interleucinas (IL) -1, IL-6, IL-12, IL-18 e interferon- γ em resposta ao LPS [65].

Estas citocinas ativam sistemas celulares (fagócitos e endotélio) e humoral (rotas de coagulação e ativação de complemento, mediadores de baixo peso molecular) os quais são primariamente orientados para eliminação de bactérias invasoras, podendo causar inflamação generalizada autodestrutiva e levar a falência de múltiplos órgãos [66].

As citocinas promovem o recrutamento de leucócitos para o sítio inflamatório, bem com sua ativação um consequente aumento da atividade microbicida, sendo a resposta local fundamental para o controle da infecção. A evolução de uma infecção localizada para um quadro sistêmico caracteriza-se pela presença de citocinas pró-inflamatórias na circulação e ativação das células circulantes, podendo, também, haver a presença de bactérias, endotoxinas ou exotoxinas. Estas citocinas desempenham importantes papéis no desenvolvimento da sepse, interferindo no prognóstico, evolução e intensidade do dano tecidual [67].

O sistema imunológico dispõe de uma ampla gama de células e substâncias para a proteção contra agentes infecciosos. Vários tipos celulares tais como monócitos, macrófagos, linfócitos, neutrófilos e células endoteliais participam da resposta inflamatória existente na sepse liberando uma grande variedade de mediadores [68]. Estudos experimentais evidenciam que, mesmo na presença de uma vasodilatação sistêmica, existe uma redução da resposta vasodilatadora na microcirculação a diversos estímulos, assim como uma diminuição da resposta vasoconstritora a uma série de drogas vasopressoras, como a noradrenalina. Esta alteração constitui a base para um entendimento das anormalidades fisiopatológicas que caracterizam a sepse grave. Atualmente, está bem estabelecido que o óxido nítrico (NO) exerce um papel fundamental na etiopatogenia destas anormalidades.[69-71] O óxido nítrico (NO) é sintetizado por diversos tipos de células envolvidas na imunidade e inflamação. A principal enzima envolvida é a isoforma induzível tipo 2 do óxido nítrico sintetase NOS-2 (iNOS) que produz altas quantidades de NO.

NO é importante como uma molécula de defesa contra organismos infecciosos. Também regula a atividade funcional, crescimento e morte de muitos tipos de células imunes e inflamatórias, incluindo macrófagos, linfócitos T, células apresentadoras de antígenos, mastócitos, neutrófilos e células natural killers.[71]

1.8 Inflamação – Citocinas

Citocinas são proteínas secretadas por várias células e apresentam papel importante na comunicação intracelular. Atuam na reação do sistema imune contra patógenos, regulam a hematopoese, angiogênese e participam na reorganização tecidual fisiológica e patológica. [72] Frequentemente as citocinas apresentam vários efeitos na mesma célula alvo. E podem induzir ou suprimir a síntese ou efeito de outras citocinas. [73]

1.8.1 Interleucina-1 α , interleucina-1 β

Interleucina 1 foi originalmente referida como um fator indutor de febre, danos às juntas e regulação de células medulares e linfócitos. IL1 é importante na imunidade inata e adaptativa e é um mediador fundamental na resposta inflamatória. As principais fontes de IL1 são as células fagocitárias mononucleares ativadas (monócitos e macrófagos). Outras fontes são: as células dendríticas epiteliais, endoteliais, células B, astrocitos, fibroblastos e grandes linfócitos granulares. Endotoxinas, macrófagos derivados de outras citocinas como TNF ou a própria IL1, e contato com células CD4+ ativam a produção de IL1. [73, 74]

IL1 alpha é uma citocina de função dupla; sua função biológica é provocada através da mediação da sinalização do IL-1RI, bem como translocação nuclear da pró-IL-1alpha que atua como fator de transcrição, independente da ligação dos receptores superficiais. [74]

IL1 beta é um potente mediador em resposta a infecção e ferimento. /38/ Os níveis de IL-1 beta aumentam após 15 minutos com o LPs e começam a cair após 4 horas. [75] IL-1 alpha e beta ativam a via de sinalização da MAPK e do NFkB.[74]

1.8.2 Interleucina 2

A interleucina 2 (IL-2) é produzida por células regulatórias imunes, principalmente células T, e também é o principal fator de crescimento de linfócitos T. A IL-2 favorece a proliferação e diferenciação de qualquer célula que tenha alta afinidade com o receptor de IL2. Atua como regulador celular e humoral na resposta à inflamação crônica. [76]

1.8.3 Interleucina 4

A interleucina 4 (IL-4) é produzida por células TH₂, mastócitos, e células NK (natural killer), além de basófilos e eosinófilos. A IL-4 induz células TCD4⁺ a diferenciarem em células TH₂ enquanto suprime o desenvolvimento de células TH₁. Atua como fator de crescimento para células B, células T e mastócitos. [76, 77]

1.8.4 Interleucina 6

A Interleucina 6 (IL-6) é sintetizada por fagócitos mononucleares, endotélio vascular, fibroblasto e outras células em resposta a um trauma, queimadura, dano tecidual e inflamação.

Está envolvida na ativação de células T IL6 é uma citocinas que não está apenas envolvida na inflamação e infecção, mas também na regulação dos processos metabólicos, regenerativo e neural. [76, 78]

1.8.5 Interleucina 10

A Interleucina 10 (IL-10) é uma importante citocina imunoregulatória. É secretada por macrófagos, células TH₂ e mastócitos. O principal efeito imunobiológico é a regulação do balanço TH₁/TH₂. É um promotor da resposta TH₂ através da inibição da produção do IFN- γ por células TH₁. [77]

1.8.6 Interleucina 12p40 e Interleucina 12p70

A Interleucina 12 é principalmente produzida por fagócitos como monócitos, macrófagos, PMN e por células B, em resposta a produtos bacterianos e parasitas intracelulares. IL 12 promove as defesas imunes através do fenótipo TH₁ e do aumento de células NK e da produção de IFN. A subunidade p40 é secretada como um homodímero e um antagonista natural da IL12p70, atuando como um competidor na ligação do receptor da IL12p70. AIL12p40 contém um domínio Ig que é compartilhado pela IL-23. É sintetizada por macrófagos quando há uma infecção bacteriana ou viral. Sua principal função é a estimulação da síntese de IFN- γ . [76, 79]

1.8.7 Interleucina 17a e Interleucina 17f

Os genes que codificam a IL-17 A e a IL-17 F são próximos e pertencem ao mesmo cromossomo em camundongos e humanos. Ambas IL-17 A e IL-17 F mediam respostas pró-inflamatórias com certas diferenças dependendo do tipo e do sítio da inflamação. [72] A IL17 é uma citocina pró-inflamatória que atua

contra microorganismos extracelulares e na patogênese de diferentes doenças autoimunes. A IL-17A e IL-17F têm a função na resposta adaptativa imune, particularmente contra bactérias e fungos. Células TH17 são as principais fontes da IL-17. As citocinas IL-1, IL-6 e TGF β influenciam na polarização das células TH17. A principal função da IL-17 é a indução da produção de quimiocinas e citocinas, como a TNF α , que recruta neutrófilos e monócitos para o sítio da ativação de células T.[72, 76]

1.8.8 Interleucina 22

Apesar de ser vista como uma citocina das células TH17, a IL22 é de fato produzida por uma série de células do sistema imune inato e adaptativo. Células TCD4+ (TH1, TH17, TH22), células TCD8+ (Tc17, Tc22) e células NK produzem a IL22. Contudo, em camundongos a IL22 é produzida por células da TH17. Apesar do fato da IL-22 compartilhar a subunidade do receptor IL-10R2 da citocina anti-inflamatória IL-10, ela não induz uma resposta anti-inflamatória dos leucócitos por falta da expressão do IL22R. A expressão forçada do receptor da IL-22 nos leucócitos resulta em uma resposta pró-inflamatória. [80]

1.8.9 Interleucina 23

Citocinas produzidas por células T são contribuidoras inflamatórias para lesões com a intervenção de outras citocinas como a IL-1, IL6 e TNF dependendo da doença inflamatória. A IL23 é produzida por células TH17 e influencia na fisiopatologia de doenças inflamatórias crônicas. Está associada a produção de células TH1 e IL12.[81]

1.8.10 TNF α

O Fator de Necrose Tumoral alpha (TNF α) é principalmente produzido por macrófagos, sobretudo por fagócitos mononucleares ativados por endotoxina. Outras fontes são células T estimuladas por antígenos, células NK ativadas e mastócitos ativados. IFN- γ aumenta a síntese de TNF α . Aumenta a mobilização e função efetiva dos neutrófilos e sua adesão por células endoteliais.[76, 82]

1.8.11 Interferon γ

Interferon γ (IFN- γ) é uma citocina essencial da imunidade contra patógenos intracelulares. O IFN- γ é produzido por células do sistema imune inato e adaptativo: células NK, células TNK, TCD4+ após a diferenciação do TH1, células naïve TCD8+ após estimulação da ativação do TCR, e da ativação das interleucina 12 e 18 (IL-12 e IL-18). Uma das funções do IFN- γ é aumentar a via de apresentação do antígeno classe I, que facilita a célula T citotóxica a reconhecer células infectadas. [83]

1.8.12 Mip α e Mip β

Proteína inflamatória de macrófagos (MIP) 1 α e 1 β tem funções importantes no recrutamento de macrófagos, células dendríticas e células T para os sítios de inflamação e órgãos linfoides. Os genes da MIP-1 α e MIP-1 β são induzidas na maioria das células hematopoiéticas maduras. Contudo, baixos níveis de MIP-1 são expressos construtivamente.[84]

2. OBJETIVOS GERAIS

Analisar se o estresse hiperosmótico através do pré-condicionamento com Solução salina hipertônica (NaCl 7,5%) induz a uma resistência aos efeitos letais do Lipopolissacarídeo *in vivo*.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Analisar o perfil inflamatório durante o pré-condicionamento em duas e quatro horas após sua aplicação.
2. Analisar se outras soluções hiperosmóticas são capazes de induzir a um pré-condicionamento.
3. Pesquisar se o pré-condicionamento com a solução salina hipertônica 7,5% modula favoravelmente o processo inflamatório no plasma, baço, intestino e pulmão de camundongos submetidos à endotoxemia.
4. Avaliar a síntese de óxido nítrico e expressão gênica de iNOS nos tecidos do pulmão, baço e intestino após pré-condicionamento com solução salina hipertônica (NaCl 7,5%).
5. Avaliar o efeito do pré-condicionamento com solução salina hipertônica (NaCl 7,5%) na infiltração neutrofílica no pulmão, baço e intestino de camundongos submetidos a endotoxemia.

3. Métodos

3.1 Modelo Biológico

Foram selecionados camundongos machos Balb C, pesando entre 20-25 gramas, provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Os camundongos foram mantidos em gaiolas por 8 dias em local com temperatura e ciclo de luz controlado, recebendo água e comida a vontade. Os animais permaneceram durante o experimento no Biotério de Manutenção do LIM 17 – Disciplina de Reumatologia, sob responsabilidade do biólogo Antônio dos Santos Filho.

Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as normas estabelecidas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e pelo The Universities Federation for Animals Welfare (UFAW). Nosso projeto recebeu aprovação da Comissão de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CAPPesq). Protocolo da Pesquisa nº 525/13

3.2 Anestesia

Todos os animais foram anestesiados com a associação de ketamina (80 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg), administrada por via intraperitoneal antes de receberem o pré-condicionamento (animais que receberam somente LPS não foram anestesiados antes de receberem o insulto).

3.3 Eutanásia

Após o tratamento os animais foram eutanasiados com associação anestésica de ketamina (80 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg), e o sangue e órgãos do estudo foram coletados.

3.3 Tempo de Estudo

Inflamação - Os ensaios com pré-condicionamento foram realizados 2 ou 4 horas após a primeira, segunda ou terceira dose de solução hipertônica.

Pré- condicionamento - Os ensaios com foram realizados 4 horas após a injeção de LPS e 7 dias de pré-condicionamento com solução salina hipertônica.

3.4- Constituição dos grupos – Protocolo experimental

3.4.1- Sobrevida

Os animais foram pré-condicionados durante 5 dias com diferentes volumes de solução salina hipertônica 7,5%. Após o pré-condicionamento receberam injeção de LPS i.p.. Os animais foram observados a cada 12 horas pelo período de 160 horas. (Figura 2)

Cada grupo está constituído por 10 animais.

- **Grupo D-5**

Os camundongos receberam 3 doses de 2mL/kg de NaCl 7,5% durante 5 dias em dias alternados. Cada dose foi aplicada durante 5 minutos. No sexto e sétimo dia os animais descansaram e no oitavo dia foi aplicada dose de LPS 15mg/kg.

Grupo D-10

Os camundongos receberam 3 doses de 4mL/kg de NaCl 7,5% durante 5 dias em dias alternados. Cada dose foi aplicada durante 5 minutos. No

sexto e sétimo dia os animais descansaram e no oitavo dia foi aplicada dose de LPS 15mg/kg.

- **Grupo D-20**

Os camundongos receberam 3 doses de NaCl 7,5%, com primeira dose de 4mL/kg, segunda dose 6mL/kg e terceira dose 8mL/kg durante 5 dias em dias alternados. Cada dose foi aplicada durante 5 minutos. No sexto e sétimo dia os animais descansaram e no oitavo dia foi aplicada dose de LPS 15mg/kg.

- **Grupo LPS**

Os camundongos receberam dose intraperitoneal (i.p.) de LPS 15mg/kg.

Figura 2 – Esquema de aplicação de pré-condicionamento com diferentes volumes de NaCl 7,5%.

3.4.2- Sobrevida com soluções isotônica e hipertônicas.

Os animais foram pré-condicionados durante 5 dias com soluções isotônicas e hipertônicas. Após o pré-condicionamento receberam injeção de LPS (i.p) e foram observados por 80 horas. (Figura 3)

Cada grupo está constituído por 10 animais.

- **Grupo LPS**

Os camundongos receberam dose intraperitoneal (i.p.) de LPS 15mg/kg.

- **Grupo DM**

Os camundongos receberam 3 doses de manitol 21%, com primeira dose de 8mL/kg, segunda dose 12mL/kg e terceira dose 16mL/kg durante 5 dias em dias alternados. Cada dose foi aplicada durante 5 minutos. No sexto e sétimo dia os animais descansaram e no oitavo dia foi aplicada dose de LPS 15mg/kg.(fig.3)

- **Grupo DS9**

Os camundongos receberam 3 doses de NaCl 0,9%, com primeira dose de 8mL/kg, segunda dose 12mL/kg e terceira dose 16mL/kg durante 5 dias em dias alternados. Cada dose foi aplicada durante 5 minutos. No sexto e sétimo dia os animais descansaram e no oitavo dia foi aplicada dose de LPS 15mg/kg.

- **Grupo DH3**

Os camundongos receberam 3 doses de NaCl 3,5%, com primeira dose de 8mL/kg, segunda dose 12mL/kg e terceira dose 16mL/kg durante 5 dias em dias alternados. Cada dose foi aplicada durante 5 minutos. No sexto e sétimo dia os animais descansaram e no oitavo dia foi aplicada dose de LPS 15mg/kg.

Figura 3 – Esquema pré-condicionamento com soluções isotônicas e hipertônicas

3.4.2- Sobrevida com soluções hiperosmóticas

Os animais foram pré-condicionados durante 5 dias com soluções hiperosmóticas. Após o pré-condicionamento receberam injeção de LPS (i.p) e foram observados por 160 horas. (Fig. 4)

- **Grupo DS**

Os camundongos receberam 3 doses de Sorbitol 45%, com primeira dose de 4mL/kg, segunda dose 6mL/kg e terceira dose 8mL/kg durante 5 dias em dias alternados. Cada dose foi aplicada durante 5 minutos.

No sexto e sétimo dia os animais descansaram e no oitavo dia foi aplicada dose de LPS 15mg/kg. (Fig. 4)

- **Grupo DU**

Os camundongos receberam 3 doses de Uréia 45%, com primeira dose de 4mL/kg, segunda dose 6mL/kg e terceira dose 8mL/kg durante 5 dias em dias alternados. Cada dose foi aplicada durante 5 minutos.

No sexto e sétimo dia os animais descansaram e no oitavo dia foi aplicada dose de LPS 15mg/kg. (Fig. 4)

- **Grupo HL**

Os camundongos receberam 3 doses de Uréia 45%, com primeira dose de 4mL/kg, segunda dose 6mL/kg e terceira dose 8mL/kg durante 5 dias em dias alternados. Cada dose foi aplicada durante 5 minutos.

No sexto e sétimo dia os animais descansaram e no oitavo dia foi aplicada dose de LPS 15mg/kg. (Fig. 4)

- **Grupo LPS**

Os camundongos receberam dose intraperitoneal (i.p.) de LPS 15mg/kg.

Figura 4 – Esquema de pré-condicionamento com soluções hiperosmóticas.

3.4.2- Caracterização do modelo de inflamação no plasma

A análise da inflamação sistêmica durante o pré-condicionamento com NaCl 7,5% foi feita após 2 ou 4 horas de cada aplicação em doses crescentes.

Cada grupo está constituído por 6 animais.

- **Grupo controle – CTL**

Os camundongos não receberam insulto ou pré-condicionamento

- **Grupo 1 dose de NaCl - 2 horas ou 4 horas de descanso – D1**

Os camundongos receberam uma dose de 4mL/kg de solução salina hipertônica 7,5% (NaCl 7,5%) e foram eutanasiados após 2 ou 4 horas.

- **Grupo 2 doses 2 horas ou 4 horas – D2**

Os camundongos receberam NaCl 7,5% na dose de 4mL/kg no dia 1 e após 48 horas receberam uma dose de 6mL/kg sendo eutanasiados após 2 ou 4 horas.

- **Grupo 3 doses 2 horas ou 4 horas – D3**

Os camundongos receberam NaCl 7,5% na dose de 4mL/kg no dia1, uma dose de 6mL/kg no dia 3 e no dia 5 receberam uma dose de 8mL/kg.

Foram eutanasiados após 2 ou 4 horas horas.

Figura 5 – Esquema de análise de aplicação e eutanásia dos animais que foram submetidos à análise inflamatória durante as doses do pré-condicionamento com solução salina hipertônica 7,5%.

3.4.2- Efeito do pré-condicionamento com NaCl 7,5% na endotoxemia no plasma e tecido (pulmão, baço e intestino)

Os animais foram pré-condicionados durante 5 dias com solução salina hipertônica 7,5%. Após o pré-condicionamento receberam injeção de LPS (i.p) 15mg/kg (Figura 5)

Cada grupo está constituído por no mínimo 6 animais.

- **Grupo controle – CTL**

Os camundongos não receberam insulto ou pré-condicionamento

- **Grupo hipertônica – hiper**

Os camundongos receberam NaCl 7,5% na dose de 4mL/kg no dia1, uma dose de 6mL/kg no dia 3 e no dia 5 receberam uma dose de 8mL/kg. Foram eutanasiados no dia 8.

- **Grupo LPS**

Os camundongos foram submetidos a endotoxemia por injeção intraperitoneal (i.p.) na dose letal de 15mg/kg de *Lipopolysaccharide* (LPS) de *Escherichia coli* (serotype 026:B26/Sigma, MO, USA) (95). Os animais foram eutanasiados 4 horas após o insulto.

- **Grupo hipertônica com LPS – HL**

Os camundongos receberam NaCl 7,5% na dose de 4mL/kg no dia1, uma dose de 6mL/kg no dia 3 e no dia 5 receberam uma dose de 8mL/kg. No dia 8 receberam injeção intraperitoneal (i.p.) na dose letal de 15mg/kg de *Lipopolysaccharide* (LPS) de *Escherichia coli* (serotype 026:B26/Sigma, MO, USA) (95). Os animais foram eutanasiados 4 horas após o insulto.

Figura 6- Esquema pré-condicionamento com NaCl 7,5% e desafio endotoxêmico.

3.6 Análise das citocinas por Milliplex

As citocinas IL- α , IL-1 β , IL-2, IL4, IL6, IL10, IL12 p40, IL12 p70, IL-17A, IL-17F, IL-22, IL-23, IFN- γ , MIP-1alpha, MIP-1beta e TNF foram dosadas á partir de “beads” magnéticas com kit da Millipore™ MILLIPLEX MAP Mouse Cytokine. Foi usado plasma que extraído através de centrifugação de 4.000g por 12 minutos. Foi adicionado 200 μ L de Wash buffer em cada poço e removido os resíduos após 10 minutos. Foi adicionado 25 μ L de curva padrão ou controle nos poços apropriados. Após foi colocado 25 μ L de Assay buffer nos poços das amostras e em seguida 25 μ L de solução matrix e 25 μ L de amostras em cada poço. Na proporção de 1:1 (amostra e Assay Buffer).

Depois foi vortexado o “Mixing Bottle” e adicionado 25 μ L de Mixed Beads em cada poço. A placa ficou no agitador por 18 horas em temperatura de 4°C.

A placa foi lavada duas vezes com ajuda da placa magnética para a fixação das beads. Adicionado anticorpo de detecção e a placa ficou incubando por aproximadamente 60 minutos.

Após este período foi adicionada 25µL de Streptavidin-Phycoerythrin em cada poço que continha 25µL de anticorpo de detecção. A placa foi agitada por 30 minutos em temperatura ambiente. A placa foi lavada mais duas vezes (com ajuda da placa magnética). Foi adicionado Sheath fluid em cada poço e agitado por 5 minutos. A placa foi lida na MAGPIX® com o software xPONENT. O método utilizado foi seguido de acordo com as instruções contidas no kit da Millipore Milliplex® MAP kit.

3.7 Análise das citocinas por ELISA

As citocinas IL6, IL10 e TNF alpha foram dosadas a partir de homogenato de tecido pulmonar, intestinal e esplênico (baço). Aproximadamente 100mg de tecido foram pulverizados em nitrogênio líquido. O material homogeneizado em 1mL de tampão de lise TX100 (100mM de Tris HCL pH 7,5%, 1% de desoxicolato de sódio, 1% de TritonX – 100, 150mM de NaCl 0,1% SDS) acrescido de inibidores de proteases (1mg/mL pepstatina A, 100 mM PMSF). Em seguida as amostras foram centrifugadas a 14000g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado, e a concentração de proteínas foi quantificada pelo método de Bradford (Bio – Rad, CA, USA). As dosagens foram feitas por ELISA, com kit da R&D Systems (Minneapolis, MN, USA). Placas de 96 poços foram adsorvidas com anticorpo de captura monoclonal anti-citocina de interesse, diluídos em PBS por 12 horas. Em seguida, as placas foram lavadas com solução de PBS contendo 0,05% de Tween 20. Os sítios inespecíficos foram bloqueados com PBS contendo 1% de BSA (soro albumina bovina – Sigma MO, USA), por 1 hora. A placa foi lavada para remoção de solução de bloqueio. Em seguida, as amostras e os padrões foram colocados nos respectivos poços e incubados por 2 horas. Ao final do período, as placas foram

lavadas. Adicionou-se o anticorpo de detecção conjugado a peroxidase, incubou-se por 2 horas. As placas foram novamente lavadas. Ao final das lavagens, adicionou-se o substrato da peroxidase-tetrametibenzidina gerou cor azul. Ao final da incubação adicionou-se solução parada (H_2SO_4 -2N) obtendo-se a coloração amarelada.

A densidade óptica de cada poço foi detectada através de leitor de placa Spectramax TM Nicroplate Reader (Molecular devises, Minnesota, USA) no comprimento de onda de 450nm. As concentrações das citocinas (pg/mL) foram normalizadas pelas concentrações de proteína total.

3.8 Quantificação de nitrito – Reação de Griess

O método de detecção foi baseado na reação do nitrito com reagente de Griess, produzindo uma reação colorimétrica detectada por absorbância com leitura em comprimento de onda de 595 nm. O nitrato presente na amostra foi reduzido a nitrito utilizando-se as enzimas nitrato redutase e NADPH. A concentração de nitrito foi dividida pela quantidade de proteína presente nas amostras. Para reação de Griess foram adicionados 100 μ L da solução de trabalho (solução A: 1% de sulfanilamida em ácido fosfórico a 5%, e solução B: 0,1% de niftiletilenodiamina em água destilada, misturadas partes iguais das soluções A e B). Após 10 minutos de incubação a temperatura ambiente foi realizada a leitura em comprimento de onda de 595nm no leitor de placa Spectramax TM Nicroplate Reader (Molecular devises, Minnesota, USA)

3.9- Análise da infiltração de neutrófilos pelo método de quantificação de mieloperoxidase – MPO

A mieloperoxidase é uma enzima relacionada com as células brancas do sangue associada com inflamação e infecção. A explosão (burst) oxidativa decorrente da ativação do neutrófilo é uma das responsáveis pela produção de espécies reativas de oxigênio. A dosagem de mieloperoxidase foi utilizada como um índice de infiltração neutrofílica nos tecidos. [85]

Os tecidos foram coletados e 100mg serão pulverizados e ressuspensos em 1ml de solução de MOPS (10 mM e hexa-decil-trimetil-amônio-brometo (HTAB) 125mg para cada 25 ml de solução). As amostras foram homogeneizadas por 1 hora em agitador do tipo gangorra e em sonicaador (Fisher Scientific® sonic dismembrator model 100) por 3 vezes durante 3 segundos. Após esse procedimento serão centrifugadas a 10.000 rpm (10.621g) por 40 minutos a 4°C. O

O experimento constituiu em reagir amostras ou padrões em volume de 20µL com 20 µL de tetrametilbenzidina 16mM em DMSO e 140 µL de PBS. Após 5 minutos foi adicionado 20 µL H₂O₂ a 0,03%. A absorbância foi obtida utilizando comprimento de onda de 650nm em leitor de placa VersaMax™ Microplate Reader (Molecular devices, Minnnesota, USA).

3.10- Análise estatística

Os dados são apresentados como média±erro padrão da média. Para análise estatística de comparação de médias, foi utilizado análise de variância (Anova) com pós-teste de Tukey, sendo considerados como diferença significativa os grupos que obtiverem $p < 0,05$. O programa Graphpad Prisma – Versão 5

(GraphPad Software Incorporation) foi utilizado para análises de curva de sobrevida foi utilizado o teste de Log rank.

4. Resultados

A fim de analisarmos se estresse hiperosmótico induziria um pré-condicionamento *in vivo* utilizamos a solução salina hipertônica 7,5% nas doses de 2mL/kg, 4mL/kg e doses crescentes de 4mL/kg, 6mL/kg e 8mL/kg antes de induzir endotoxemia. Os resultados do grupo de doses crescentes foram significantes e pudemos constatar que houve o pré-condicionamento e diminuição da mortalidade dos animais endoxêmicos. (Figura 6)

Figura 7. Efeito do pré-condicionamento com diferentes doses de NaCl 7,5% em animais endotoxêmicos.

Sobrevida de camundongos Balb/c com pré-condicionamento usando solução salina hipertônica 7,5% (NaCl 7,5%); separados em grupos LPS (injeção de LPS dose letal 15mg/kg i.p.), D5 - animais que receberam 3 doses de 2mL/kg de NaCl 7,5% em dias alternados e posteriormente receberam dose letal de LPS 15mg/kg, D10 - animais que receberam 3 doses de 4mg/kg de NaCl 7,5% em dias alternados e posteriormente dose letal de LPS 15mg/kg, D20 - animais que receberam doses de 4mg/kg, 6mg/kg e 8 mg/kg de NaCl 7,5% em dias alternados e posteriormente receberam dose letal de LPS 15mg/kg). $p > 0,05$ *vs LPS.

Após este resultado analisamos o perfil inflamatório durante o pré- condicionamento, para isso analisamos algumas citocinas após duas e quatro horas de cada dose aplicada. Os resultados revelaram diferentes padrões. Um padrão foi a diminuição progressiva nas doses subsequentes da SSH denominado padrão decrescente (Figuras 8 a 15); outro padrão observado foi um aumento dos níveis de citocinas com as doses subseqüenciais da SSH denominado padrão crescente. (Figuras 16 a 21). Outras não se encaixaram nestes padrões apresentados.

Padrão Decrescente -

Figura 8 – Concentrações de Interleucinas pró-inflamatórias IL-1 α foram determinadas através de kit Milliplex no plasma de camundongos Balb/c após 2 horas. Denominados – CTL (sem nenhum insulto), D1 animais receberam 1 dose (i.v.) de 4mg/kg de NaCl 7,5% e eutanasiados após 2 horas, D2 animais receberam 2 doses de NaCl 7,5% (i.v.) (primeira dose de 4mg/kg no dia 1 uma dose de 6mg/kg no dia 3) e eutanasiados após 2 horas, D3 - animais receberam 3 doses de NaCl 7,5% (i.v.) primeira dose de 4mg/kg, no dia 1, segunda dose de 6mg/kg no dia 3 e terceira dose de 8mg/kg no dia 5. Após 2 foram eutanasiados. Valores expressos em média $\pm$ EPM e n=6 animais p<0,05 * vs CTL, Ω vs todos os grupos

Figura 9 – Concentrações de Interleucinas pró-inflamatórias IL-1 β foram determinadas através de kit Milliplex no plasma de camundongos Balb/c após 2 horas. Denominados – CTL (sem nenhum insulto), D1 animais receberam 1 dose (i.v.) de 4mg/kg de NaCl 7,5% e eutanasiados após 2 horas, D2 animais receberam 2 doses de NaCl 7,5% (i.v.) (primeira dose de 4mg/kg no dia 1 uma dose de 6mg/kg no dia 3) e eutanasiados após 2 horas, D3 - animais receberam 3 doses de NaCl 7,5% (i.v.) primeira dose de 4mg/kg, no dia 1, segunda dose de 6mg/kg no dia 3 e terceira dose de 8mg/kg no dia 5. Após 2 foram eutanasiados. Valores expressos em média $\pm$ EPM e n=6 animais p<0,05 * vs CTL.

Figura 10 – Concentrações de Interleucinas pró-inflamatórias IL-12p40 foram determinadas através de kit Milliplex no plasma de camundongos Balb/c após 2 horas. Denominados – CTL (sem nenhum insulto), D1 animais receberam 1 dose (i.v.) de 4mg/kg de NaCl 7,5% e

eutanasiados após 2 horas, D2 animais receberam 2 doses de NaCl 7,5% (i.v.) (primeira dose de 4mg/kg no dia 1 uma dose de 6mg/kg no dia 3) e eutanasiados após 2 horas, D3 - animais receberam 3 doses de NaCl 7,5% (i.v.) primeira dose de 4mg/kg, no dia 1, segunda dose de 6mg/kg no dia 3 e terceira dose de 8mg/kg no dia 5. Após 2 horas foram eutanasiados. Valores expressos em média $\pm$ EPM e n=6 animais $p<0,05$ * vs CTL.

Figura 11 – Concentrações de Interleucinas pró-inflamatórias IL-12p70 foram determinadas através de kit Milliplex no plasma de camundongos Balb/c após 2 horas. Denominados – CTL (sem nenhum insulto), D1 animais receberam 1 dose (i.v.) de 4mg/kg de NaCl 7,5% e eutanasiados após 2 horas, D2 animais receberam 2 doses de NaCl 7,5% (i.v.) (primeira dose de 4mg/kg no dia 1 uma dose de 6mg/kg no dia 3) e eutanasiados após 2 horas, D3 - animais receberam 3 doses de NaCl 7,5% (i.v.) primeira dose de 4mg/kg, no dia 1, segunda dose de 6mg/kg no dia 3 e terceira dose de 8mg/kg no dia 5. Após 2 horas foram eutanasiados. Valores expressos em média $\pm$ EPM e n=6 animais $p<0,05$ * vs CTL, b vs D3.

Figura 12 – Concentrações de Interleucinas pró-inflamatórias IL-17A foram determinadas através de kit Milliplex no plasma de camundongos Balb/c após 2 horas. Denominados – CTL (sem nenhum insulto), D1 animais receberam 1 dose (i.v.) de 4mg/kg de NaCl 7,5% e eutanasiados após 2 horas, D2 animais receberam 2 doses de NaCl 7,5% (i.v.) (primeira dose de 4mg/kg no dia 1 uma dose de 6mg/kg no dia 3) e eutanasiados após 2 horas, D3 - animais receberam 3 doses de NaCl 7,5% (i.v.) primeira dose de 4mg/kg, no dia 1, segunda dose de 6mg/kg no dia 3 e terceira dose de 8mg/kg no dia 5. Após 2 horas foram eutanasiados. Valores expressos em média $\pm$ EPM e n=6 animais $p < 0,05$ * vs CTL, b vs D3.

Figura 13 – Concentrações de Interleucinas pró-inflamatórias IL-17F foram determinadas através de kit Milliplex no plasma de camundongos Balb/c após 2 horas. Denominados – CTL (sem nenhum insulto), D1 animais receberam 1 dose (i.v.) de 4mg/kg de NaCl 7,5% e eutanasiados após 2 horas, D2 animais receberam 2 doses de NaCl 7,5% (i.v.) (primeira dose de 4mg/kg no dia 1 uma dose de 6mg/kg no dia 3) e eutanasiados após 2 horas, D3 - animais

receberam 3 doses de NaCl 7,5% (i.v.) primeira dose de 4mg/kg, no dia 1, segunda dose de 6mg/kg no dia 3 e terceira dose de 8mg/kg no dia 5. Após 2 horas foram eutanasiados. Valores expressos em média $\pm$ EPM e n=6 animais $p<0,05$.

Figura 14 – Concentrações de Interleucinas pró-inflamatórias IL-23 foram determinadas através de kit Milliplex no plasma de camundongos Balb/c após 2 horas. Denominados – CTL (sem nenhum insulto), D1 animais receberam 1 dose (i.v.) de 4mg/kg de NaCl 7,5% e eutanasiados após 2 horas, D2 animais receberam 2 doses de NaCl 7,5% (i.v.) (primeira dose de 4mg/kg no dia 1 uma dose de 6mg/kg no dia 3) e eutanasiados após 2 horas, D3 - animais receberam 3 doses de NaCl 7,5% (i.v.) primeira dose de 4mg/kg, no dia 1, segunda dose de 6mg/kg no dia 3 e terceira dose de 8mg/kg no dia 5. Após 2 horas foram eutanasiados. Valores expressos em média $\pm$ EPM e n=6 animais $p<0,05$ * vs CTL.

Figura 15 - As Concentrações de Interleucina 4 (IL-4) foram determinadas através de Miliplex no plasma de camundongos Balb/c após 2 horas. Denominadas CTL (sem nenhum insulto), D1 animais receberam 1 dose (i.v.) de 4mg/kg de NaCl 7,5% e eutanasiados após 2 horas, D2 animais receberam 2 doses de NaCl 7,5% (i.v.) (primeira dose de 4mg/kg no dia 1 uma dose de 6mg/kg no dia 3) e eutanasiados após 2 horas. D3 - animais receberam 3 doses de NaCl 7,5% (i.v.) primeira dose de 4mg/kg, no dia 1, 6mg/kg no dia 3 e 8mg/kg no dia 5. Após 2 horas dos procedimentos foram sacrificados. Valores expressos em média $\pm$ EPM e n=6 animais $p < 0,05$ * vs CTL.

Padrão Crescente

Figura 16 - As Concentrações de Interleucina 6 (IL-6) foram determinadas através de Miliplex no plasma de camundongos Balb/c após 2 horas. Denominadas CTL (sem nenhum insulto), D1

animais receberam 1 dose (i.v.) de 4mg/kg de NaCl 7,5% e eutanasiados após 2 horas, D2 animais receberam 2 doses de NaCl 7,5% (i.v.) (primeira dose de 4mg/kg no dia 1 uma dose de 6mg/kg no dia 3) e eutanasiados após 2 horas. D3 - animais receberam 3 doses de NaCl 7,5% (i.v.) primeira dose de 4mg/kg, no dia 1, 6mg/kg no dia 3 e 8mg/kg no dia 5. Após 2 horas dos procedimentos foram sacrificados. Valores expressos em média $\pm$ EPM e n=6 animais $p<0,05$ * vs CTL, #vs D1.

Figura 17- As Concentrações de Interleucina 22 (IL-22) foram determinadas através de Miliplex no plasma de camundongos Balb/c após 2 horas. Denominadas CTL (sem nenhum insulto), D1 animais receberam 1 dose (i.v.) de 4mg/kg de NaCl 7,5% e eutanasiados após 2 horas, D2 animais receberam 2 doses de NaCl 7,5% (i.v.) (primeira dose de 4mg/kg no dia 1 uma dose de 6mg/kg no dia 3) e eutanasiados após 2 horas. D3 - animais receberam 3 doses de NaCl 7,5% (i.v.) primeira dose de 4mg/kg, no dia 1, 6mg/kg no dia 3 e 8mg/kg no dia 5. Após 2 horas dos procedimentos foram sacrificados. Valores expressos em média $\pm$ EPM e n=6 animais $p<0,05$ * vs CTL.

Figura 18 - As Concentrações de TNF- α foram determinadas através de Miliplex no plasma de camundongos Balb/c após 2 horas. Denominadas CTL (sem nenhum insulto), D1 animais receberam 1 dose (i.v.) de 4mg/kg de NaCl 7,5% e eutanasiados após 2 horas, D2 animais receberam 2 doses de NaCl 7,5% (i.v.) (primeira dose de 4mg/kg no dia 1 uma dose de 6mg/kg no dia 3) e eutanasiados após 2 horas. D3 - animais receberam 3 doses de NaCl 7,5% (i.v.) primeira dose de 4mg/kg, no dia 1, 6mg/kg no dia 3 e 8mg/kg no dia 5. Após 2 horas dos procedimentos foram sacrificados. Valores expressos em média $\pm$ EPM e n=6 animais $p<0,05$ * vs CTL.

Figura 19 - As Concentrações de MIP- α foram determinadas através de Miliplex no plasma de camundongos Balb/c após 2 horas. Denominadas CTL (sem nenhum insulto), D1 animais receberam 1 dose (i.v.) de 4mg/kg de NaCl 7,5% e eutanasiados após 2 horas, D2 animais receberam 2 doses de NaCl 7,5% (i.v.) (primeira dose de 4mg/kg no dia 1 uma dose de 6mg/kg no dia 3) e eutanasiados após 2 horas. D3 - animais receberam 3 doses de NaCl 7,5% (i.v.) primeira dose de 4mg/kg, no dia 1, 6mg/kg no dia 3 e 8mg/kg no dia 5. Após 2 horas dos

procedimentos foram sacrificados. Valores expressos em média $\pm$ EPM e n=6 animais $p<0,05$ * vs CTL.

Figura 20 - As Concentrações de MIP - β foram determinadas através de Miliplex no plasma de camundongos Balb/c após 2 horas. Denominadas CTL (sem nenhum insulto), D1 animais receberam 1 dose (i.v.) de 4mg/kg de NaCl 7,5% e eutanasiados após 2 horas, D2 animais receberam 2 doses de NaCl 7,5% (i.v.) (primeira dose de 4mg/kg no dia 1 uma dose de 6mg/kg no dia 3) e eutanasiados após 2 horas. D3 - animais receberam 3 doses de NaCl 7,5% (i.v.) primeira dose de 4mg/kg, no dia 1, 6mg/kg no dia 3 e 8mg/kg no dia 5. Após 2 horas dos procedimentos foram sacrificados. Valores expressos em média $\pm$ EPM e n=6 animais $p<0,05$ Ω vs CTL.

Figura 21 - Concentrações de Interleucina IL-10 foram determinadas através de kit Milliplex no plasma de camundongos Balb/c após 2 horas – CTL (sem nenhum insulto), D1 animais

receberam 1 dose (i.v.) de 4mg/kg de NaCl 7,5% e eutanasiados após 2 horas, D2 animais receberam 2 doses de NaCl 7,5% (i.v.) (primeira dose de 4mg/kg no dia 1 uma dose de 6mg/kg no dia 3) e eutanasiados após 2 horas, D3 - animais receberam 3 doses de NaCl 7,5% (i.v.) primeira dose de 4mg/kg, no dia 1, 6mg/kg no dia 3 e 8mg/kg no dia 5. Após 2 horas foram eutanasiados. Valores expressos em média $\pm$ EPM e n=6 animais $p<0,05$, Ω vs todos os grupos.

Não obedece aos padrões acima

Figura 22 - Concentrações de Interleucina 2 IL-2 foram determinadas através de kit Milliplex no plasma de camundongos Balb/c após 2 horas – CTL (sem nenhum insulto), D1 animais receberam 1 dose (i.v.) de 4mg/kg de NaCl 7,5% e eutanasiados após 2 horas, D2 animais receberam 2 doses de NaCl 7,5% (i.v.) (primeira dose de 4mg/kg no dia 1 uma dose de 6mg/kg no dia 3) e eutanasiados após 2 horas, D3 - animais receberam 3 doses de NaCl 7,5% (i.v.) primeira dose de 4mg/kg, no dia 1, 6mg/kg no dia 3 e 8mg/kg no dia 5. Após 2 horas foram eutanasiados. Valores expressos em média $\pm$ EPM e n=6 animais $p<0,05$, Ω vs todos os grupos.

Figura 23 - Concentrações de IFN- γ foram determinadas através de kit Milliplex no plasma de camundongos Balb/c após 2 horas – CTL (sem nenhum insulto), D1 animais receberam 1 dose (i.v.) de 4mg/kg de NaCl 7,5% e eutanasiados após 2 horas, D2 animais receberam 2 doses de NaCl 7,5% (i.v.) (primeira dose de 4mg/kg no dia 1 uma dose de 6mg/kg no dia 3) e eutanasiados após 2 horas, D3 - animais receberam 3 doses de NaCl 7,5% (i.v.) primeira dose de 4mg/kg, no dia 1, 6mg/kg no dia 3 e 8mg/kg no dia 5. Após 2 horas foram eutanasiados. Valores expressos em média $\pm$ EPM e n=6 animais $p < 0,05$, *vs CTL, # vs D1.

Em 4 horas após a aplicação os resultados também revelaram diferentes padrões. Um padrão foi a diminuição progressiva nas doses subsequentes da SSH denominado padrão decrescente (Figuras 24 a 29); outro padrão observado foi um aumento dos níveis de citocinas com as doses subsequenciais da SSH denominado padrão crescente. (Figuras 30 a 38). Outras não se encaixaram nestes padrões apresentados.

Padrão Decrescente - Os níveis de ativação das citocinas foi maior na primeira dose e diminuindo após as subsequentes doses.

Figura 24 - Concentrações de Interleucina 1 β (IL-1 β) foram determinadas através de kit Milliplex no plasma de camundongos Balb/c após 4 horas – CTL (sem nenhum insulto), D1 animais receberam 1 dose (i.v.) de 4mg/kg de NaCl 7,5% e eutanasiados após 4 horas, D2 animais receberam 2 doses de NaCl 7,5% (i.v.) (primeira dose de 4mg/kg no dia 1 uma dose de 6mg/kg no dia 3) e eutanasiados após 4 horas, D3 - animais receberam 3 doses de NaCl 7,5% (i.v.) primeira dose de 4mg/kg, no dia 1, 6mg/kg no dia 3 e 8mg/kg no dia 5. Após 4 horas foram eutanasiados. Valores expressos em média $\pm$ EPM e n=6 animais p<0,05 Ω vs todos os outros grupos.

Figura 25 - Concentrações de Interleucina 2 (IL-2) foram determinadas através de kit Milliplex no plasma de camundongos Balb/c após 4 horas – CTL (sem nenhum insulto), D1 animais receberam 1 dose (i.v.) de 4mg/kg de NaCl 7,5% e eutanasiados após 4 horas, D2 animais receberam 2 doses de NaCl 7,5% (i.v.) (primeira dose de 4mg/kg no dia 1 uma dose de 6mg/kg no dia 3) e eutanasiados após 4 horas, D3 - animais receberam 3 doses de NaCl 7,5% (i.v.)

primeira dose de 4mg/kg, no dia 1, 6mg/kg no dia 3 e 8mg/kg no dia 5. Após 4 horas foram eutanasiados. Valores expressos em média $\pm$ EPM e n=6 animais $p<0,05$ Ω vs todos os outros grupos.

Figura 26 - Concentrações de Interleucina 6 (IL-6) foram determinadas através de kit Milliplex no plasma de camundongos Balb/c após 4 horas – CTL (sem nenhum insulto), D1 animais receberam 1 dose (i.v.) de 4mg/kg de NaCl 7,5% e eutanasiados após 4 horas, D2 animais receberam 2 doses de NaCl 7,5% (i.v.) (primeira dose de 4mg/kg no dia 1 uma dose de 6mg/kg no dia 3) e eutanasiados após 4 horas, D3 - animais receberam 3 doses de NaCl 7,5% (i.v.) primeira dose de 4mg/kg, no dia 1, 6mg/kg no dia 3 e 8mg/kg no dia 5. Após 4 horas foram eutanasiados. Valores expressos em média $\pm$ EPM e n=6 animais $p<0,05$ Ω vs todos os outros grupos.

Figura 27 - Concentrações de Interleucina 12p40 (IL-12p40) foram determinadas através de kit Milliplex no plasma de camundongos Balb/c após 4 horas – CTL (sem nenhum insulto), D1 animais receberam 1 dose (i.v.) de 4mg/kg de NaCl 7,5% e eutanasiados após 4 horas, D2

animais receberam 2 doses de NaCl 7,5% (i.v.) (primeira dose de 4mg/kg no dia 1 uma dose de 6mg/kg no dia 3) e eutanasiados após 4 horas, D3 - animais receberam 3 doses de NaCl 7,5% (i.v.) primeira dose de 4mg/kg, no dia 1, 6mg/kg no dia 3 e 8mg/kg no dia 5. Após 4 horas foram eutanasiados. Valores expressos em média $\pm$ EPM e n=6 animais $p<0,05$ * vs CTL, b vs D3.

Figura 28 - Concentrações de Interleucina 22 (IL-22) foram determinadas através de kit Milliplex no plasma de camundongos Balb/c após 4 horas – CTL (sem nenhum insulto), D1 animais receberam 1 dose (i.v.) de 4mg/kg de NaCl 7,5% e eutanasiados após 4 horas, D2 animais receberam 2 doses de NaCl 7,5% (i.v.) (primeira dose de 4mg/kg no dia 1 uma dose de 6mg/kg no dia 3) e eutanasiados após 4 horas, D3 - animais receberam 3 doses de NaCl 7,5% (i.v.) primeira dose de 4mg/kg, no dia 1, 6mg/kg no dia 3 e 8mg/kg no dia 5. Após 4 horas foram eutanasiados. Valores expressos em média $\pm$ EPM e n=6 animais $p<0,05$ * vs CTL, b vs D3.

Figura 29 - Concentrações de IFN- γ foram determinadas através de kit Milliplex no plasma de camundongos Balb/c após 4 horas – CTL (sem nenhum insulto), D1 animais receberam 1 dose (i.v.) de 4mg/kg de NaCl 7,5% e eutanasiados após 4 horas, D2 animais receberam 2 doses de NaCl 7,5% (i.v.) (primeira dose de 4mg/kg no dia 1 uma dose de 6mg/kg no dia 3) e eutanasiados após 4 horas, D3 - animais receberam 3 doses de NaCl 7,5% (i.v.) primeira dose de 4mg/kg, no dia 1, 6mg/kg no dia 3 e 8mg/kg no dia 5. Após 4 horas foram eutanasiados. Valores expressos em média $\pm$ EPM e n=6 animais $p < 0,05$ * vs CTL, b vs D3.

Padrão crescente: Citocinas apresentaram uma maior ativação ao longo das doses de SSH 7,5% para diminuir na após a última aplicação

Figura 30 - Concentrações de Interleucina 1 α (IL-1 α) foram determinadas através de kit Milliplex no plasma de camundongos Balb/c após 4 horas – CTL (sem nenhum insulto), D1 animais receberam 1 dose (i.v.) de 4mg/kg de NaCl 7,5% e eutanasiados após 4 horas, D2

animais receberam 2 doses de NaCl 7,5% (i.v.) (primeira dose de 4mg/kg no dia 1 uma dose de 6mg/kg no dia 3) e eutanasiados após 4 horas, D3 - animais receberam 3 doses de NaCl 7,5% (i.v.) primeira dose de 4mg/kg, no dia 1, 6mg/kg no dia 3 e 8mg/kg no dia 5. Após 4 horas foram eutanasiados. Valores expressos em média $\pm$ EPM e n=6 animais $p<0,05$ * vs CTL, b vs D3.

Figura 31 - Concentrações de Interleucina 10 (IL-10) foram determinadas através de kit Milliplex no plasma de camundongos Balb/c após 4 horas – CTL (sem nenhum insulto), D1 animais receberam 1 dose (i.v.) de 4mg/kg de NaCl 7,5% e eutanasiados após 4 horas, D2 animais receberam 2 doses de NaCl 7,5% (i.v.) (primeira dose de 4mg/kg no dia 1 uma dose de 6mg/kg no dia 3) e eutanasiados após 4 horas, D3 - animais receberam 3 doses de NaCl 7,5% (i.v.) primeira dose de 4mg/kg, no dia 1, 6mg/kg no dia 3 e 8mg/kg no dia 5. Após 4 horas foram eutanasiados. Valores expressos em média $\pm$ EPM e n=6 animais $p<0,05$ Ω vs todos os outros grupos.

Figura 32 - Concentrações de Interleucina 17 A (IL-17A) foram determinadas através de kit Milliplex no plasma de camundongos Balb/c após 4 horas – CTL (sem nenhum insulto), D1

animais receberam 1 dose (i.v.) de 4mg/kg de NaCl 7,5% e eutanasiados após 4 horas, D2 animais receberam 2 doses de NaCl 7,5% (i.v.) (primeira dose de 4mg/kg no dia 1 uma dose de 6mg/kg no dia 3) e eutanasiados após 4 horas, D3 - animais receberam 3 doses de NaCl 7,5% (i.v.) primeira dose de 4mg/kg, no dia 1, 6mg/kg no dia 3 e 8mg/kg no dia 5. Após 4 horas foram eutanasiados. Valores expressos em média $\pm$ EPM e n=6 animais $p<0,05$ Ω vs todos os outros grupos.

Figura 33 - Concentrações de Interleucina 17 A (IL-17A) foram determinadas através de kit Milliplex no plasma de camundongos Balb/c após 4 horas – CTL (sem nenhum insulto), D1 animais receberam 1 dose (i.v.) de 4mg/kg de NaCl 7,5% e eutanasiados após 4 horas, D2 animais receberam 2 doses de NaCl 7,5% (i.v.) (primeira dose de 4mg/kg no dia 1 uma dose de 6mg/kg no dia 3) e eutanasiados após 4 horas, D3 - animais receberam 3 doses de NaCl 7,5% (i.v.) primeira dose de 4mg/kg, no dia 1, 6mg/kg no dia 3 e 8mg/kg no dia 5. Após 4 horas foram eutanasiados. Valores expressos em média $\pm$ EPM e n=6 animais $p<0,05$ Ω vs todos os outros grupos.

Figura 34 - Concentrações de MIP - α foram determinadas através de kit Milliplex no plasma de camundongos Balb/c após 4 horas – CTL (sem nenhum insulto), D1 animais receberam 1 dose (i.v.) de 4mg/kg de NaCl 7,5% e eutanasiados após 4 horas, D2 animais receberam 2 doses de NaCl 7,5% (i.v.) (primeira dose de 4mg/kg no dia 1 uma dose de 6mg/kg no dia 3) e eutanasiados após 4 horas, D3 - animais receberam 3 doses de NaCl 7,5% (i.v.) primeira dose de 4mg/kg, no dia 1, 6mg/kg no dia 3 e 8mg/kg no dia 5. Após 4 horas foram eutanasiados. Valores expressos em média $\pm$ EPM e n=6 animais $p < 0,05$ Ω vs todos os outros grupos.

Figura 35 - Concentrações de Interleucina 23 (IL-23) foram determinadas através de kit Milliplex no plasma de camundongos Balb/c após 4 horas – CTL (sem nenhum insulto), D1 animais receberam 1 dose (i.v.) de 4mg/kg de NaCl 7,5% e eutanasiados após 4 horas, D2 animais receberam 2 doses de NaCl 7,5% (i.v.) (primeira dose de 4mg/kg no dia 1 uma dose de 6mg/kg no dia 3) e eutanasiados após 4 horas, D3 - animais receberam 3 doses de NaCl 7,5% (i.v.) primeira dose de 4mg/kg, no dia 1, 6mg/kg no dia 3 e 8mg/kg no dia 5. Após 4 horas foram eutanasiados. Valores expressos em média $\pm$ EPM e n=6 animais $p < 0,05$ b vs.

Figura 36 - Concentrações de MIP - β foram determinadas através de kit Milliplex no plasma de camundongos Balb/c após 4 horas – CTL (sem nenhum insulto), D1 animais receberam 1 dose (i.v.) de 4mg/kg de NaCl 7,5% e eutanasiados após 4 horas, D2 animais receberam 2 doses de NaCl 7,5% (i.v.) (primeira dose de 4mg/kg no dia 1 uma dose de 6mg/kg no dia 3) e eutanasiados após 4 horas, D3 - animais receberam 3 doses de NaCl 7,5% (i.v.) primeira dose de 4mg/kg, no dia 1, 6mg/kg no dia 3 e 8mg/kg no dia 5. Após 4 horas foram eutanasiados. Valores expressos em média $\pm$ EPM e n=6 animais $p < 0,05$ Ω vs todos os outros grupos.

Figura 37 - Concentrações de TNF- α foram determinadas através de kit Milliplex no plasma de camundongos Balb/c após 4 horas – CTL (sem nenhum insulto), D1 animais receberam 1 dose (i.v.) de 4mg/kg de NaCl 7,5% e eutanasiados após 4 horas, D2 animais receberam 2 doses de NaCl 7,5% (i.v.) (primeira dose de 4mg/kg no dia 1 uma dose de 6mg/kg no dia 3) e eutanasiados após 4 horas, D3 - animais receberam 3 doses de NaCl 7,5% (i.v.) primeira dose

de 4mg/kg, no dia 1, 6mg/kg no dia 3 e 8mg/kg no dia 5. Após 4 horas foram eutanasiados. Valores expressos em média $\pm$ EPM e n=6 animais p<0,05 Ω vs todos os outros grupos.

Figura 38 - Concentrações de Interleucina 4 (IL-4) foram determinadas através de kit Milliplex no plasma de camundongos Balb/c após 4 horas – CTL (sem nenhum insulto), D1 animais receberam 1 dose (i.v.) de 4mg/kg de NaCl 7,5% e eutanasiados após 4 horas, D2 animais receberam 2 doses de NaCl 7,5% (i.v.) (primeira dose de 4mg/kg no dia 1 uma dose de 6mg/kg no dia 3) e eutanasiados após 4 horas, D3 - animais receberam 3 doses de NaCl 7,5% (i.v.) primeira dose de 4mg/kg, no dia 1, 6mg/kg no dia 3 e 8mg/kg no dia 5. Após 4 horas foram eutanasiados. Valores expressos em média $\pm$ EPM e n=6 animais p<0,05.

Padrão crescente a citocina vai elevando conforme as doses são aplicadas

Figura 39 - Concentrações de Interleucina 17F (IL-17F) foram determinadas através de kit Milliplex no plasma de camundongos Balb/c após 4 horas – CTL (sem nenhum insulto), D1

animais receberam 1 dose (i.v.) de 4mg/kg de NaCl 7,5% e eutanasiados após 4 horas, D2 animais receberam 2 doses de NaCl 7,5% (i.v.) (primeira dose de 4mg/kg no dia 1 uma dose de 6mg/kg no dia 3) e eutanasiados após 4 horas, D3 - animais receberam 3 doses de NaCl 7,5% (i.v.) primeira dose de 4mg/kg, no dia 1, 6mg/kg no dia 3 e 8mg/kg no dia 5. Após 4 horas foram eutanasiados. Valores expressos em média $\pm$ EPM e n=6 animais $p < 0,05$ Ω vs todos os outros grupos.

Outras soluções foram testadas para saber se o efeito apresentado era da solução salina hipertônica 7,5% ou do estresse hiperosmótico. Para isso utilizamos soluções de baixa osmolaridade e outras soluções hiperosmóticas. (Figuras 40 e 41)

Figura 40 - Sobrevida de camundongos Balb/c com pré-condicionamento usando soluções de baixa osmolaridade; separados em grupos LPS (injeção de LPS dose letal 15mg/kg i.p.), DM - animais que receberam 3 doses de 8mg/kg, 12mL/kg e 16mL/kg de manitol 21% em dias alternados e posteriormente receberam dose letal de LPS 15mg/kg, DH3 - animais que receberam 3 doses de 8mL/kg, 12mL/kg e 16mL/kg de NaCl 3,5% em dias alternados e posteriormente dose letal de LPS 15mg/kg, DS9 -animais que receberam doses de 8mL/kg, 12mL/kg e 16mL/kg de NaCl 0,9% em dias alternados e posteriormente receberam dose letal de LPS 15mg/kg . $p > 0,05$

Figura 41 - Animais Balb/c foram divididos em grupos: LPS (i.p.) dose letal 15mg/kg; HL – solução salina hipertônica 7,5% (3 doses crescentes em dias alternados); HU - uréia 45% (3 doses crescentes em dias alternados); HS - sorbitol 45% (3 doses crescentes em dias alternados). Os grupos receberam LPS dose letal (15mg/kg) após dois dias de descanso. $P < 0,05$ * vs LPS.

4.1.3 Análise de citocinas em plasma no modelo de pré-condicionamento com Estresse hiperosmótico e desafio com LPS.

Com os resultados obtidos sobre o pré-condicionamento e a resposta inflamatória, foi definido o período de 4 horas para o estudo da resposta inflamatória sistêmica no desafio com o LPS. Foram analisadas as concentrações em citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias.

- Citocinas pró-inflamatórias

Na análise da Interleucina 1-alfa (IL-1 α) após 4 horas observamos que o grupo que recebeu o pré-condicionamento com NaCl 7,5% e o desafio com LPS (HL) teve uma tendência a diminuir em relação ao grupo que só recebeu LPS (LPS). Observamos ainda que o grupo que só recebeu o desafio com LPS obteve um maior pico na produção da IL-1 α quando comparada ao grupo controle (CTL) e ao grupo que só recebeu o pré condicionamento com NaCl 7,5% (hiper). (Figura 38A). $P>0,05$

Na análise da Interleucina 1-beta (IL-1 β) após 4 horas observamos que o grupo que recebeu o pré-condicionamento com NaCl 7,5% e o desafio com LPS teve uma maior produção quando comparada ao grupo controle e o grupo hiper. Observamos que o mesmo ocorreu com o grupo que só recebeu LPS. (Figura 38B). $P>0,05$.

Figura 42 – Concentrações de IL-1 α (A) e IL-1 β (B) foram determinadas através de Miliplex no plasma de camundongos Balb/c divididos em grupos nomeados – CTL (sem nenhum insulto), hiper (receberam pré-condicionamento com NaCl 7,5% sendo uma dose de 4mg/kg no dia 1, uma dose de 6mg/kg no dia 3 e uma dose de 8mg/kg no dia 5; depois descansou por 72 horas antes de ser analisado), LPS (recebeu dose letal de LPS (15mg/Kg) analisado após 4 horas), HL (recebeu o mesmo tratamento que o grupo hiper e após 72 horas recebeu 1 dose letal de LPS

(15mg/kg) e analisado após 4 horas. Valores expressos em média $\pm$ EPM e n=6 animais $p<0,05$

*vs CTL, #vs hiper.

Na análise da Interleucina 2 (IL-2) após 4 horas observamos que o grupo que recebeu o pré-condicionamento com NaCl 7,5% e o desafio com LPS (HL) teve uma tendência a diminuir em relação ao grupo que só recebeu LPS (LPS).

Observamos também que houve significância entre os grupos HL quando comparados aos grupos CTL e hiper. (Figura 43A). $P>0,05$

Na análise da Interleucina 6 (IL-6) após 4 horas observamos que o grupo que recebeu o pré-condicionamento com NaCl 7,5% e o desafio com LPS (HL) quando comparado ao grupo LPS produziu uma quantidade menor da citocina, enquanto que o grupo que recebeu somente LPS (LPS) teve uma produção maior comparada aos outros grupos. Observamos também que houve significância entre os grupos HL quando comparados aos grupos CTL e hiper. (Figura 43B). $P>0,05$

Figura 43 – Concentrações de IL-2 (A) e IL-6 (B) foram determinadas através de Miliplex no plasma de camundongos Balb/c divididos em grupos nomeados – CTL (sem nenhum insulto), hiper (receberam pré-condicionamento com NaCl 7,5% sendo uma dose de 4mg/kg no dia 1, uma dose de 6mg/kg no dia 3 e uma dose de 8mg/kg no dia 5; depois descansou por 72 horas antes de ser analisado), LPS (recebeu dose letal de LPS (15mg/Kg) analisado após 4 horas), HL (recebeu o mesmo tratamento que o grupo hiper e após 72 horas recebeu 1 dose letal de LPS

(15mg/kg) e analisado após 4 horas. Valores expressos em média $\pm$ EPM e n=6 animais $p<0,05$

*vs CTL, #vs hiper e Ω vs os outros grupos.

Na análise da Interleucina 12p40 (IL-12p40) após 4 horas observamos que o grupo que recebeu o pré-condicionamento com NaCl 7,5% e o desafio com LPS (HL) quando comparado ao grupo LPS produziu uma quantidade menor da citocina, enquanto que o grupo que recebeu somente LPS (LPS) teve uma produção maior comparada aos outros grupos. Observamos também que houve significância entre os grupos HL quando comparados aos grupos CTL e hiper. (Figura 44A). $P>0,05$

Na análise da Interleucina 12p70 (IL-12p70) após 4 horas observamos que o grupo que recebeu o pré-condicionamento com NaCl 7,5% e o desafio com LPS (HL) quando comparado ao grupo controle (CTL) não houve significância. Contudo, o grupo LPS produziu maior quantidade da citocina quando comparada aos outros grupos. (Figura 44B). $P>0,05$

Figura 44 – Concentrações de IL-12p40 (A) e IL-12p70 (B) foram determinadas através de Miliplex no plasma de camundongos Balb/c divididos em grupos nomeados – CTL (sem nenhum insulto), hiper (receberam pré-condicionamento com NaCl 7,5% sendo uma dose de 4mg/kg no dia 1, uma dose de 6mg/kg no dia 3 e uma dose de 8mg/kg no dia 5; depois descansou por 72 horas antes de ser analisado), LPS (recebeu dose letal de LPS (15mg/Kg) analisado após 4 horas), HL (recebeu o mesmo tratamento que o grupo hiper e após 72 horas

recebeu 1 dose letal de LPS (15mg/kg) e analisado após 4 horas. Valores expressos em média $\pm$ EPM e n=6 animais $p<0,05$ *vs CTL, #vs hiper e Ω vs os outros grupos.

A análise da Interleucina 17A (IL-17A) após 4 horas observamos que o grupo que recebeu o pré-condicionamento com NaCl 7,5% e o desafio com LPS (HL) quando comparado ao grupo LPS teve uma tendência a diminuir. O grupo LPS teve significância quando comparado aos grupos CTL e hiper. O mesmo ocorrendo com o grupo HL. (Figura 45 A). $P>0,05$

Na análise da Interleucina 17F (IL-17F) após 4 horas observamos que o grupo que recebeu o pré-condicionamento com NaCl 7,5% e o desafio com LPS (HL) quando comparado ao grupo LPS teve uma tendência a diminuir. O grupo LPS teve significância quando comparado aos grupos CTL e hiper. O mesmo ocorrendo com o grupo HL. (Figura 45B). $P>0,05$

Figura 45 – Concentrações de IL-17A (A) e IL-17F (B) foram determinadas através de Miliplex no plasma de camundongos Balb/c divididos em grupos nomeados – CTL (sem nenhum insulto), hiper (receberam pré-condicionamento com NaCl 7,5% sendo uma dose de 4mg/kg no dia 1, uma dose de 6mg/kg no dia 3 e uma dose de 8mg/kg no dia 5; depois descansou por 72 horas antes de ser analisado), LPS (recebeu dose letal de LPS (15mg/Kg) analisado após 4 horas), HL (recebeu o mesmo tratamento que o grupo hiper e após 72 horas recebeu 1 dose letal

de LPS (15mg/kg) e analisado após 4 horas. Valores expressos em média $\pm$ EPM e n=6 animais $p<0,05$ *vs CTL, #vs hiper.

Na análise da Interleucina 22 (IL-22) após 4 horas observamos que o grupo que recebeu o pré-condicionamento com NaCl 7,5% e o desafio com LPS (HL) quando comparado ao grupo controle (CTL) não houve significância. Contudo, o grupo LPS produziu maior quantidade da citocina quando comparada aos outros grupos. (Figura 46A). $P>0,05$

A Interleucina 23 (IL-23) após 4 horas observamos que o grupo que recebeu o pré-condicionamento com NaCl 7,5% e o desafio com LPS (HL) quando comparado ao grupo controle (CTL) não houve significância. Contudo, o grupo LPS produziu maior quantidade da citocina quando comparada aos outros grupos. (Figura 46B). $P>0,05$

Figura 46 – Concentrações de IL-22 (A) e IL-23 (B) foram determinadas através de Miliplex no plasma de camundongos Balb/c divididos em grupos nomeados – CTL (sem nenhum insulto), hiper (receberam pré-condicionamento com NaCl 7,5% sendo uma dose de 4mg/kg no dia 1, uma dose de 6mg/kg no dia 3 e uma dose de 8mg/kg no dia 5; depois descansou por 72 horas antes de ser analisado), LPS (recebeu dose letal de LPS (15mg/Kg) analisado após 4 horas), HL (recebeu o mesmo tratamento que o grupo hiper e após 72 horas recebeu 1 dose letal de LPS (15mg/kg) e analisado após 4 horas. Valores expressos em média $\pm$ EPM e n=6 animais $p < 0,05$ Ω vs os outros grupos.

Na análise do TNF- α após 4 horas observamos que o grupo que recebeu o pré-condicionamento com NaCl 7,5% e o desafio com LPS (HL) produziu uma quantidade menor da citocina quando comparado ao grupo que só recebeu LPS (LPS). Observamos também que o grupo LPS foi significativo em relação aos outros grupos e ainda que o grupo HL foi significativo quando comparado ao grupo controle e hiper. (Figura 43A). $P > 0,05$

Na análise do IFN- γ após 4 horas observamos que o grupo que recebeu o pré-condicionamento com NaCl 7,5% e o desafio com LPS (HL) produziu uma

quantidade menor da citocina quando comparado ao grupo que só recebeu LPS (LPS). Observamos também que o grupo LPS foi significativo em relação aos outros grupos e ainda que o grupo HL foi significativo quando comparado ao grupo controle e hiper. (Figura 47A). $P > 0,05$

Figura 47 – Concentrações de TNF- α (A) e IFN- γ (B) foram determinadas através de Miliplex no plasma de camundongos Balb/c divididos em grupos nomeados – CTL (sem nenhum insulto), hiper (receberam pré-condicionamento com NaCl 7,5% sendo uma dose de 4mg/kg no dia 1, uma dose de 6mg/kg no dia 3 e uma dose de 8mg/kg no dia 5; depois descansou por 72 horas antes de ser analisado), LPS (recebeu dose letal de LPS (15mg/Kg) analisado após 4 horas), HL (recebeu o mesmo tratamento que o grupo hiper e após 72 horas recebeu 1 dose letal de LPS (15mg/kg) e analisado após 4 horas. Valores expressos em média $\pm$ EPM e n=6 animais $p < 0,05$ *vs CTL, # vs hiper, Ω vs os outros grupos.

Na análise do MIP- α após 4 horas observamos que o grupo que recebeu o pré-condicionamento com NaCl 7,5% e o desafio com LPS (HL) quando comparado ao grupo LPS teve uma tendência a diminuir. O grupo LPS teve significância quando comparado aos grupos CTL e hiper. O mesmo ocorrendo com o grupo HL. (Figura 48A). $P > 0,05$

Na análise do MIP- β após 4 horas observamos que o grupo que recebeu o pré-condicionamento com NaCl 7,5% e o desafio com LPS (HL) produziu uma quantidade menor da citocina quando comparado ao grupo que só recebeu LPS (LPS). Observamos também que o grupo LPS foi significante em relação aos outros grupos e ainda que o grupo HL foi significante quando comparado ao grupo controle e hiper. (Figura 48B). $P > 0,05$

Figura 48 – Concentrações de MIP- α (A) e MIP- β (B) foram determinadas através de Miliplex no plasma de camundongos Balb/c divididos em grupos nomeados – CTL (sem nenhum insulto), hiper (receberam pré-condicionamento com NaCl 7,5% sendo uma dose de 4mg/kg no dia 1, uma dose de 6mg/kg no dia 3 e uma dose de 8mg/kg no dia 5; depois descansou por 72 horas antes de ser analisado), LPS (recebeu dose letal de LPS (15mg/Kg) analisado após 4 horas), HL (recebeu o mesmo tratamento que o grupo hiper e após 72 horas recebeu 1 dose letal de LPS (15mg/kg) e analisado após 4 horas. Valores expressos em média $\pm$ EPM e n=6 animais p<0,05 *vs. CTL, # vs. hiper, Ω vs. os outros grupos.

- Citocinas anti-inflamatórias

Na análise da Interleucina 4 (IL-4) após 4 horas observamos que a produção da citocina foi menor no grupo que recebeu o pré-condicionamento com NaCl 7,5% e o desafio com LPS (HL) quando comparado ao LPS. Observamos ainda que o grupo LPS produziu maior quantidade da citocina quando comparadas com os outros grupos. O grupo HL foi significativo quando comparado com o grupo controle. (Figura 49A). $P > 0,05$.

Na análise da Interleucina 10 (IL-10) após 4 horas observamos que o grupo que recebeu o pré-condicionamento com NaCl 7,5% e o desafio com LPS (HL) quando comparado ao grupo controle (CTL) não houve significância. Contudo, o grupo LPS produziu maior quantidade da citocina quando comparada aos outros grupos. (Figura 49B). $P > 0,05$

Figura 49 – Concentrações de IL-4 (A) e IL-10 (B) foram determinadas através de Miliplex no plasma de camundongos Balb/c divididos em grupos nomeados – CTL (sem nenhum insulto), hiper (receberam pré-condicionamento com NaCl 7,5% sendo uma dose de 4mg/kg no dia 1, uma dose de 6mg/kg no dia 3 e uma dose de 8mg/kg no dia 5; depois descansou por 72 horas antes de ser analisado), LPS (recebeu dose letal de LPS (15mg/Kg) analisado após 4 horas), HL (recebeu o mesmo tratamento que o grupo hiper e após 72 horas recebeu 1 dose letal de LPS (15mg/kg) e analisado após 4 horas. Valores expressos em média $\pm$ EPM e n=6 animais $p<0,05$ *vs CTL, # vs hiper, Ω vs os outros grupos.

Após estudo das citocinas em plasma nosso estudo analisou o perfil inflamatório nos grupos CTL, hiper, LPS e HL em pulmão, baço e intestino.

Na análise da Interleucina 6 (IL-6) após 4 horas observamos que no pulmão o grupo que recebeu o pré-condicionamento com NaCl 7,5% e o desafio com LPS (HL), a produção da citocina pró-inflamatória foi menor quando comparado ao grupo LPS. Contudo, o grupo LPS produziu maior quantidade da citocina

quando comparada aos outros grupos. O grupo HL foi significativo quando comparado ao grupo CTL e hiper (Figura 50A). $P>0,05$

Na análise da Interleucina 6 (IL-6) após 4 horas observamos que no baço o grupo que recebeu o pré-condicionamento com NaCl 7,5% e o desafio com LPS (HL), a produção da citocina pró-inflamatória foi menor quando comparado ao grupo LPS. Contudo, o grupo LPS produziu maior quantidade da citocina quando comparada aos outros grupos. O grupo HL foi significativo quando comparado ao grupo CTL (Figura 50B). $P>0,05$

Na análise da Interleucina 6 (IL-6) após 4 horas observamos que no intestino o grupo que recebeu o pré-condicionamento com NaCl 7,5% e o desafio com LPS (HL), não houve significância quando comparada ao grupo CTL. Contudo, o grupo LPS produziu maior quantidade da citocina quando comparada aos outros grupos. (Figura 50C). $P>0,05$

Figura 46 – Concentrações de IL6 foram analisadas através de ELISA no pulmão (A), baço(B) e intestino(C) de camundongos Balb/c – CTL (sem insultos), hiper (recebeu 3 doses de NaCl 7,5% sendo a primeira dose de 4mg/kg no dia 1, a segunda dose 6mg/kg no dia 3 e a terceira dose no dia 5 de 8mg/kg), LPS (recebeu dose letal 15mg/Kg) analisado após 4 horas, HL (recebeu o mesmo tratamento que o grupo hiper e após 72 horas de descanso recebeu dose letal

de LPS (15mg/Kg) e analisado após 4 horas). Valores expressos em média $\pm$ EPM e n=10 animais $p<0,05$ *vs CTL #vs hiper e Ω vs todos os outros grupos.

Na análise do TNF- α após 4 horas observamos que no pulmão o grupo que recebeu o pré-condicionamento com NaCl 7,5% e o desafio com LPS (HL), a produção da citocina pró-inflamatória foi menor quando comparado ao grupo LPS. Contudo, o grupo LPS produziu maior quantidade da citocina quando comparada aos outros grupos. O grupo HL foi significativo quando comparado ao grupo CTL e hiper (Figura 51A). $P>0,05$

Na análise do TNF- α após 4 horas observamos que no baço o grupo que recebeu o pré-condicionamento com NaCl 7,5% e o desafio com LPS (HL), a produção da citocina pró-inflamatória foi menor quando comparado ao grupo LPS. Contudo, o grupo LPS produziu maior quantidade da citocina quando comparada aos outros grupos. O grupo HL foi significativo quando comparado ao grupo CTL e hiper (Figura 51B). $P>0,05$

Na análise do TNF- α após 4 horas observamos que no intestino o grupo que recebeu o pré-condicionamento com NaCl 7,5% e o desafio com LPS (HL), a produção da citocina pró-inflamatória foi maior quando comparado ao grupo LPS. Contudo, o grupo LPS produziu maior quantidade da citocina quando comparada ao grupo CTL e hiper. O grupo HL foi significativo quando comparado aos outros grupos (Figura 51C).

Figura 51 – Concentrações de TNF- α foram analisadas através de ELISA no pulmão (A), baço (B) e intestino (C) de camundongos Balb/c – CTL (sem insultos), hiper (recebeu 3 doses de NaCl 7,5% sendo a primeira dose de 4mg/kg no dia 1, a segunda dose 6mg/kg no dia 3 e a terceira dose no dia 5 de 8mg/kg), LPS (recebeu dose letal 15mg/Kg) analisado após 4 horas, HL (recebeu o mesmo tratamento que o grupo hiper e após 72 horas de descanso recebeu dose letal de LPS (15mg/Kg) e analisado após 4 horas). Valores expressos em média $\pm$ EPM e n=10 animais $p < 0,05$ *vs CTL #vs hiper e Ω vs todos os outros grupos.

Na análise da Interleucina 10 (IL-10) após 4 horas observamos que no pulmão o grupo que recebeu o pré-condicionamento com NaCl 7,5% e o desafio com LPS (HL), não houve significância quando comparada ao grupo LPS. Contudo, o grupo LPS eo grupo HL foram significantes quando comparados com os grupos CTL e hiper (Figura 52A). $P > 0,05$

Na análise da IL-10 após 4 horas observamos que no baço o grupo que recebeu o pré-condicionamento com NaCl 7,5% e o desafio com LPS (HL), a produção da citocina pró-inflamatória foi menor quando comparado ao grupo

LPS. Contudo, o grupo LPS produziu maior quantidade da citocina quando comparada aos outros grupos. O grupo HL foi significativo quando comparado ao grupo CTL e hiper (Figura 52B). $P>0,05$

Na análise do IL-10 após 4 horas observamos que no intestino o grupo que recebeu o pré-condicionamento com NaCl 7,5% e o desafio com LPS (HL), a produção da citocina pró-inflamatória foi menor quando comparado ao grupo LPS. Contudo, o grupo LPS produziu maior quantidade da citocina quando comparada aos outros grupos. O grupo HL foi significativo quando comparado ao grupo CTL e hiper (Figura 52C). $P>0,05$

Figura 52 – Concentrações de IL10 foram analisadas através de ELISA no pulmão (A), baço (B) e intestino (C) de camundongos Balb/c – CTL (sem insultos), hiper (recebeu 3 doses de NaCl 7,5% sendo a primeira dose de 4mg/kg no dia 1, a segunda dose 6mg/kg no dia 3 e a terceira dose no dia 5 de 8mg/kg), LPS (recebeu dose letal 15mg/Kg) analisado após 4 horas, HL (recebeu o mesmo tratamento que o grupo hiper e após 72 horas de descanso recebeu dose letal

de LPS (15mg/Kg) e analisado após 4 horas). Valores expressos em média $\pm$ EPM e n=10 animais $p<0,05$ *vs CTL #vs hiper e Ω vs todos os outros grupos.

Analizamos após as citocinas o perfil do Óxido Nítrico no pulmão, baço e intestino.

Na análise do nitrito após 4 horas observamos que no pulmão o grupo que recebeu o pré-condicionamento com NaCl 7,5% e o desafio com LPS (HL), a produção da citocina pró-inflamatória foi menor quando comparado ao grupo LPS. Contudo, o grupo LPS produziu maior quantidade da citocina quando comparada aos outros grupos. O grupo HL foi significativo quando comparado ao grupo CTL e hiper (Figura 53A). $P>0,05$

Na análise do nitrito após 4 horas observamos que no baço o grupo que recebeu o pré-condicionamento com NaCl 7,5% e o desafio com LPS (HL), a produção da citocina pró-inflamatória foi menor quando comparado ao grupo LPS. Contudo, o grupo LPS produziu maior quantidade da citocina quando comparada aos outros grupos. O grupo HL foi significativo quando comparado ao grupo CTL e hiper (Figura 53B). $P>0,05$

Na análise do nitrito após 4 horas observamos que no intestino o grupo que recebeu o pré-condicionamento com NaCl 7,5% e o desafio com LPS (HL), a produção da citocina pró-inflamatória foi menor quando comparado ao grupo LPS. Contudo, o grupo LPS produziu maior quantidade da citocina quando comparada aos outros grupos. O grupo HL foi significativo quando comparado ao grupo CTL e hiper (Figura 53C). $P>0,05$

Figura 53 – Concentrações de Nitrito foram analisadas através do método de Griess no pulmão (A), baço (B) e intestino (C) de camundongos Balb/c – CTL (sem insultos), hiper (recebeu 3 doses de NaCl 7,5% sendo a primeira dose de 4mg/kg no dia 1, a segunda dose 6mg/kg no dia 3 e a terceira dose no dia 5 de 8mg/kg), LPS (recebeu dose letal 15mg/Kg) analisado após 4 horas, HL (recebeu o mesmo tratamento que o grupo hiper e após 72 horas de descanso recebeu dose letal de LPS (15mg/Kg) e analisado após 4 horas). Valores expressos em média $\pm$ EPM e n=10 animais $p < 0,05$ *vs CTL #vs hiper e Ω vs todos os outros grupos.

O infiltrado neutrofílico foi analisado através do MPO no pulmão, baço e intestino.

A análise de MPO no pulmão revelou que nosso pré- condicionamento foi semelhante ao LPS na quantificação. O grupo LPS e HL foram significantes em relação ao grupo controle. $P > 0,05$ (Figura 54A)

A análise de MPO no baço revelou que os resultados entre os grupos não foram significantes. $P > 0,05$ (Figura 54B)

A análise de MPO no pulmão revelou que nosso pré- condicionamento teve uma tendência a diminuir, contudo o resultado não foi significativo. O grupo LPS foi significativo quando comparado ao grupo controle. $P > 0,05$ (Figura 54C)

Figura 54 – A quantificação de Infiltrado neutrofílico foi analisada através do método de MPO no pulmão (A), baço (B) e intestino (C) de camundongos Balb/c – CTL (sem insultos), hiper (recebeu 3 doses de NaCl 7,5% sendo a primeira dose de 4mg/kg no dia 1, a segunda dose 6mg/kg no dia 3 e a terceira dose no dia 5 de 8mg/kg), LPS (recebeu dose letal 15mg/Kg) analisado após 4 horas, HL (recebeu o mesmo tratamento que o grupo hiper e após 72 horas de descanso recebeu dose letal de LPS (15mg/Kg) e analisado após 4 horas). Valores expressos em média $\pm$ EPM e n=10 animais $p<0,05$ *vs CTL

Discussão

Neste estudo observamos que a solução salina hipertônica (SSH) induziu pré-condicionamento confirmado pela redução na mortalidade após injeção de dose letal de LPS. Além disso, observamos que após o uso do pré-condicionamento com SSH houve redução na inflamação causada pela endotoxemia de forma sistêmica e localizada. A análise de como se desenvolve o padrão de pre-condicionamento, com dosagens de citocinas após cada dose de SSH na fase de indução, observamos que se desenvolve

com diferentes padrões na ativação das citocinas durante as três fases do pré-condicionamento.

O processo inflamatório pode ser induzido por infecção microbiana, moléculas liberadas após um estresse ou dano tecidual [37, 86] e por qualquer substância química que promova aumento da osmolaridade [87]. Estudos revelam que moléculas como manitol, alanina e cloreto de sódio podem induzir a produção de mediadores inflamatórios. [87] Este processo envolve um enorme gasto energético, dano e destruição tecidual, disfunção múltipla de órgãos e morte. [42] O uso do LPS para induzir endotoxemia é um clássico modelo experimental de inflamação. [88] Neste contexto, o processo inflamatório observado durante a sepse ainda é uma das maiores causas de morte nas UTIs [89]. Desta forma, novos estudos que aprofundem a compreensão mecanística da inflamação e tragam novas opções terapêuticas são importantes para a sepse e as doenças que apresentam síndrome da resposta inflamatória sistêmica. A tolerância também é descrita como desativação, adaptação, dessensibilização, reprogramação, [90] pré-tratamento e pré-condicionamento [91]. A tolerância é definida como uma capacidade de responder com menor grau de inflamação a insultos após uma prévia exposição a este estímulo. [90] A tolerância a endotoxemia, que foi primeiramente descrita por Beeson em 1946 com a diminuição da resposta febril em coelhos submetidos a doses diárias de vacina tifoide.[92]

Como dados da literatura mostram pequeno grau de inflamação com soluções hiperosmóticas e tolerância cruzada tem também sido descrita, levantamos a hipótese de podermos utilizar a solução hipertônica como agente indutor de

tolerância ou pré-condicionamento. Esta solução não pirogênica, como é o LPS e não agressiva como procedimentos de isquemia-reperfusão, pode ser mais segura na proteção preventiva de futuros insultos. A solução salina hipertônica 7,5% foi inicialmente descrita por Velasco e colegas nos anos 80 como benéfica no tratamento de choque hemorrágico [30]. Vários autores descrevem o NaCl 7,5% como uma solução que expande o volume sanguíneo, diminui o infiltrado neutrofílico pulmonar, previne a translocação bacteriana [30, 35]. Nestes casos, a SSH parece ter um perfil anti-inflamatório, contudo nossos estudos revelaram que a SSH isoladamente induz um pequeno aumento na produção de citocinas inflamatórias.

Há poucos estudos que sugerem o potencial terapêutico do “pré-condicionamento” com estresse hiperosmótico e mais especificamente com a solução salina hipertônica 7,5% [35, 93, 94] . De fato, estes estudos utilizaram a SSH minutos antes do evento agressivo como a isquemia. Contudo, devemos considerar que a SSH produz grande expansão do volume extracelular. Desta forma, estes estudos ficam comprometidos em poder separar os efeitos de pré-condicionamento e expansão volêmica como determinante na proteção observada. Elaboramos um modelo de pré-condicionamento semelhante ao utilizado com LPS, com doses repetidas e um intervalo de dois dias antes do insulto com LPS em dose letal. Este intervalo de tempo garante que não há mais efeito de expansão volêmica, e uma redução de inflamação será exclusiva de um pré-condicionamento. O primeiro teste da efetividade de pré-condicionamento com SSH foi a análise de mortalidade de animais submetidos a endotoxemia. Observamos que os animais que receberam o pré-condicionamento apresentaram menor mortalidade comparados aos animais

sem pré-tratamento. Outros estudos com pré-condicionamento com SSH sugerem que sobrevivência de animais se refere à habilidade da SSH em reduzir a produção de TNF- α *in vivo*. Observamos que o perfil inflamatório durante o pré-condicionamento deflagrou uma resposta inflamatória com elevação de citocinas. Algumas apresentaram um padrão crescente e outras um perfil decrescente durante as aplicações subsequentes da SSH. Padrões como o observado em nosso estudo também foi visto por Mendes et al.[95] no estudo com tolerância com LPS quando analisados a expressão de genes. Mesmo sabendo que a transcrição dos genes das citocinas é transitória e que os mRNA que codificam a maioria das citocinas são instáveis e com frequência deflagrados de modo que a síntese das citocinas também é transitória; utilizamos este modelo que parece ter semelhança no achado dos padrões observados [96]. Observamos que durante o pré-condicionamento não ocorre apenas a redução gradativa da ativação das citocinas e sim uma resposta individualizada de cada citocina. Nossa hipótese é de que o estresse hiperosmótico, que inicialmente faz com que a célula murche,[87, 97] provoque a inflamação por meio da MAPK [87]. A ativação pela via da MAPK resultará nos eventos de modificação nas respostas subsequentes e ao LPS dose letal.

Nosso estudo analisou a ativação de citocinas durante o pré-condicionamento em duas e quatro horas. Verificamos que em duas horas citocinas como IL-1- α , IL-1 β , IL-12p40, IL-12p70 IL-17A aumentam inicialmente e diminuem ao longo das doses subsequentes, provavelmente por terem mecanismos de ativação e regulação da expressão gênica tardia. [98] Contudo, a IL-6, IL-22, TNF- α , IFN- γ , MIP- α e MIP- β aumentaram sua produção ao longo das aplicações. A IL-2 e a IL-17 mantiveram a mesma produção durante o pré-condicionamento. As

citocinas IL-4 e IL-10 diminuem e aumentam respectivamente ao longo das aplicações. Contudo em 4 horas o padrão encontrado foi a IL-1 α , IL- β , IL-2, IL-6, IL-12p40, IL-12A IL-22, IL-23, IFN- γ tendem a diminuir durante o pré-condicionamento e a IL-17F e a MIP- β aumentam.

Após estudar o padrão da indução do pré-condicionamento com SSH nos mediadores inflamatórios, realizamos a análise de outras soluções para observarmos se o pré-condicionamento se referia especificamente a SSH 7,5%, ou a qualquer solução hiperosmótica ou ainda ao aumento do volume sistêmico. Utilizamos outras soluções hipertônicas e observamos que o efeito se mantinha e assim demonstramos que os efeitos causados pela SSH não se referem aos íons Na e CL, mas dependem fundamentalmente do estresse osmótico. Os efeitos foram parecidos, corroboramos a literatura que diz que os efeitos causados pelo NaCl não se referem a hipertonidade apenas, pois solutos com baixa permeabilidade como sorbitol e manitol podem apresentar o mesmo resultado. [99] Soluções com concentrações osmolares similares à SSH e hiperosmóticas foram utilizadas e os resultados foram significantes; por outro lado o mesmo não ocorreu com soluções de concentração osmótica inferior a SSH 7,5%. A hipertonidade foi capaz de induzir uma resposta inflamatória capaz de levar a um pré-condicionamento.

A análise dos mediadores inflamatórios pós-desafio do LPS no plasma coletado após quatro horas de sua aplicação revelou de forma geral uma redução na produção de mediadores pró-inflamatórios. Estudos sobre o estresse hiperosmótico revelam que as citocinas IL-1b, IL-6 e TNF, pró-inflamatórias são as principais a ter aumento da sua produção [7, 87, 97]. A literatura não tem

estudo *in vivo* com dosagens de citocinas em pré-condicionamento osmótico. Nossos resultados demonstraram que após o pré-condicionamento e o desafio com LPS, houve menor produção das citocinas pró-inflamatórias. Este resultado é coerente com o conceito de pré-condicionamento ou mesmo de tolerância descrito na literatura, atenuando a forma que os animais responderam aos estímulos promovidos pelo LPS [100-102]. Resultados similares foram encontrados para as citocinas anti-inflamatórias.

Quanto ao efeito do pré-condicionamento sobre o perfil de mediadores nos tecidos analisamos três órgãos que são acometidos pela sepse [103-106] sabemos que a resposta inflamatória sistêmica se caracteriza pelo acometimento de órgãos à distância do foco de infecção, como por exemplo acometimento do pulmão, intestino e baço. Analisamos o padrão inflamatório do tecido pulmonar pós o pré-condicionamento por SSH. Enquanto uma variedade de fatores, como proteínas de fase aguda, metabolitos lipídicos, fator de coagulação, e peptídios antimicrobiano estão envolvidos na resposta inflamatória, as citocinas constituem o maior grupo pleiotropico de mediadores. [107] O papel das citocinas como TNF alpha, IL1 beta e proteínas inflamatórias de macrófagos, bem como outros mediadores inflamatórios, como óxido nítrico/20/ participam na iniciação, manutenção e resolução da inflamação pulmonar, como o reconhecimento de patógenos, recrutamento de neutrófilos e células mononucleares. [107, 108] Nossos resultados mostraram que as citocinas IL6 e TNF alpha foram menos liberadas no pulmão quando utilizamos o modelo de pré-condicionamento, o mesmo ocorrendo com o nitrito. Contudo a anti-inflamatória decorrente da citocina IL-10 foi mantida.

A literatura demonstrou que o baço produz uma quantidade significativa de agentes pró e anti-inflamatórios que são secretados durante uma indução endotoxêmica. Há uma maior secreção de citocinas como IL-6 [109]. Contudo o uso da SSH reduz a interação leucócitos-endotelial da microcirculação mesentérica, a expressão de moléculas de adesão de células endoteliais (P-selectin e ICAM-1), as concentrações de quimiocinas no plasma, que aumenta sua ação anti-inflamatória, reduz translocação bacteriana para o sangue, fígado e baço. [110] Nossos resultados mostraram que após o pré-condicionamento e o desafio com LPS houve uma redução na ativação de mediadores inflamatórios como as citocinas IL6, TNF, IL10.

Quanto ao intestino sabemos que em células epiteliais como as normais coloretais, a indução de secreção de citocinas pró-inflamatórias através da hiperosmolaridade são mediadas pela metilação da subunidade catalítica da Proteína Fosfatase 2(PP2A).[111] Esta metilação, por sua vez, transloca o NFkB, bem como o fator de transcrição que controla a síntese de múltiplas citocinas. A idéia de que a hiperosmolaridade regula a produção de citocinas inflamatórias está embasada no fato de que a hiperosmolaridade ter sido reportada em várias doenças intestinais como a doença de Crohn e colite ulcerativa. [110] Contudo, a solução salina hipertônica mostrou atenuar respostas inflamatórias no intestino de ratos. [112] Nossos resultados revelaram que o preconditionamento atenuou as citocinas IL 06 e IL10, contudo houve elevação de TNF.

Com o objetivo de observar se o pré-condicionamento com NaCl 7,5% estaria relacionado a diminuição de óxido nítrico (NO), medimos o nitrito, um

subproduto do NO no pulmão, baço e intestino. Sabemos que o óxido nítrico tem papel importante na manutenção da homeostasia pulmonar. Aumento da NO sintase no pulmão e nitrito no plasma estão relacionados a fibrose pulmonar. [113]

O óxido nítrico produzido pela síntese de óxido nítrico induzido (iNOS) é responsável pela hipotensão e contribui de forma crucial na falência de órgãos durante a sepse induzida. Em resposta a infecção bacteriana a iNOS é expressa em vários tipos celulares, resultando em uma alta produção de óxido nítrico que pode auxiliar para um processo imune bactericida defensivo, mas também patogênico em termos de contribuir nos efeitos deletérios da endotoxemia. [114] Estudos em vivo revelam que íons de sódio entram nas células endoteliais durante o estresse hiperosmótico como o primeiro passo ao estímulo do aumento da produção de NO pelo endotélio intestinal. [115] Nossos resultados mostraram que a produção de NO diminuiu com o pré-condicionamento no pulmão, baço e intestino. O pré-condicionamento com SSH influenciou também a produção de NO durante o evento endotoxêmico.

4.9 Efeito do pré-condicionamento com NaCl 7,5% na infiltração neutrofílica

A exposição ao LPS inicia o recrutamento de neutrófilos que rapidamente migra para o sítio da inflamação com o propósito de neutralizar os patógenos agressores. A migração de neutrófilos é regulada por vários mediadores solúveis como quimiocinas e citocinas. [116] Exposição aguda de LPS causa ativação de monócitos, macrófagos, neutrófilos e linfócitos. [117] Estudos prévios não identificaram inibição no acúmulo de neutrófilo na cavidade peritoneal quando utilizada na ressuscitação. [118] Apesar do estudo ter sido

diferente, nossos resultados corroboram que o pré-condicionamento não atenuou significativamente a infiltração de neutrófilos no pulmão e no baço. Contudo ocorreu diminuição no intestino.

Concluimos que houve um pré-condicionamento *in vivo* com a solução salina hipertônica 7,5% foi capaz de diminuir a mortalidade de animais submetidos a endotoxemia. Concluimos ainda que o pré-condicionamento com o estresse hiperosmótico foi possível através de um estresse osmótico semelhante ao da solução salina hipertônica 7,5%, pois outras soluções com osmolaridade menor não foram capazes de desenvolver o pré-condicionamento. A diminuição do perfil inflamatório se apresentou sistemicamente e em órgãos como pulmão, baço e intestino com a diminuição da ativação de citocinas pró-inflamatórias e da expressão de NO. Contudo o infiltrado neutrofílico somente pode ser analisado favoravelmente no intestino.

Conclusões:

- A análise de significância na sobrevivência dos animais submetidos ao pré-condicionamento revelou-se eficaz na resistência aos efeitos letais do LPS.
- O perfil inflamatório dos animais submetidos ao pré-condicionamento revelou padrões no perfil inflamatório das citocinas. O pré-condicionamento assim como a tolerância ao LPS demonstrou que há diminuição da ativação das citocinas e também um aumento durante as doses subsequentes da solução salina hipertônica.

Na análise do pré-condicionamento como um pré- tratamento para a endotoxemia revelou que:

- Na análise sistêmica do perfil inflamatório **das citocinas** revelou que houve diminuição da ativação das citocinas analisadas após o pré-condicionamento e o desafio endotoxêmico.

- O pré-condicionamento no pulmão baço e intestino revelou que as citocinas IL-6 e IL-10 diminuíram sua ativação e o TNF- α aumentou a ativação no intestino.

- A análise do nitrito como forma indireta de mensurar o óxido nítrico revelou uma diminuição no pulmão, baço e intestino.

- Observamos uma tendência na diminuição do infiltrado neutrofílico no baço. No pulmão não foi observada esta tendência, contudo no intestino o infiltrado mostrou-se menor após o pré-condicionamento.

Concluimos que este estudo contribuirá na atenuação dos efeitos letais causados pela endotoxemia. Acreditamos que poderá ser utilizado na clínica uma vez que a solução salina hipertônica já é utilizada em pacientes.

1. Medzhitov, R., D.S. Schneider, and M.P. Soares, *Disease tolerance as a defense strategy*. Science, 2012. **335**(6071): p. 936-41.
2. Medzhitov, R., *Pattern recognition theory and the launch of modern innate immunity*. J Immunol, 2014. **191**(9): p. 4473-4.
3. West, M.A. and W. Heagy, *Endotoxin tolerance: A review*. Crit Care Med, 2002. **30**(1 Supp): p. S64-S73.
4. Nahid, M.A., M. Satoh, and E.K. Chan, *MicroRNA in TLR signaling and endotoxin tolerance*. Cell Mol Immunol, 2011. **8**(5): p. 388-403.
5. Nezelof, C., *Henri Dutrochet (1776-1847): an unheralded discoverer of the cell*. Ann Diagn Pathol, 2003. **7**(4): p. 264-72.
6. Cardoso, S.S. and J.H. Cartwright, *Dynamics of osmosis in a porous medium*. R Soc Open Sci, 2014. **1**(3): p. 140352.
7. Brocker, C., D.C. Thompson, and V. Vasilidou, *The role of hyperosmotic stress in inflammation and disease*. Biomol Concepts, 2012. **3**(4): p. 345-364.
8. Hubert, A., et al., *Osmotic stress, a proinflammatory signal in Caco-2 cells*. Biochimie, 2004. **86**(8): p. 533-41.
9. Lionetto, M.G. and T. Schettino, *The Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter and the osmotic stress response in a model salt transport epithelium*. Acta Physiol (Oxf), 2006. **187**(1-2): p. 115-24.
10. Antico, S., et al., *Cell volume regulation and apoptotic volume decrease in rat distal colon superficial enterocytes*. Cell Physiol Biochem, 2013. **32**(6): p. 1551-65.
11. Hoffmann, E.K., I.H. Lambert, and S.F. Pedersen, *Physiology of cell volume regulation in vertebrates*. Physiol Rev, 2009. **89**(1): p. 193-277.
12. Jantsch, J., et al., *Macrophages in homeostatic immune function*. Front Physiol, 2014. **5**: p. 146.
13. Titze, J. and A. Machnik, *Sodium sensing in the interstitium and relationship to hypertension*. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2010. **19**(4): p. 385-92.
14. Muller, S., et al., *Salt-dependent chemotaxis of macrophages*. PLoS One, 2013. **8**(9): p. e73439.
15. Halterman, J.A., H.M. Kwon, and B.R. Wamhoff, *Tonicity-independent regulation of the osmosensitive transcription factor TonEBP (NFAT5)*. Am J Physiol Cell Physiol, 2012. **302**(1): p. C1-8.
16. Shapiro, L. and C.A. Dinarello, *Osmotic regulation of cytokine synthesis in vitro*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(26): p. 12230-4.
17. Morancho, B., et al., *Analysis of the transcriptional activity of endogenous NFAT5 in primary cells using transgenic NFAT-luciferase reporter mice*. BMC Mol Biol, 2008. **9**: p. 13.
18. Kleinewietfeld, M., et al., *Sodium chloride drives autoimmune disease by the induction of pathogenic TH17 cells*. Nature, 2013. **496**(7446): p. 518-22.
19. Zhou, X., et al., *MKP-1 inhibits high NaCl-induced activation of p38 but does not inhibit the activation of TonEBP/OREBP: opposite roles of p38alpha and p38delta*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(14): p. 5620-5.

20. Irazabal, C.E., et al., *ATM, a DNA damage-inducible kinase, contributes to activation by high NaCl of the transcription factor TonEBP/OREBP*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(23): p. 8809-14.
21. Ferraris, J.D., et al., *cAMP-independent role of PKA in tonicity-induced transactivation of tonicity-responsive enhancer/ osmotic response element-binding protein*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(26): p. 16800-5.
22. Zhou, X., et al., *Rac1/osmosensing scaffold for MEKK3 contributes via phospholipase C-gamma1 to activation of the osmoprotective transcription factor NFAT5*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(29): p. 12155-60.
23. Asakawa, H., et al., *High glucose and hyperosmolarity increase secretion of interleukin-1 beta in cultured human aortic endothelial cells*. J Diabetes Complications, 1997. **11**(3): p. 176-9.
24. Yassad, A., et al., *Glutamine accelerates interleukin-6 production by rat peritoneal macrophages in culture*. FEBS Lett, 1997. **413**(1): p. 81-4.
25. Nemeth, Z.H., et al., *Hyperosmotic stress induces nuclear factor-kappaB activation and interleukin-8 production in human intestinal epithelial cells*. Am J Pathol, 2002. **161**(3): p. 987-96.
26. Tabary, O., et al., *High susceptibility for cystic fibrosis human airway gland cells to produce IL-8 through the I kappa B kinase alpha pathway in response to extracellular NaCl content*. J Immunol, 2000. **164**(6): p. 3377-84.
27. Takeuchi, M., et al., *Intracellular production of interleukin-18 in human epithelial-like cell lines is enhanced by hyperosmotic stress in vitro*. Cell Tissue Res, 1999. **297**(3): p. 467-73.
28. Reinhart, J.M., et al., *In vitro increase of mean corpuscular volume difference (dMCV) as a marker for serum hypertonicity in dogs*. Res Vet Sci, 2014. **96**(3): p. 442-6.
29. Strandvik, G.F., *Hypertonic saline in critical care: a review of the literature and guidelines for use in hypotensive states and raised intracranial pressure*. Anaesthesia, 2009. **64**(9): p. 990-1003.
30. Velasco, I.T., et al., *Hyperosmotic NaCl and severe hemorrhagic shock*. Am J Physiol, 1980. **239**(5): p. H664-73.
31. Heckbert, S.R., et al., *Outcome after hemorrhagic shock in trauma patients*. J Trauma, 1998. **45**(3): p. 545-9.
32. Jaeschke, H. and A. Farhood, *Neutrophil and Kupffer cell-induced oxidant stress and ischemia-reperfusion injury in rat liver*. Am J Physiol, 1991. **260**(3 Pt 1): p. G355-62.
33. Oreopoulos, G.D., et al., *Hypertonic preconditioning prevents hepatocellular injury following ischemia/reperfusion in mice: a role for interleukin 10*. Hepatology, 2004. **40**(1): p. 211-20.
34. Yang, D.J., et al., *Hypertonic saline activates CD4+ and CD8+ T-lymphocytes in the small intestine to alleviate intestinal ischemia-reperfusion injury*. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2014. **18**(20): p. 3069-75.
35. Petroni, R.C., et al., *Hypertonic Saline (NaCl 7.5 %) Reduces LPS-Induced Acute Lung Injury in Rats*. Inflammation, 2015.
36. Tuttolomondo, A., et al., *Intravenous high-dose furosemide and hypertonic saline solutions for refractory heart failure and ascites*. Semin Nephrol, 2011. **31**(6): p. 513-22.
37. Theobaldo, M.C., et al., *Hypertonic saline solution drives neutrophil from bystander organ to infectious site in polymicrobial sepsis: a cecal ligation and puncture model*. PLoS One, 2012. **8**(9): p. e74369.
38. Ermund, A., et al., *Hypertonic saline releases the attached small intestinal cystic fibrosis mucus*. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2015. **42**(1): p. 69-75.
39. Oliveira, R.P., et al., *Clinical review: Hypertonic saline resuscitation in sepsis*. Crit Care, 2002. **6**(5): p. 418-23.

40. Papia, G., et al., *Hypertonic saline resuscitation from hemorrhagic shock does not impair the neutrophil response to intraabdominal infection*. Surgery, 2008. **144**(5): p. 814-21.
41. Thongrong, C., et al., *Current purpose and practice of hypertonic saline in neurosurgery: a review of the literature*. World Neurosurg, 2014. **82**(6): p. 1307-18.
42. Barton, G.M., *A calculated response: control of inflammation by the innate immune system*. J Clin Invest, 2008. **118**(2): p. 413-20.
43. Medzhitov, R., *Origin and physiological roles of inflammation*. Nature, 2008. **454**(7203): p. 428-35.
44. Lawrence, T., D.A. Willoughby, and D.W. Gilroy, *Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation*. Nat Rev Immunol, 2002. **2**(10): p. 787-95.
45. Medzhitov, R., *Recognition of microorganisms and activation of the immune response*. Nature, 2007. **449**(7164): p. 819-26.
46. Medzhitov, R., *Pattern recognition theory and the launch of modern innate immunity*. J Immunol, 2013. **191**(9): p. 4473-4.
47. Janeway, C.A., Jr., *Pillars article: approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology*. Cold spring harb symp quant biol. 1989. **54**: 1-13. J Immunol, 2013. **191**(9): p. 4475-87.
48. Chaplin, D.D., *1. Overview of the human immune response*. J Allergy Clin Immunol, 2006. **117**(2 Suppl Mini-Primer): p. S430-5.
49. Vivier, E., et al., *Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells*. Science. **331**(6013): p. 44-9.
50. Vivier, E., et al., *Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells*. Science, 2011. **331**(6013): p. 44-9.
51. Strbo, N., N. Yin, and O. Stojadinovic, *Innate and Adaptive Immune Responses in Wound Epithelialization*. Adv Wound Care (New Rochelle), 2014. **3**(7): p. 492-501.
52. Parkin, J. and B. Cohen, *An overview of the immune system*. Lancet, 2001. **357**(9270): p. 1777-89.
53. Beutler, B., *Innate immunity: an overview*. Mol Immunol, 2004. **40**(12): p. 845-59.
54. Sly, L.M., et al., *LPS-induced upregulation of SHIP is essential for endotoxin tolerance*. Immunity, 2004. **21**(2): p. 227-39.
55. Dauphinee, S.M. and A. Karsan, *Lipopolysaccharide signaling in endothelial cells*. Lab Invest, 2006. **86**(1): p. 9-22.
56. Cohen, J., *The immunopathogenesis of sepsis*. Nature, 2002. **420**(6917): p. 885-91.
57. Miyake, K., *Endotoxin recognition molecules, Toll-like receptor 4-MD-2*. Semin Immunol, 2004. **16**(1): p. 11-6.
58. Shim, D.W., et al., *Anti-Inflammatory Action of an Antimicrobial Model Peptide That Suppresses the TRIF-Dependent Signaling Pathway via Inhibition of Toll-Like Receptor 4 Endocytosis in Lipopolysaccharide-Stimulated Macrophages*. PLoS One, 2015. **10**(5): p. e0126871.
59. Philippart, F. and J.M. Cavaillon, *Sepsis mediators*. Curr Infect Dis Rep, 2007. **9**(5): p. 358-65.
60. Sender, V. and C. Stamme, *Lung cell-specific modulation of LPS-induced TLR4 receptor and adaptor localization*. Commun Integr Biol, 2014. **7**: p. e29053.
61. Silva, F., *Sepse*. 1ª ed. 2007, São Paulo: Manole.
62. Lorenz, E., et al., *Relevance of mutations in the TLR4 receptor in patients with gram-negative septic shock*. Arch Intern Med, 2002. **162**(9): p. 1028-32.
63. Martin, G.S., *Sepsis, severe sepsis and septic shock: changes in incidence, pathogens and outcomes*. Expert Rev Anti Infect Ther, 2012. **10**(6): p. 701-6.
64. Sand, C.A., et al., *Blockade or deletion of transient receptor potential vanilloid 4 (TRPV4) is not protective in a murine model of sepsis*. F1000Res, 2015. **4**: p. 93.

65. Matsuda, N. and Y. Hattori, *Systemic inflammatory response syndrome (SIRS): molecular pathophysiology and gene therapy*. J Pharmacol Sci, 2006. **101**(3): p. 189-98.
66. Christensen, V.B., J.S. Nielsen, and E.K. Tonnesen, *[Sepsis in the critically-ill patient]*. Ugeskr Laeger, 2007. **169**(8): p. 703-5.
67. Chung, T.P., et al., *Functional genomics of critical illness and injury*. Crit Care Med, 2002. **30**(1 Suppl): p. S51-7.
68. Delves, P.J. and I.M. Roitt, *The immune system. Second of two parts*. N Engl J Med, 2000. **343**(2): p. 108-17.
69. Knobel, E., *[Nitric oxide and sepsis]*. Arq Bras Cardiol, 1996. **67**(4): p. 263-6.
70. Moncada, S., R.M. Palmer, and E.A. Higgs, *Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology*. Pharmacol Rev, 1991. **43**(2): p. 109-42.
71. Coleman, J.W., *Nitric oxide in immunity and inflammation*. Int Immunopharmacol, 2001. **1**(8): p. 1397-406.
72. Isailovic, N., et al., *Interleukin-17 and innate immunity in infections and chronic inflammation*. J Autoimmun, 2015. **60**: p. 1-11.
73. Zhang, J.M. and J. An, *Cytokines, inflammation, and pain*. Int Anesthesiol Clin, 2007. **45**(2): p. 27-37.
74. Rider, P., et al., *Interleukin-1alpha*. Semin Immunol, 2013. **25**(6): p. 430-8.
75. Joosten, L.A., M.G. Netea, and C.A. Dinarello, *Interleukin-1beta in innate inflammation, autophagy and immunity*. Semin Immunol, 2013. **25**(6): p. 416-24.
76. Feghali, C.A. and T.M. Wright, *Cytokines in acute and chronic inflammation*. Front Biosci, 1997. **2**: p. d12-26.
77. Chatterjee, P., et al., *Regulation of the Anti-Inflammatory Cytokines Interleukin-4 and Interleukin-10 during Pregnancy*. Front Immunol, 2014. **5**: p. 253.
78. Scheller, J., et al., *The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6*. Biochim Biophys Acta, 2011. **1813**(5): p. 878-88.
79. Ethuin, F., et al., *Regulation of interleukin 12 p40 and p70 production by blood and alveolar phagocytes during severe sepsis*. Lab Invest, 2003. **83**(9): p. 1353-60.
80. Rutz, S., C. Eidschenk, and W. Ouyang, *IL-22, not simply a Th17 cytokine*. Immunol Rev, 2013. **252**(1): p. 116-32.
81. Toussiot, E., *The IL23/Th17 pathway as a therapeutic target in chronic inflammatory diseases*. Inflamm Allergy Drug Targets, 2012. **11**(2): p. 159-68.
82. Cavaillon, J.M., et al., *Cytokine cascade in sepsis*. Scand J Infect Dis, 2003. **35**(9): p. 535-44.
83. de Araujo-Souza, P.S., S.C. Hanschke, and J.P. Viola, *Epigenetic control of interferon-gamma expression in CD8 T cells*. J Immunol Res, 2015. **2015**: p. 849573.
84. Menten, P., A. Wuyts, and J. Van Damme, *Macrophage inflammatory protein-1*. Cytokine Growth Factor Rev, 2002. **13**(6): p. 455-81.
85. Soriano, B., et al., *Streamlining microarray technology in a prototype core laboratory*. Am Clin Lab, 2002. **21**(8): p. 22-5.
86. Park, S.J., et al., *Reverse signaling through the co-stimulatory ligand, CD137L, as a critical mediator of sterile inflammation*. Mol Cells, 2012. **33**(6): p. 533-7.
87. Schwartz, L., et al., *Is inflammation a consequence of extracellular hyperosmolarity?* J Inflamm (Lond), 2009. **6**: p. 21.
88. Koo, J.W., et al., *Endotoxemia-mediated inflammation potentiates aminoglycoside-induced ototoxicity*. Sci Transl Med, 2015. **7**(298): p. 298ra118.
89. Daviaud, F., et al., *Timing and causes of death in septic shock*. Ann Intensive Care, 2015. **5**(1): p. 58.
90. Pena, O.M., et al., *Endotoxin tolerance represents a distinctive state of alternative polarization (M2) in human mononuclear cells*. J Immunol, 2011. **186**(12): p. 7243-54.
91. Cuschieri, J., et al., *Hypertonic preconditioning inhibits macrophage responsiveness to endotoxin*. J Immunol, 2002. **168**(3): p. 1389-96.

92. Beeson, P.B., *Development of tolerance to typhoid bacterial pyrogen and its abolition by reticulo-endothelial blockade*. Proc Soc Exp Biol Med, 1946. **61**: p. 248-50.
93. Wang, Y.L., et al., *The cardioprotective effect of hypertonic saline is associated with inhibitory effect on macrophage migration inhibitory factor in sepsis*. Biomed Res Int, 2013. **2013**: p. 201614.
94. Rios, E.C., et al., *Hypertonic saline reduces metalloproteinase expression in liver during pancreatitis*. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2010. **37**(1): p. 35-9.
95. Mendes, M.E., et al., *Differential expression of toll-like receptor signaling cascades in LPS-tolerant human peripheral blood mononuclear cells*. Immunobiology, 2010. **216**(3): p. 285-95.
96. Abbas, A.K., A.H. Lichtman, and S. Pillai, *Imunologia Celular e Molecular*. 2015.
97. Alfieri, R.R. and P.G. Petronini, *Hyperosmotic stress response: comparison with other cellular stresses*. Pflugers Arch, 2007. **454**(2): p. 173-85.
98. Markel, G., et al., *The involvement of IL-17A in the murine response to sub-lethal inhalational infection with Francisella tularensis*. PLoS One, 2010. **5**(6): p. e11176.
99. Burg, M.B., J.D. Ferraris, and N.I. Dmitrieva, *Cellular response to hyperosmotic stresses*. Physiol Rev, 2007. **87**(4): p. 1441-74.
100. Varma, T.K., et al., *Cellular mechanisms that cause suppressed gamma interferon secretion in endotoxin-tolerant mice*. Infect Immun, 2001. **69**(9): p. 5249-63.
101. Natarajan, S., J. Kim, and D.G. Remick, *Acute pulmonary lipopolysaccharide tolerance decreases TNF-alpha without reducing neutrophil recruitment*. J Immunol, 2008. **181**(12): p. 8402-8.
102. Ishiyama, K., et al., *Induction of endotoxin tolerance inhibits alloimmune responses*. Transpl Immunol, 2006. **16**(3-4): p. 158-65.
103. Nathens, A.B. and J.C. Marshall, *Sepsis, SIRS, and MODS: what's in a name?* World J Surg, 1996. **20**(4): p. 386-91.
104. Poeze, M., et al., *An international sepsis survey: a study of doctors' knowledge and perception about sepsis*. Crit Care, 2004. **8**(6): p. R409-13.
105. Rubulotta, F.M., et al., *An international survey: Public awareness and perception of sepsis*. Crit Care Med, 2009. **37**(1): p. 167-70.
106. Abraham, E. and M. Singer, *Mechanisms of sepsis-induced organ dysfunction*. Crit Care Med, 2007. **35**(10): p. 2408-16.
107. Yan, C., et al., *Myeloid depletion of SOCS3 enhances LPS-induced acute lung injury through CCAAT/enhancer binding protein delta pathway*. FASEB J, 2013. **27**(8): p. 2967-76.
108. Agudelo, J.F., et al., *Influence of preoperative 7.5% hypertonic saline on neutrophil activation after reamed intramedullary nailing of femur shaft fractures: a prospective randomized pilot study*. J Orthop Trauma, 2012. **26**(2): p. 86-91.
109. Tada, Y., et al., *Differential effects of LPS and TGF-beta on the production of IL-6 and IL-12 by Langerhans cells, splenic dendritic cells, and macrophages*. Cytokine, 2004. **25**(4): p. 155-61.
110. Luiz Zanoni, F., et al., *Hypertonic saline solution reduces mesenteric microcirculatory dysfunctions and bacterial translocation in a rat model of strangulated small bowel obstruction*. Shock, 2013. **40**(1): p. 35-44.
111. Abolhassani, M., et al., *Hyperosmolarity causes inflammation through the methylation of protein phosphatase 2A*. Inflamm Res, 2008. **57**(9): p. 419-29.
112. Chimabucuro, W.K., et al., *The impact of hypertonic and normal saline in gut reperfusion after ischemia in rats*. Rev Bras Ter Intensiva, 2014. **26**(3): p. 277-86.
113. Noguchi, S., et al., *Nitric oxide exerts protective effects against bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice*. Respir Res, 2014. **15**: p. 92.

114. Vo, P.A., et al., *autoregulatory role of endothelium-derived nitric oxide (NO) on Lipopolysaccharide-induced vascular inducible NO synthase expression and function*. J Biol Chem, 2005. **280**(8): p. 7236-43.
115. Zani, B.G. and H.G. Bohlen, *Sodium channels are required during in vivo sodium chloride hyperosmolarity to stimulate increase in intestinal endothelial nitric oxide production*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2005. **288**(1): p. H89-95.
116. Kukulski, F., et al., *The P2 receptor antagonist PPADS abrogates LPS-induced neutrophil migration in the murine air pouch via inhibition of MIP-2 and KC production*. Mol Immunol, 2010. **47**(4): p. 833-9.
117. Li, D., et al., *Alleviation of severe inflammatory responses in LPS-exposed mice by Schisantherin A*. Respir Physiol Neurobiol, 2014. **202**: p. 24-31.
118. Rossol, M., et al., *LPS-induced cytokine production in human monocytes and macrophages*. Crit Rev Immunol, 2011. **31**(5): p. 379-446.

1. INTRODUÇÃO

O entendimento dos mecanismos inflamatórios na síndrome da resposta inflamatória sistêmica é fundamental para podermos avançar e produzir novas intervenções terapêuticas. Doenças como sepse, pancreatite, infarto do miocárdio apresentam alto risco ao desenvolvimento de SIRS e risco de evolução fatal. O desenvolvimento de terapias ou mecanismos de prevenção são focos de atenção dos pesquisadores.

1.1 Tolerância – Pré-condicionamento

Segundo Ruslan Medzhitov [1] o mecanismo de defesa do hospedeiro animal tradicionalmente reconhecida por detectar e eliminar patógenos, pode se valer de outras alternativas para se proteger. Esta variação é devido à capacidade diferencial de tolerar a presença de agentes patogênicos, constituiu uma estratégia distinta de defesa do hospedeiro. A resposta inflamatória habitual produz danos ao hospedeiro, por outro lado a tolerância é uma estratégia de defesa do hospedeiro que reduz o impacto negativo na saúde do hospedeiro decorrente da inflamação. Não afetando diretamente a carga de patógenos [2].

A tolerância a endotoxemia foi descrita nas décadas de 60 e 70 e foi observado que baixas doses de endotoxina bacteriana como pré-exposição, levaram a menor taxa de mortalidade dos animais quando subsequentemente expostos a uma dose letal da endotoxina. A seguir estudos sobre a produção de citocinas revelou que a tolerância é uma resposta adaptativos com menor liberação de

mediadores pró-inflamatórios[3]. Os estudos revelaram uma inibição da produção de MAPK e as subsequentes cascatas de sinalização e uma consequente menor liberação de TNF alpha[4].

1.2 Inflamação – Hiperosmolaridade

Em 1826 o médico francês Henri Dutrochet publicou a hipótese do fenômeno da circulação de fluidos entre as paredes dos vasos sanguíneos, aparentemente impermeáveis, que poderia se estender para as células. Postulando que esta circulação estava relacionada à existência de correntes, causadas pela própria diferença de densidade entre dois fluidos. Ele as batizou de “endosmosis” e “exosmosis” significando impulso, movimento [5]. De acordo com Kedem-Katchalski o fluxo molar do soluto e o fluxo do volume do solvente através da membrana semipermeável são obtidos do não equilíbrio termodinâmico da linearidade entre o fluxo e a força motriz [6].

Células e tecidos de mamíferos desenvolveram mecanismos adaptativos para compensar aumentos na osmolaridade extracelular. A habilidade de regular e preservar solutos de microambientes intra e extracelular é vital na manutenção da homeostasia. A osmolalidade do sangue humano é aproximadamente de 285 a 295 mOsm/kg e por convenção nomeado de isotônico porque descreve a osmolaridade encontrada na maioria dos tecidos [7].

Fluidos com osmolaridade maior ou menor que o mencionado acima são denominados hipertônico e hipotônico. Alguns tecidos, incluindo o rim, o trato gastrointestinal e estudos recentes mencionam os olhos, são expostos a

oscilações na osmolaridade em um processo fisiológico. Um desbalanço no fluido e pressão osmótica intra e extracelular causa o estresse osmótico. Por definição quando as concentrações de soluto intracelular excedem as concentrações extracelulares é denominado estresse hiposmótico.

Quando o soluto no fluido extracelular é maior que o intracelular as células e tecidos entram em estresse hiperósmico. Este desbalanço afeta danosamente o fluxo de água, o volume e homeostasia celular. Quando as respostas osmoadaptativas não conseguem compensar a assimetria na concentração de soluto, há consequências negativas que potencialmente contribuem para a inflamação [7, 8].

Os mecanismos de regulação do volume celular são similares em células de vários tecidos[9, 10]. Na hipotonicidade, após o inchaço da célula, a regulação consiste na liberação de osmólitos principalmente K^+ e Cl^- , seguida pela perda obrigatória de água por osmose, denominada de “Perda do Volume Regulatório” (RVD). Na hipertonicidade, depois do encolhimento celular, a regulação baseia-se na captação de osmólitos seguidos pelo ganho obrigatório de água, denominado “Aumento do Volume Regulatório” (RVI) [10, 11].

Os fluidos corporais rapidamente se equilibram sendo o sódio o maior cátion extracelular mantendo o volume deste compartimento pelo efeito osmótico. Os espaços intravasculares e intersticiais são dois compartimentos de eletrólitos extracelulares distintos e regulados separadamente [12]. Macrófagos apresentam funções na regulação de fluidos corporais internos [13]. Macrófagos se infiltram nos sítios onde há aumento de Na^+ e Cl^- que mostra um microambiente hipertônico, indicando que o gradiente de sal pode ser a força motriz da atração celular de macrófagos [14]. Estes macrófagos

recrutados são sensíveis a composição eletrolítica intersticial, e subsequentemente supra regulam o fator de transcrição denominado proteína de ligação do intensificador de tonicidade (TonEBP), também chamado de fator nuclear de ativação de célula T 5 (NAFT5). Este fator de transcrição é essencialmente necessário para a expressão de genes osmoprotetores em resposta a estresse hiperosmótico [15]. Estudos se referem a ativação do NFAT5 como o fator de transcrição responsável pela tradução da cascata que inclui a MAPK p38 (Proteínas quinases ativadas por mitógenos p. 38), que é ativada por estresse osmótico em mamíferos [16-18]. A ativação possivelmente ocorre através da MAPK-1(MAPK fosfatase 1), que aumenta a sinalização MAPK p38 sob altas concentrações de NaCl [19]. Contudo, outras cascatas de sinalização ocorrem em resposta ao estresse hiperosmótico como fosfatidilinositol 3 quinase, [20] processo dependente da quinase A, [21] e Rac1/ suporte osmosensível. [12, 22]

A hiperosmolaridade atua como um estimulador na produção de citocinas pró-inflamatórias como IL1 beta em células do endotélio arterial, [23] IL6 em macrófago peritoneal em ratos, [24] IL8 em células sanguíneas periféricas mononucleares, [16] brônquicas e epiteliais intestinais humanas, [25] além de fibrose cística em célula da glândula aérea [26] e IL18 em linhagem de células epiteliais humanas [7, 8, 27].

1.3 Solução Salina Hipertônica (SSH)

Por definição, a hipertonidade ocorre quando solutos causam defluxo de água da célula e reduz seu volume. Isto requer um gradiente de soluto através da

membrana semipermeável. A maioria das células tem uma membrana permeável à água e muitos experimentos são baseados na adição de solutos impermeáveis seus resultados são observados em minutos ou horas. [28]

Estudos com a solução salina hipertônica em uso clínico e experimental são publicados desde 1900. Weed e Mc Kibben em 1919 usaram-na para a redução do volume craniano [29] e Velasco e colegas na década de 80 observaram que animais induzidos a choque hemorrágico apresentaram melhor recuperação nos parâmetros hemodinâmicos com o uso da Solução Salina Hipertônica 7,5%. [30]

A solução salina hipertônica além de reduzir a quantidade de fluido usado para ressuscitação, nos últimos anos tem demonstrado ter outros benefícios. Redução no sequestro do terceiro espaço, [31] benefício em pacientes com danos cerebrais e pulmonares [32], melhora contratilidade e perfusão microvascular. [33] Outros estudos mostraram que a solução salina hipertônica melhora os danos causados no tecido intestinal por isquemia e reperfusão, [34] inibição da lesão pulmonar aguda causada pela isquemia- reperfusão, choque hemorrágico e pancreatite aguda em modelos experimentais [35]. Estudos demonstraram que a SSH aumenta o volume plasmático [36], articula positivamente eventos celulares na SIRS (síndrome da resposta inflamatória sistêmica), inibe expressão de TNF alpha e aumenta a produção de IL10 em macrófagos alveolares. [35]

Estudos mostraram que a SSH diminuiu o infiltrado inflamatório e reduziu o nível de IL6 em tecido pulmonar em pesquisa experimental. [37] Demonstrou vantagens como fluido de expansão na clínica [38], como potencial imunomodulatório em pacientes com traumas e sepse, [39] e permite um

balanço positivo entre citocinas pró e anti-inflamatórias, reduzindo a inflamação. (40). Outros estudos mostraram que a SSH é redutora da síndrome do desconforto respiratório agudo em ratos endotoxêmicos [37] e da caspase 7, assim como, reguladora da HSP60 durante a pancreatite em ratos[40, 41].

Tendo em vista que a SSH pode ativar a cascata inflamatória de vias também utilizadas na endotoxemia, na tolerância ao LPS e no condicionamento a isquemia e reperfusão. Visamos analisar se é possível obter *in vivo*, um estado semelhante ao pré-condicionamento com a administração prévia de SSH. Se o efeito do pré-condicionamento com SSH pode durar dias antes de se aplicar um desafio endotoxêmico e ainda se outras soluções hipertônicas podem prevenir a letalidade do LPS. Além disto, avaliaremos o momento do pré-condicionamento e a intensidade da liberação de mediadores inflamatórios durante o pré-condicionamento.

Revisão da literatura sobre inflamação

1.4 Sistema imune - Inflamação

Inflamação é uma resposta benéfica a insultos externos ou a danos teciduais que culmina na restauração da função e da estrutura tecidual retornando ao estado de homeostasia. [42] Esta resposta requer a imunidade inata e em alguns casos a resposta imune adaptativa. A imunidade inata não atua apenas como a primeira linha de defesa contra material nocivo, mas após o reconhecimento de um estímulo apropriado, também fornece os sinais necessários para instruir o sistema imune adaptativo a criar uma resposta. [43]

A resposta adaptativa necessita do sistema imune inato para providenciar os efetores necessários, em forma de fagócitos e granulócitos para lidar com o estímulo inicial. [44]

O sistema imune pode ser visto como duas vias interconectadas; o sistema inato cujas células usam receptores para detectar e sinalizar a ocorrência de infecção microbiana estes sinais têm duas funções principais: iniciar uma cascata inflamatória que ajuda a conter a infecção e ativação da resposta imune adaptativo. [42] O maior desafio da inflamação é o reconhecimento de patógenos por receptores do sistema imune inato [45]. Este reconhecimento molecular é conceitualmente distinto do utilizado para componentes microbianos por receptores de antígenos dos linfócitos T e B.[42]

Esta estratégia é denominada reconhecimento de padrões (pattern recognition) e os receptores inatos que desempenham este papel de receptores de reconhecimento de padrões (pattern recognition receptor) PRR. O grupo dos PRR incluem os receptores do tipo Toll (Toll like receptors) TLR. Conceitualmente estes receptores têm duas características gerais; primeiramente, eles reconhecem diretamente antígenos determinantes das classes de patógenos – chamados de padrão molecular associado a patógeno (pathogen associated molecular pattern) PAMP e iniciam a resposta imune. Segundo, eles também reconhecem ligantes endógenos liberados em células sob stress chamados de padrão molecular associado a dano (damage associated molecular pattern) DAMP.[46]

A imunologia moderna, em muitos aspectos é baseada em dois paradigmas principais: a teoria da seleção clonal e a teoria de reconhecimento de padrões. Desenvolvidas primeiramente em bases teóricas e comprovados mais tarde. A

teoria da seleção clonal propõe que no sistema imune adaptativo de cada linfócito tem um receptor Ag-específico distinto feito de forma aleatória e selecionado por cognatos Ags por sua capacidade para determinar a ativação e a expansão clonal . Este modelo, segundo Medzhitov, explica alguns dos grandes enigmas do sistema imunológico, incluindo a memória imunológica. /6/ O reconhecimento do sistema imune imato baseia-se na seleção não clonal, e sim em receptores de reconhecimento padrão (PRRs). Estes receptores detectam componentes conservados de microrganismos, ou padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), como o lipopolissacarídeo e os peptídioglicanos. [46, 47]

1.5 Imunidade inata e adquirida

A resposta imunológica é dividida em duas partes determinadas pela velocidade e especificidade da reação.[48] São chamadas de respostas inata e adaptativa, contudo na prática há muita interação entre elas. A característica da imunidade inata se refere a uma variedade de células mieloides e linfoides. [49, 50] Usualmente envolvem os elementos do sistema imune (neutrófilos, monócitos, macrófagos, sistema complemento, citocinas e proteínas de fase aguda), que fornece defesa imediata. A natureza conservadora desta resposta é vista na forma animal mais simples e provê sua sobrevivência. A imunidade adaptativa consiste em reações antígeno-específicas através de linfócitos T e linfócitos B.[50] Ao passo que a resposta inata é rápida, mas às vezes causa dano tecidual por falta de especificidade. A resposta adaptativa é mais precisa, mas leva dias ou semanas para se desenvolver, por outro lado apresenta “memória”, de tal forma que uma exposição subsequente leva a uma resposta mais rápida e vigorosa.[48, 50, 51] A resposta adaptativa é uma resposta

codificada por elementos de gene que somaticamente se rearranjam para montar moléculas de ligação de antígeno com especificidade para agentes microbianos e estruturas ambientais. [52]

É difícil determinar onde o sistema imune inato termina, em parte isso ocorre porque os mecanismos imunológicos inatos são dinâmicos em uma escala de tempo evolutiva. O ser é moldado pelas pressões seletivas que os micróbios impõem, e sobrevive da melhor forma possível.[53]

1.6 Inflamação – LPS

Exemplos de padrões microbianos são: peptidoglicano e lipopolissacarídeo (LPS) proveniente das paredes das bactérias gram positiva e gram negativa respectivamente. [54]

LPS, também conhecido como endotoxina, [54] é um componente fundamental da parede celular da bactéria gram negativa; que é composta de três camadas estruturais: oligossacarídeo, uma cadeia O-específica feita da sequência repetida de polissacarídeo e o componente lipídico A, que é responsável pelas propriedades pró-inflamatórias desta endotoxina. [55] LPS age estimulando as células do sistema imune a produzirem citocinas pró inflamatórias, proteases, eicosanoides, espécies reativas de oxigênio e nitrogênio.[54] A ativação celular promovida pela presença do LPS acontece de várias formas. Pode ocorrer pela presença do LBP (LPS binding protein) – proteína ligadora de LPS, que é uma proteína de fase aguda, que tem a função de trazer o LPS para a superfície celular através da ligação ternária com o receptor opsônico CD14.[55, 56] O CD14 presente na membrana mCD14 é um glicofosfatidilinositol (GPI) molécula ancorada na superfície da célula, mas também é encontrada na circulação

como CD14 solúvel (sCD14).[56] Muitas células que apresentam negatividade para o CD14, como células dendríticas, fibroblastos, células de músculo liso e endotélio vascular são capazes de responder ao LPS interagindo com sCD14. Encontrado no sangue de indivíduos saudáveis, contudo, há aumento nos níveis quando em sepse.[55, 56] A ligação ternária, LPS, LBP e CD14 é apresentada ao receptor transmembranico TLR4 [57, 58]. Contudo, é necessário a formação de um receptor agrupado com TLR4, uma proteína acessória, MD2 para transmitir a sinalização às células imunes desencadeando uma hiperativação da resposta imune.[59] Outras moléculas transmembrânicas são sensíveis ao LPS como o receptor de macrófago scavenger (MSR), CD11b/CD18 e canais iônicos. A sinalização intracelular depende da ligação do TLR intracelular com Toll/IL1 (receptor de domínio homológico) com IRAK (receptor associado de kinase IL1). Processo facilitado por duas proteínas adaptativas MyD88 – proteína de diferenciação mieloide 88 – e TIRAP (domínio TIR contendo adaptador de proteína) e inibido por uma terceira proteína TOLIP (proteína de interação Toll).[56] Além da via dependente MyD88, que precipita a ativação do NFkB e de citocinas pró-inflamatórias, TLR4 ativa subsequentemente uma segunda via com interação do TRAM, adaptador de classificação TRIF. Este segundo caminho é iniciado através de endocitose do receptor do compartimento endossomal, que desencadeia a translocação nuclear IRF3 e ativação tardia do NFkB e AP1 [60] ligado a uma proteína inibidora (Ikb). Quando ocorre ativação celular o Ikb é fosforilado e libera o dímero NFkB, que migra para o núcleo ativando a transcrição dos genes envolvidos na resposta imune, que culmina na produção de citocinas.[61] (Figura 1)

Figura 1 – Ativação de mediadores inflamatórios pelo LPS – Adaptada e modificada do Instituto Shanghai de Biologia.

São ativadas citocinas pró-inflamatórias IL-1, IL-6, IL-12, IL-15, IL-18, TNF- α , MIF, HMGB1 que ativam neutrófilos, linfócitos e endotélio vascular, além de induzir prostaglandinas, iNOS (óxido nítrico sintase) e proteínas de fase aguda que induzem a febre. Ativa também a citocina anti-inflamatória IL10 que regula negativamente estes efeitos. Ainda temos produção de quimiocinas IL-8, MIP-1 α , MIP-1 β , MCP-1, MCP-3 que mobilizam e ativam células inflamatórias, especialmente neutrófilos e macrófagos. Mediadores lipídicos também são liberados como fator de ativação de plaquetas, prostaglandinas, leucotrienos, tromboxano e fator tecidual; que agem sobre o endotélio vascular, regulam tônus vascular, ativam cascata de coagulação extrínseca. Radicais de

oxigênio como superóxido, radicais hidroxil, e óxido nítrico. Que tem propriedades antimicrobianas e de regulação do tônus vascular. [56, 62]

Novos estudos descrevem um processo de endocitose induzido por LPS que é dependente do CD14, mas independente do TLR4 e envolve a tirosina quinase SyK e seu efetor subsequente PLCy2 [62], a resposta específica celular ao LPS, neste caso acontece pela especificidade celular da coexpressão do TLR4 e CD14. [62]

1.7 LPS – Sepses mediadores inflamatórios

Sepses, a síndrome inflamatória sistêmica que ocorre em resposta a uma infecção, representa uma doença ainda sem solução, apesar dos inúmeros estudos sobre o assunto. A sepses pode progredir ainda para choque séptico, caracterizado por hipotensão refratária e perfusão deficiente de órgãos, associada a 80% na mortalidade. [63] O modelo endotoxêmico (LPS) é utilizado para mimetizar os sinais e sintomas da sepses.[64]

O evento central na cascata fisiopatológica da sepses é uma liberação sistêmica excessiva de citocinas pró-inflamatórias, tais como: TNF- α , interleucinas (IL) -1, IL-6, IL-12, IL-18 e interferon- γ em resposta ao LPS [65].

Estas citocinas ativam sistemas celulares (fagócitos e endotélio) e humoral (rotas de coagulação e ativação de complemento, mediadores de baixo peso molecular) os quais são primariamente orientados para eliminação de bactérias invasoras, podendo causar inflamação generalizada autodestrutiva e levar a falência de múltiplos órgãos [66].

As citocinas promovem o recrutamento de leucócitos para o sítio inflamatório, bem com sua ativação um consequente aumento da atividade microbicida, sendo a resposta local fundamental para o controle da infecção. A evolução de uma infecção localizada para um quadro sistêmico caracteriza-se pela presença de citocinas pró-inflamatórias na circulação e ativação das células circulantes, podendo, também, haver a presença de bactérias, endotoxinas ou exotoxinas. Estas citocinas desempenham importantes papéis no desenvolvimento da sepse, interferindo no prognóstico, evolução e intensidade do dano tecidual [67].

O sistema imunológico dispõe de uma ampla gama de células e substâncias para a proteção contra agentes infecciosos. Vários tipos celulares tais como monócitos, macrófagos, linfócitos, neutrófilos e células endoteliais participam da resposta inflamatória existente na sepse liberando uma grande variedade de mediadores [68]. Estudos experimentais evidenciam que, mesmo na presença de uma vasodilatação sistêmica, existe uma redução da resposta vasodilatadora na microcirculação a diversos estímulos, assim como uma diminuição da resposta vasoconstritora a uma série de drogas vasopressoras, como a noradrenalina. Esta alteração constitui a base para um entendimento das anormalidades fisiopatológicas que caracterizam a sepse grave. Atualmente, está bem estabelecido que o óxido nítrico (NO) exerce um papel fundamental na etiopatogenia destas anormalidades.[69-71] O óxido nítrico (NO) é sintetizado por diversos tipos de células envolvidas na imunidade e inflamação. A principal enzima envolvida é a isoforma induzível tipo 2 do óxido nítrico sintetase NOS-2 (iNOS) que produz altas quantidades de NO.

NO é importante como uma molécula de defesa contra organismos infecciosos. Também regula a atividade funcional, crescimento e morte de muitos tipos de células imunes e inflamatórias, incluindo macrófagos, linfócitos T, células apresentadoras de antígenos, mastócitos, neutrófilos e células natural killers.[71]

1.8 Inflamação – Citocinas

Citocinas são proteínas secretadas por várias células e apresentam papel importante na comunicação intracelular. Atuam na reação do sistema imune contra patógenos, regulam a hematopoese, angiogênese e participam na reorganização tecidual fisiológica e patológica. [72] Frequentemente as citocinas apresentam vários efeitos na mesma célula alvo. E podem induzir ou suprimir a síntese ou efeito de outras citocinas. [73]

1.8.1 Interleucina-1 α , interleucina-1 β

Interleucina 1 foi originalmente referida como um fator indutor de febre, danos às juntas e regulação de células medulares e linfócitos. IL1 é importante na imunidade inata e adaptativa e é um mediador fundamental na resposta inflamatória. As principais fontes de IL1 são as células fagocitárias mononucleares ativadas (monócitos e macrófagos). Outras fontes são: as células dendríticas epiteliais, endoteliais, células B, astrocitos, fibroblastos e grandes linfócitos granulares. Endotoxinas, macrófagos derivados de outras citocinas como TNF ou a própria IL1, e contato com células CD4+ ativam a produção de IL1. [73, 74]

IL1 alpha é uma citocina de função dupla; sua função biológica é provocada através da mediação da sinalização do IL-1RI, bem como translocação nuclear da pró-IL-1alpha que atua como fator de transcrição, independente da ligação dos receptores superficiais. [74]

IL1 beta é um potente mediador em resposta a infecção e ferimento. /38/ Os níveis de IL-1 beta aumentam após 15 minutos com o LPs e começam a cair após 4 horas. [75] IL-1 alpha e beta ativam a via de sinalização da MAPK e do NFkB.[74]

1.8.2 Interleucina 2

A interleucina 2 (IL-2) é produzida por células regulatórias imunes, principalmente células T, e também é o principal fator de crescimento de linfócitos T. A IL-2 favorece a proliferação e diferenciação de qualquer célula que tenha alta afinidade com o receptor de IL2. Atua como regulador celular e humoral na resposta à inflamação crônica. [76]

1.8.3 Interleucina 4

A interleucina 4 (IL-4) é produzida por células TH₂, mastócitos, e células NK (natural killer), além de basófilos e eosinófilos. A IL-4 induz células TCD4⁺ a diferenciarem em células TH₂ enquanto suprime o desenvolvimento de células TH₁. Atua como fator de crescimento para células B, células T e mastócitos. [76, 77]

1.8.4 Interleucina 6

A Interleucina 6 (IL-6) é sintetizada por fagócitos mononucleares, endotélio vascular, fibroblasto e outras células em resposta a um trauma, queimadura, dano tecidual e inflamação.

Está envolvida na ativação de células T IL6 é uma citocinas que não está apenas envolvida na inflamação e infecção, mas também na regulação dos processos metabólicos, regenerativo e neural. [76, 78]

1.8.5 Interleucina 10

A Interleucina 10 (IL-10) é uma importante citocina imunoregulatória. É secretada por macrófagos, células TH₂ e mastócitos. O principal efeito imunobiológico é a regulação do balanço TH₁/TH₂. É um promotor da resposta TH₂ através da inibição da produção do IFN- γ por células TH₁. [77]

1.8.6 Interleucina 12p40 e Interleucina 12p70

A Interleucina 12 é principalmente produzida por fagócitos como monócitos, macrófagos, PMN e por células B, em resposta a produtos bacterianos e parasitas intracelulares. IL 12 promove as defesas imunes através do fenótipo TH1 e do aumento de células NK e da produção de IFN. A subunidade p40 é secretada como um homo dímero e um antagonista natural da IL12p70, atuando como um competidor na ligação do receptor da IL12p70. AIL12p40 contém um domínio Ig que é compartilhado pela IL-23. É sintetizada por macrófagos quando há uma infecção bacteriana ou viral. Sua principal função é a estimulação da síntese de IFN- γ . [76, 79]

1.8.7 Interleucina 17a e Interleucina 17f

Os genes que codificam a IL-17 A e a IL-17 F são próximos e pertencem ao mesmo cromossomo em camundongos e humanos. Ambas IL-17 A e IL-17 F mediam respostas pró-inflamatórias com certas diferenças dependendo do tipo e do sítio da inflamação. [72] A IL17 é uma citocina pró-inflamatória que atua

contra microorganismos extracelulares e na patogênese de diferentes doenças autoimunes. A IL-17A e IL-17F têm a função na resposta adaptativa imune, particularmente contra bactérias e fungos. Células TH17 são as principais fontes da IL-17. As citocinas IL-1, IL-6 e TGF β influenciam na polarização das células TH17. A principal função da IL-17 é a indução da produção de quimiocinas e citocinas, como a TNF α , que recruta neutrófilos e monócitos para o sítio da ativação de células T.[72, 76]

1.8.8 Interleucina 22

Apesar de ser vista como uma citocina das células TH17, a IL22 é de fato produzida por uma série de células do sistema imune inato e adaptativo. Células TCD4⁺ (TH1, TH17, TH22), células TCD8⁺ (Tc17, Tc22) e células NK produzem a IL22. Contudo, em camundongos a IL22 é produzida por células da TH17. Apesar do fato da IL-22 compartilhar a subunidade do receptor IL-10R2 da citocina anti-inflamatória IL-10, ela não induz uma resposta anti-inflamatória dos leucócitos por falta da expressão do IL22R. A expressão forçada do receptor da IL-22 nos leucócitos resulta em uma resposta pró-inflamatória. [80]

1.8.9 Interleucina 23

Citocinas produzidas por células T são contribuidoras inflamatórias para lesões com a intervenção de outras citocinas como a IL-1, IL6 e TNF dependendo da doença inflamatória. A IL23 é produzida por células TH17 e influencia na fisiopatologia de doenças inflamatórias crônicas. Está associada a produção de células TH1 e IL12.[81]

1.8.10 TNF α

O Fator de Necrose Tumoral alpha (TNF α) é principalmente produzido por macrófagos, sobretudo por fagócitos mononucleares ativados por endotoxina. Outras fontes são células T estimuladas por antígenos, células NK ativadas e mastócitos ativados. IFN- γ aumenta a síntese de TNF α . Aumenta a mobilização e função efetiva dos neutrófilos e sua adesão por células endoteliais.[76, 82]

1.8.11 Interferon γ

Interferon γ (IFN- γ) é uma citocina essencial da imunidade contra patógenos intracelulares. O IFN- γ é produzido por células do sistema imune inato e adaptativo: células NK, células TNK, TCD4+ após a diferenciação do TH1, células naïve TCD8+ após estimulação da ativação do TCR, e da ativação das interleucina 12 e 18 (IL-12 e IL-18). Uma das funções do IFN- γ é aumentar a via de apresentação do antígeno classe I, que facilita a célula T citotóxica a reconhecer células infectadas. [83]

1.8.12 Mip α e Mip β

Proteína inflamatória de macrófagos (MIP) 1 α e 1 β tem funções importantes no recrutamento de macrófagos, células dendríticas e células T para os sítios de inflamação e órgãos linfoides. Os genes da MIP-1 α e MIP-1 β são induzidas na maioria das células hematopoiéticas maduras. Contudo, baixos níveis de MIP-1 são expressos construtivamente.[84]

2. OBJETIVOS GERAIS

Analisar se o estresse hiperosmótico através do pré-condicionamento com Solução salina hipertônica (NaCl 7,5%) induz a uma resistência aos efeitos letais do Lipopolissacarídeo *in vivo*.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Analisar o perfil inflamatório durante o pré-condicionamento em duas e quatro horas após sua aplicação.
2. Analisar se outras soluções hiperosmóticas são capazes de induzir a um pré-condicionamento.
3. Pesquisar se o pré-condicionamento com a solução salina hipertônica 7,5% modula favoravelmente o processo inflamatório no plasma, baço, intestino e pulmão de camundongos submetidos à endotoxemia.
4. Avaliar a síntese de óxido nítrico e expressão gênica de iNOS nos tecidos do pulmão, baço e intestino após pré-condicionamento com solução salina hipertônica (NaCl 7,5%).
5. Avaliar o efeito do pré-condicionamento com solução salina hipertônica (NaCl 7,5%) na infiltração neutrofílica no pulmão, baço e intestino de camundongos submetidos a endotoxemia.

3. Métodos

3.1 Modelo Biológico

Foram selecionados camundongos machos Balb C, pesando entre 20-25 gramas, provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Os camundongos foram mantidos em gaiolas por 8 dias em local com temperatura e ciclo de luz controlado, recebendo água e comida a vontade. Os animais permaneceram durante o experimento no Biotério de Manutenção do LIM 17 – Disciplina de Reumatologia, sob responsabilidade do biólogo Antônio dos Santos Filho.

Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as normas estabelecidas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e pelo The Universities Federation for Animals Welfare (UFAW). Nosso projeto recebeu aprovação da Comissão de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CAPPesq). Protocolo da Pesquisa nº 525/13

3.2 Anestesia

Todos os animais foram anestesiados com a associação de ketamina (80 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg), administrada por via intraperitoneal antes de receberem o pré-condicionamento (animais que receberam somente LPS não foram anestesiados antes de receberem o insulto).

3.3 Eutanásia

Após o tratamento os animais foram eutanasiados com associação anestésica de ketamina (80 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg), e o sangue e órgãos do estudo foram coletados.

3.3 Tempo de Estudo

Inflamação - Os ensaios com pré-condicionamento foram realizados 2 ou 4 horas após a primeira, segunda ou terceira dose de solução hipertônica.

Pré- condicionamento - Os ensaios com foram realizados 4 horas após a injeção de LPS e 7 dias de pré-condicionamento com solução salina hipertônica.

3.4- Constituição dos grupos – Protocolo experimental

3.4.1- Sobrevida

Os animais foram pré-condicionados durante 5 dias com diferentes volumes de solução salina hipertônica 7,5%. Após o pré-condicionamento receberam injeção de LPS i.p.. Os animais foram observados a cada 12 horas pelo período de 160 horas. (Figura 2)

Cada grupo está constituído por 10 animais.

- **Grupo D-5**

Os camundongos receberam 3 doses de 2mL/kg de NaCl 7,5% durante 5 dias em dias alternados. Cada dose foi aplicada durante 5 minutos. No sexto e sétimo dia os animais descansaram e no oitavo dia foi aplicada dose de LPS 15mg/kg.

Grupo D-10

Os camundongos receberam 3 doses de 4mL/kg de NaCl 7,5% durante 5 dias em dias alternados. Cada dose foi aplicada durante 5 minutos. No

sexto e sétimo dia os animais descansaram e no oitavo dia foi aplicada dose de LPS 15mg/kg.

- **Grupo D-20**

Os camundongos receberam 3 doses de NaCl 7,5%, com primeira dose de 4mL/kg, segunda dose 6mL/kg e terceira dose 8mL/kg durante 5 dias em dias alternados. Cada dose foi aplicada durante 5 minutos. No sexto e sétimo dia os animais descansaram e no oitavo dia foi aplicada dose de LPS 15mg/kg.

- **Grupo LPS**

Os camundongos receberam dose intraperitoneal (i.p.) de LPS 15mg/kg.

Figura 2 – Esquema de aplicação de pré-condicionamento com diferentes volumes de NaCl 7,5%.

3.4.2- Sobrevida com soluções isotônica e hipertônicas.

Os animais foram pré-condicionados durante 5 dias com soluções isotônicas e hipertônicas. Após o pré-condicionamento receberam injeção de LPS (i.p) e foram observados por 80 horas. (Figura 3)

Cada grupo está constituído por 10 animais.

- **Grupo LPS**

Os camundongos receberam dose intraperitoneal (i.p.) de LPS 15mg/kg.

- **Grupo DM**

Os camundongos receberam 3 doses de manitol 21%, com primeira dose de 8mL/kg, segunda dose 12mL/kg e terceira dose 16mL/kg durante 5 dias em dias alternados. Cada dose foi aplicada durante 5 minutos. No sexto e sétimo dia os animais descansaram e no oitavo dia foi aplicada dose de LPS 15mg/kg.(fig.3)

- **Grupo DS9**

Os camundongos receberam 3 doses de NaCl 0,9%, com primeira dose de 8mL/kg, segunda dose 12mL/kg e terceira dose 16mL/kg durante 5 dias em dias alternados. Cada dose foi aplicada durante 5 minutos. No sexto e sétimo dia os animais descansaram e no oitavo dia foi aplicada dose de LPS 15mg/kg.

- **Grupo DH3**

Os camundongos receberam 3 doses de NaCl 3,5%, com primeira dose de 8mL/kg, segunda dose 12mL/kg e terceira dose 16mL/kg durante 5 dias em dias alternados. Cada dose foi aplicada durante 5 minutos. No sexto e sétimo dia os animais descansaram e no oitavo dia foi aplicada dose de LPS 15mg/kg.

Figura 3 – Esquema pré-condicionamento com soluções isotônicas e hipertônicas

3.4.2- Sobrevida com soluções hiperosmóticas

Os animais foram pré-condicionados durante 5 dias com soluções hiperosmóticas. Após o pré-condicionamento receberam injeção de LPS (i.p) e foram observados por 160 horas. (Fig. 4)

- **Grupo DS**

Os camundongos receberam 3 doses de Sorbitol 45%, com primeira dose de 4mL/kg, segunda dose 6mL/kg e terceira dose 8mL/kg durante 5 dias em dias alternados. Cada dose foi aplicada durante 5 minutos.

No sexto e sétimo dia os animais descansaram e no oitavo dia foi aplicada dose de LPS 15mg/kg. (Fig. 4)

- **Grupo DU**

Os camundongos receberam 3 doses de Uréia 45%, com primeira dose de 4mL/kg, segunda dose 6mL/kg e terceira dose 8mL/kg durante 5 dias em dias alternados. Cada dose foi aplicada durante 5 minutos.

No sexto e sétimo dia os animais descansaram e no oitavo dia foi aplicada dose de LPS 15mg/kg. (Fig. 4)

- **Grupo HL**

Os camundongos receberam 3 doses de Uréia 45%, com primeira dose de 4mL/kg, segunda dose 6mL/kg e terceira dose 8mL/kg durante 5 dias em dias alternados. Cada dose foi aplicada durante 5 minutos.

No sexto e sétimo dia os animais descansaram e no oitavo dia foi aplicada dose de LPS 15mg/kg. (Fig. 4)

- **Grupo LPS**

Os camundongos receberam dose intraperitoneal (i.p.) de LPS 15mg/kg.

Figura 4 – Esquema de pré-condicionamento com soluções hiperosmóticas.

3.4.2- Caracterização do modelo de inflamação no plasma

A análise da inflamação sistêmica durante o pré-condicionamento com NaCl 7,5% foi feita após 2 ou 4 horas de cada aplicação em doses crescentes.

Cada grupo está constituído por 6 animais.

- **Grupo controle – CTL**

Os camundongos não receberam insulto ou pré-condicionamento

- **Grupo 1 dose de NaCl - 2 horas ou 4 horas de descanso – D1**

Os camundongos receberam uma dose de 4mL/kg de solução salina hipertônica 7,5% (NaCl 7,5%) e foram eutanasiados após 2 ou 4 horas.

- **Grupo 2 doses 2 horas ou 4 horas – D2**

Os camundongos receberam NaCl 7,5% na dose de 4mL/kg no dia 1 e após 48 horas receberam uma dose de 6mL/kg sendo eutanasiados após 2 ou 4 horas.

- **Grupo 3 doses 2 horas ou 4 horas – D3**

Os camundongos receberam NaCl 7,5% na dose de 4mL/kg no dia1, uma dose de 6mL/kg no dia 3 e no dia 5 receberam uma dose de 8mL/kg.

Foram eutanasiados após 2 ou 4 horas horas.

Figura 5 – Esquema de análise de aplicação e eutanásia dos animais que foram submetidos à análise inflamatória durante as doses do pré-condicionamento com solução salina hipertônica 7,5%.

3.4.2- Efeito do pré-condicionamento com NaCl 7,5% na endotoxemia no plasma e tecido (pulmão, baço e intestino)

Os animais foram pré-condicionados durante 5 dias com solução salina hipertônica 7,5%. Após o pré-condicionamento receberam injeção de LPS (i.p) 15mg/kg (Figura 5)

Cada grupo está constituído por no mínimo 6 animais.

- **Grupo controle – CTL**

Os camundongos não receberam insulto ou pré-condicionamento

- **Grupo hipertônica – hiper**

Os camundongos receberam NaCl 7,5% na dose de 4mL/kg no dia1, uma dose de 6mL/kg no dia 3 e no dia 5 receberam uma dose de 8mL/kg. Foram eutanasiados no dia 8.

- **Grupo LPS**

Os camundongos foram submetidos a endotoxemia por injeção intraperitoneal (i.p.) na dose letal de 15mg/kg de *Lipopolysaccharide* (LPS) de *Escherichia coli* (serotype 026:B26/Sigma, MO, USA) (95). Os animais foram eutanasiados 4 horas após o insulto.

- **Grupo hipertônica com LPS – HL**

Os camundongos receberam NaCl 7,5% na dose de 4mL/kg no dia1, uma dose de 6mL/kg no dia 3 e no dia 5 receberam uma dose de 8mL/kg. No dia 8 receberam injeção intraperitoneal (i.p.) na dose letal de 15mg/kg de *Lipopolysaccharide* (LPS) de *Escherichia coli* (serotype 026:B26/Sigma, MO, USA) (95). Os animais foram eutanasiados 4 horas após o insulto.

Figura 6- Esquema pré-condicionamento com NaCl 7,5% e desafio endotoxêmico.

3.6 Análise das citocinas por Milliplex

As citocinas IL- α , IL-1 β , IL-2, IL4, IL6, IL10, IL12 p40, IL12 p70, IL-17A, IL-17F, IL-22, IL-23, IFN- γ , MIP-1alpha, MIP-1beta e TNF foram dosadas á partir de “beads” magnéticas com kit da Millipore™ MILLIPLEX MAP Mouse Cytokine. Foi usado plasma que extraído através de centrifugação de 4.000g por 12 minutos. Foi adicionado 200 μ L de Wash buffer em cada poço e removido os resíduos após 10 minutos. Foi adicionado 25 μ L de curva padrão ou controle nos poços apropriados. Após foi colocado 25 μ L de Assay buffer nos poços das amostras e em seguida 25 μ L de solução matrix e 25 μ L de amostras em cada poço. Na proporção de 1:1 (amostra e Assay Buffer).

Depois foi vortexado o “Mixing Bottle” e adicionado 25 μ L de Mixed Beads em cada poço. A placa ficou no agitador por 18 horas em temperatura de 4°C.

A placa foi lavada duas vezes com ajuda da placa magnética para a fixação das beads. Adicionado anticorpo de detecção e a placa ficou incubando por aproximadamente 60 minutos.

Após este período foi adicionada 25µL de Streptavidin-Phycoerythrin em cada poço que continha 25µL de anticorpo de detecção. A placa foi agitada por 30 minutos em temperatura ambiente. A placa foi lavada mais duas vezes (com ajuda da placa magnética). Foi adicionado Sheath fluid em cada poço e agitado por 5 minutos. A placa foi lida na MAGPIX® com o software xPONENT. O método utilizado foi seguido de acordo com as instruções contidas no kit da Millipore Milliplex® MAP kit.

3.7 Análise das citocinas por ELISA

As citocinas IL6, IL10 e TNF alpha foram dosadas a partir de homogenato de tecido pulmonar, intestinal e esplênico (baço). Aproximadamente 100mg de tecido foram pulverizados em nitrogênio líquido. O material homogeneizado em 1mL de tampão de lise TX100 (100mM de Tris HCL pH 7,5%, 1% de desoxicolato de sódio, 1% de TritonX – 100, 150mM de NaCl 0,1% SDS) acrescido de inibidores de proteases (1mg/mL pepstatina A, 100 mM PMSF). Em seguida as amostras foram centrifugadas a 14000g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado, e a concentração de proteínas foi quantificada pelo método de Bradford (Bio – Rad, CA, USA). As dosagens foram feitas por ELISA, com kit da R&D Systems (Minneapolis, MN, USA). Placas de 96 poços foram adsorvidas com anticorpo de captura monoclonal anti-citocina de interesse, diluídos em PBS por 12 horas. Em seguida, as placas foram lavadas com solução de PBS contendo 0,05% de Tween 20. Os sítios inespecíficos foram bloqueados com PBS contendo 1% de BSA (soro albumina bovina – Sigma MO, USA), por 1 hora. A placa foi lavada para remoção de solução de bloqueio. Em seguida, as amostras e os padrões foram colocados nos respectivos poços e incubados por 2 horas. Ao final do período, as placas foram

lavadas. Adicionou-se o anticorpo de detecção conjugado a peroxidase, incubou-se por 2 horas. As placas foram novamente lavadas. Ao final das lavagens, adicionou-se o substrato da peroxidase-tetrametibenzidina gerou cor azul. Ao final da incubação adicionou-se solução parada (H_2SO_4 -2N) obtendo-se a coloração amarelada.

A densidade óptica de cada poço foi detectada através de leitor de placa Spectramax TM Nicroplate Reader (Molecular devises, Minnesota, USA) no comprimento de onda de 450nm. As concentrações das citocinas (pg/mL) foram normalizadas pelas concentrações de proteína total.

3.8 Quantificação de nitrito – Reação de Griess

O método de detecção foi baseado na reação do nitrito com reagente de Griess, produzindo uma reação colorimétrica detectada por absorbância com leitura em comprimento de onda de 595 nm. O nitrato presente na amostra foi reduzido a nitrito utilizando-se as enzimas nitrato redutase e NADPH. A concentração de nitrito foi dividida pela quantidade de proteína presente nas amostras. Para reação de Griess foram adicionados 100 μL da solução de trabalho (solução A: 1% de sulfanilamida em ácido fosfórico a 5%, e solução B: 0,1% de niftiletilenodiamina em água destilada, misturadas partes iguais das soluções A e B). Após 10 minutos de incubação a temperatura ambiente foi realizada a leitura em comprimento de onda de 595nm no leitor de placa Spectramax TM Nicroplate Reader (Molecular devises, Minnesota, USA)

3.9- Análise da infiltração de neutrófilos pelo método de quantificação de mieloperoxidase – MPO

A mieloperoxidase é uma enzima relacionada com as células brancas do sangue associada com inflamação e infecção. A explosão (burst) oxidativa decorrente da ativação do neutrófilo é uma das responsáveis pela produção de espécies reativas de oxigênio. A dosagem de mieloperoxidase foi utilizada como um índice de infiltração neutrofílica nos tecidos. [85]

Os tecidos foram coletados e 100mg serão pulverizados e ressuspensos em 1ml de solução de MOPS (10 mM e hexa-decil-trimetil-amônio-brometo (HTAB) 125mg para cada 25 ml de solução). As amostras foram homogeneizadas por 1 hora em agitador do tipo gangorra e em sonicaador (Fisher Scientific® sonic dismembrator model 100) por 3 vezes durante 3 segundos. Após esse procedimento serão centrifugadas a 10.000 rpm (10.621g) por 40 minutos a 4°C. O

O experimento constituiu em reagir amostras ou padrões em volume de 20µL com 20 µL de tetrametilbenzidina 16mM em DMSO e 140 µL de PBS. Após 5 minutos foi adicionado 20 µL H₂O₂ a 0,03%. A absorbância foi obtida utilizando comprimento de onda de 650nm em leitor de placa VersaMax™ Microplate Reader (Molecular devices, Minnnesota, USA).

3.10- Análise estatística

Os dados são apresentados como média±erro padrão da média. Para análise estatística de comparação de médias, foi utilizado análise de variância (Anova) com pós-teste de Tukey, sendo considerados como diferença significativa os grupos que obtiverem $p < 0,05$. O programa Graphpad Prisma – Versão 5

(GraphPad Software Incorporation) foi utilizado para análises de curva de sobrevida foi utilizado o teste de Log rank.

4. Resultados

A fim de analisarmos se estresse hiperosmótico induziria um pré-condicionamento *in vivo* utilizamos a solução salina hipertônica 7,5% nas doses de 2mL/kg, 4mL/kg e doses crescentes de 4mL/kg, 6mL/kg e 8mL/kg antes de induzir endotoxemia. Os resultados do grupo de doses crescentes foram significantes e pudemos constatar que houve o pré-condicionamento e diminuição da mortalidade dos animais endoxêmicos. (Figura 6)

Figura 7. Efeito do pré-condicionamento com diferentes doses de NaCl 7,5% em animais endotoxêmicos.

Sobrevida de camundongos Balb/c com pré-condicionamento usando solução salina hipertônica 7,5% (NaCl 7,5%); separados em grupos LPS (injeção de LPS dose letal 15mg/kg i.p.), D5 - animais que receberam 3 doses de 2mL/kg de NaCl 7,5% em dias alternados e posteriormente receberam dose letal de LPS 15mg/kg, D10 - animais que receberam 3 doses de 4mg/kg de NaCl 7,5% em dias alternados e posteriormente dose letal de LPS 15mg/kg, D20 - animais que receberam doses de 4mg/kg, 6mg/kg e 8 mg/kg de NaCl 7,5% em dias alternados e posteriormente receberam dose letal de LPS 15mg/kg). $p > 0,05$ *vs LPS.

Após este resultado analisamos o perfil inflamatório durante o pré- condicionamento, para isso analisamos algumas citocinas após duas e quatro horas de cada dose aplicada. Os resultados revelaram diferentes padrões. Um padrão foi a diminuição progressiva nas doses subsequentes da SSH denominado padrão decrescente (Figuras 8 a 15); outro padrão observado foi um aumento dos níveis de citocinas com as doses subseqüenciais da SSH denominado padrão crescente. (Figuras 16 a 21). Outras não se encaixaram nestes padrões apresentados.

Padrão Decrescente -

Figura 8 – Concentrações de Interleucinas pró-inflamatórias IL-1 α foram determinadas através de kit Milliplex no plasma de camundongos Balb/c após 2 horas. Denominados – CTL (sem nenhum insulto), D1 animais receberam 1 dose (i.v.) de 4mg/kg de NaCl 7,5% e eutanasiados após 2 horas, D2 animais receberam 2 doses de NaCl 7,5% (i.v.) (primeira dose de 4mg/kg no dia 1 uma dose de 6mg/kg no dia 3) e eutanasiados após 2 horas, D3 - animais receberam 3 doses de NaCl 7,5% (i.v.) primeira dose de 4mg/kg, no dia 1, segunda dose de 6mg/kg no dia 3 e terceira dose de 8mg/kg no dia 5. Após 2 foram eutanasiados. Valores expressos em média $\pm$ EPM e n=6 animais p<0,05 * vs CTL, Ω vs todos os grupos

Figura 9 – Concentrações de Interleucinas pró-inflamatórias IL-1 β foram determinadas através de kit Milliplex no plasma de camundongos Balb/c após 2 horas. Denominados – CTL (sem nenhum insulto), D1 animais receberam 1 dose (i.v.) de 4mg/kg de NaCl 7,5% e eutanasiados após 2 horas, D2 animais receberam 2 doses de NaCl 7,5% (i.v.) (primeira dose de 4mg/kg no dia 1 uma dose de 6mg/kg no dia 3) e eutanasiados após 2 horas, D3 - animais receberam 3 doses de NaCl 7,5% (i.v.) primeira dose de 4mg/kg, no dia 1, segunda dose de 6mg/kg no dia 3 e terceira dose de 8mg/kg no dia 5. Após 2 foram eutanasiados. Valores expressos em média $\pm$ EPM e n=6 animais $p < 0,05$ * vs CTL.

Figura 10 – Concentrações de Interleucinas pró-inflamatórias IL-12p40 foram determinadas através de kit Milliplex no plasma de camundongos Balb/c após 2 horas. Denominados – CTL (sem nenhum insulto), D1 animais receberam 1 dose (i.v.) de 4mg/kg de NaCl 7,5% e

eutanasiados após 2 horas, D2 animais receberam 2 doses de NaCl 7,5% (i.v.) (primeira dose de 4mg/kg no dia 1 uma dose de 6mg/kg no dia 3) e eutanasiados após 2 horas, D3 - animais receberam 3 doses de NaCl 7,5% (i.v.) primeira dose de 4mg/kg, no dia 1, segunda dose de 6mg/kg no dia 3 e terceira dose de 8mg/kg no dia 5. Após 2 horas foram eutanasiados. Valores expressos em média $\pm$ EPM e n=6 animais $p<0,05$ * vs CTL.

Figura 11 – Concentrações de Interleucinas pró-inflamatórias IL-12p70 foram determinadas através de kit Milliplex no plasma de camundongos Balb/c após 2 horas. Denominados – CTL (sem nenhum insulto), D1 animais receberam 1 dose (i.v.) de 4mg/kg de NaCl 7,5% e eutanasiados após 2 horas, D2 animais receberam 2 doses de NaCl 7,5% (i.v.) (primeira dose de 4mg/kg no dia 1 uma dose de 6mg/kg no dia 3) e eutanasiados após 2 horas, D3 - animais receberam 3 doses de NaCl 7,5% (i.v.) primeira dose de 4mg/kg, no dia 1, segunda dose de 6mg/kg no dia 3 e terceira dose de 8mg/kg no dia 5. Após 2 horas foram eutanasiados. Valores expressos em média $\pm$ EPM e n=6 animais $p<0,05$ * vs CTL, b vs D3.

Figura 12 – Concentrações de Interleucinas pró-inflamatórias IL-17A foram determinadas através de kit Milliplex no plasma de camundongos Balb/c após 2 horas. Denominados – CTL (sem nenhum insulto), D1 animais receberam 1 dose (i.v.) de 4mg/kg de NaCl 7,5% e eutanasiados após 2 horas, D2 animais receberam 2 doses de NaCl 7,5% (i.v.) (primeira dose de 4mg/kg no dia 1 uma dose de 6mg/kg no dia 3) e eutanasiados após 2 horas, D3 - animais receberam 3 doses de NaCl 7,5% (i.v.) primeira dose de 4mg/kg, no dia 1, segunda dose de 6mg/kg no dia 3 e terceira dose de 8mg/kg no dia 5. Após 2 horas foram eutanasiados. Valores expressos em média $\pm$ EPM e n=6 animais $p < 0,05$ * vs CTL, b vs D3.

Figura 13 – Concentrações de Interleucinas pró-inflamatórias IL-17F foram determinadas através de kit Milliplex no plasma de camundongos Balb/c após 2 horas. Denominados – CTL (sem nenhum insulto), D1 animais receberam 1 dose (i.v.) de 4mg/kg de NaCl 7,5% e eutanasiados após 2 horas, D2 animais receberam 2 doses de NaCl 7,5% (i.v.) (primeira dose de 4mg/kg no dia 1 uma dose de 6mg/kg no dia 3) e eutanasiados após 2 horas, D3 - animais

receberam 3 doses de NaCl 7,5% (i.v.) primeira dose de 4mg/kg, no dia 1, segunda dose de 6mg/kg no dia 3 e terceira dose de 8mg/kg no dia 5. Após 2 horas foram eutanasiados. Valores expressos em média $\pm$ EPM e n=6 animais $p<0,05$.

Figura 14 – Concentrações de Interleucinas pró-inflamatórias IL-23 foram determinadas através de kit Milliplex no plasma de camundongos Balb/c após 2 horas. Denominados – CTL (sem nenhum insulto), D1 animais receberam 1 dose (i.v.) de 4mg/kg de NaCl 7,5% e eutanasiados após 2 horas, D2 animais receberam 2 doses de NaCl 7,5% (i.v.) (primeira dose de 4mg/kg no dia 1 uma dose de 6mg/kg no dia 3) e eutanasiados após 2 horas, D3 - animais receberam 3 doses de NaCl 7,5% (i.v.) primeira dose de 4mg/kg, no dia 1, segunda dose de 6mg/kg no dia 3 e terceira dose de 8mg/kg no dia 5. Após 2 horas foram eutanasiados. Valores expressos em média $\pm$ EPM e n=6 animais $p<0,05$ * vs CTL.

Figura 15 - As Concentrações de Interleucina 4 (IL-4) foram determinadas através de Miliplex no plasma de camundongos Balb/c após 2 horas. Denominadas CTL (sem nenhum insulto), D1 animais receberam 1 dose (i.v.) de 4mg/kg de NaCl 7,5% e eutanasiados após 2 horas, D2 animais receberam 2 doses de NaCl 7,5% (i.v.) (primeira dose de 4mg/kg no dia 1 uma dose de 6mg/kg no dia 3) e eutanasiados após 2 horas. D3 - animais receberam 3 doses de NaCl 7,5% (i.v.) primeira dose de 4mg/kg, no dia 1, 6mg/kg no dia 3 e 8mg/kg no dia 5. Após 2 horas dos procedimentos foram sacrificados. Valores expressos em média $\pm$ EPM e n=6 animais $p < 0,05$ * vs CTL.

Padrão Crescente

Figura 16 - As Concentrações de Interleucina 6 (IL-6) foram determinadas através de Miliplex no plasma de camundongos Balb/c após 2 horas. Denominadas CTL (sem nenhum insulto), D1

animais receberam 1 dose (i.v.) de 4mg/kg de NaCl 7,5% e eutanasiados após 2 horas, D2 animais receberam 2 doses de NaCl 7,5% (i.v.) (primeira dose de 4mg/kg no dia 1 uma dose de 6mg/kg no dia 3) e eutanasiados após 2 horas. D3 - animais receberam 3 doses de NaCl 7,5% (i.v.) primeira dose de 4mg/kg, no dia 1, 6mg/kg no dia 3 e 8mg/kg no dia 5. Após 2 horas dos procedimentos foram sacrificados. Valores expressos em média $\pm$ EPM e n=6 animais $p<0,05$ * vs CTL, #vs D1.

Figura 17- As Concentrações de Interleucina 22 (IL-22) foram determinadas através de Miliplex no plasma de camundongos Balb/c após 2 horas. Denominadas CTL (sem nenhum insulto), D1 animais receberam 1 dose (i.v.) de 4mg/kg de NaCl 7,5% e eutanasiados após 2 horas, D2 animais receberam 2 doses de NaCl 7,5% (i.v.) (primeira dose de 4mg/kg no dia 1 uma dose de 6mg/kg no dia 3) e eutanasiados após 2 horas. D3 - animais receberam 3 doses de NaCl 7,5% (i.v.) primeira dose de 4mg/kg, no dia 1, 6mg/kg no dia 3 e 8mg/kg no dia 5. Após 2 horas dos procedimentos foram sacrificados. Valores expressos em média $\pm$ EPM e n=6 animais $p<0,05$ * vs CTL.

Figura 18 - As Concentrações de TNF- α foram determinadas através de Miliplex no plasma de camundongos Balb/c após 2 horas. Denominadas CTL (sem nenhum insulto), D1 animais receberam 1 dose (i.v.) de 4mg/kg de NaCl 7,5% e eutanasiados após 2 horas, D2 animais receberam 2 doses de NaCl 7,5% (i.v.) (primeira dose de 4mg/kg no dia 1 uma dose de 6mg/kg no dia 3) e eutanasiados após 2 horas. D3 - animais receberam 3 doses de NaCl 7,5% (i.v.) primeira dose de 4mg/kg, no dia 1, 6mg/kg no dia 3 e 8mg/kg no dia 5. Após 2 horas dos procedimentos foram sacrificados. Valores expressos em média $\pm$ EPM e n=6 animais $p < 0,05$ * vs CTL.

Figura 19 - As Concentrações de MIP- α foram determinadas através de Miliplex no plasma de camundongos Balb/c após 2 horas. Denominadas CTL (sem nenhum insulto), D1 animais receberam 1 dose (i.v.) de 4mg/kg de NaCl 7,5% e eutanasiados após 2 horas, D2 animais receberam 2 doses de NaCl 7,5% (i.v.) (primeira dose de 4mg/kg no dia 1 uma dose de 6mg/kg no dia 3) e eutanasiados após 2 horas. D3 - animais receberam 3 doses de NaCl 7,5% (i.v.) primeira dose de 4mg/kg, no dia 1, 6mg/kg no dia 3 e 8mg/kg no dia 5. Após 2 horas dos

procedimentos foram sacrificados. Valores expressos em média $\pm$ EPM e $n=6$ animais $p<0,05$ * vs CTL.

Figura 20 - As Concentrações de MIP - β foram determinadas através de Miliplex no plasma de camundongos Balb/c após 2 horas. Denominadas CTL (sem nenhum insulto), D1 animais receberam 1 dose (i.v.) de 4mg/kg de NaCl 7,5% e eutanasiados após 2 horas, D2 animais receberam 2 doses de NaCl 7,5% (i.v.) (primeira dose de 4mg/kg no dia 1 uma dose de 6mg/kg no dia 3) e eutanasiados após 2 horas. D3 - animais receberam 3 doses de NaCl 7,5% (i.v.) primeira dose de 4mg/kg, no dia 1, 6mg/kg no dia 3 e 8mg/kg no dia 5. Após 2 horas dos procedimentos foram sacrificados. Valores expressos em média $\pm$ EPM e $n=6$ animais $p<0,05$ Ω vs CTL.

Figura 21 - Concentrações de Interleucina IL-10 foram determinadas através de kit Milliplex no plasma de camundongos Balb/c após 2 horas – CTL (sem nenhum insulto), D1 animais

receberam 1 dose (i.v.) de 4mg/kg de NaCl 7,5% e eutanasiados após 2 horas, D2 animais receberam 2 doses de NaCl 7,5% (i.v.) (primeira dose de 4mg/kg no dia 1 uma dose de 6mg/kg no dia 3) e eutanasiados após 2 horas, D3 - animais receberam 3 doses de NaCl 7,5% (i.v.) primeira dose de 4mg/kg, no dia 1, 6mg/kg no dia 3 e 8mg/kg no dia 5. Após 2 horas foram eutanasiados. Valores expressos em média $\pm$ EPM e n=6 animais $p<0,05$, Ω vs todos os grupos.

Não obedece aos padrões acima

Figura 22 - Concentrações de Interleucina 2 IL-2 foram determinadas através de kit Milliplex no plasma de camundongos Balb/c após 2 horas – CTL (sem nenhum insulto), D1 animais receberam 1 dose (i.v.) de 4mg/kg de NaCl 7,5% e eutanasiados após 2 horas, D2 animais receberam 2 doses de NaCl 7,5% (i.v.) (primeira dose de 4mg/kg no dia 1 uma dose de 6mg/kg no dia 3) e eutanasiados após 2 horas, D3 - animais receberam 3 doses de NaCl 7,5% (i.v.) primeira dose de 4mg/kg, no dia 1, 6mg/kg no dia 3 e 8mg/kg no dia 5. Após 2 horas foram eutanasiados. Valores expressos em média $\pm$ EPM e n=6 animais $p<0,05$, Ω vs todos os grupos.

Figura 23 - Concentrações de IFN- γ foram determinadas através de kit Milliplex no plasma de camundongos Balb/c após 2 horas – CTL (sem nenhum insulto), D1 animais receberam 1 dose (i.v.) de 4mg/kg de NaCl 7,5% e eutanasiados após 2 horas, D2 animais receberam 2 doses de NaCl 7,5% (i.v.) (primeira dose de 4mg/kg no dia 1 uma dose de 6mg/kg no dia 3) e eutanasiados após 2 horas, D3 - animais receberam 3 doses de NaCl 7,5% (i.v.) primeira dose de 4mg/kg, no dia 1, 6mg/kg no dia 3 e 8mg/kg no dia 5. Após 2 horas foram eutanasiados. Valores expressos em média $\pm$ EPM e n=6 animais $p<0,05$, *vs CTL, # vs D1.

Em 4 horas após a aplicação os resultados também revelaram diferentes padrões. Um padrão foi a diminuição progressiva nas doses subsequentes da SSH denominado padrão decrescente (Figuras 24 a 29); outro padrão observado foi um aumento dos níveis de citocinas com as doses subsequenciais da SSH denominado padrão crescente. (Figuras 30 a 38). Outras não se encaixaram nestes padrões apresentados.

Padrão Decrescente - Os níveis de ativação das citocinas foi maior na primeira dose e diminuindo após as subsequentes doses.

Figura 24 - Concentrações de Interleucina 1 β (IL-1 β) foram determinadas através de kit Milliplex no plasma de camundongos Balb/c após 4 horas – CTL (sem nenhum insulto), D1 animais receberam 1 dose (i.v.) de 4mg/kg de NaCl 7,5% e eutanasiados após 4 horas, D2 animais receberam 2 doses de NaCl 7,5% (i.v.) (primeira dose de 4mg/kg no dia 1 uma dose de 6mg/kg no dia 3) e eutanasiados após 4 horas, D3 - animais receberam 3 doses de NaCl 7,5% (i.v.) primeira dose de 4mg/kg, no dia 1, 6mg/kg no dia 3 e 8mg/kg no dia 5. Após 4 horas foram eutanasiados. Valores expressos em média $\pm$ EPM e n=6 animais p<0,05 Ω vs todos os outros grupos.

Figura 25 - Concentrações de Interleucina 2 (IL-2) foram determinadas através de kit Milliplex no plasma de camundongos Balb/c após 4 horas – CTL (sem nenhum insulto), D1 animais receberam 1 dose (i.v.) de 4mg/kg de NaCl 7,5% e eutanasiados após 4 horas, D2 animais receberam 2 doses de NaCl 7,5% (i.v.) (primeira dose de 4mg/kg no dia 1 uma dose de 6mg/kg no dia 3) e eutanasiados após 4 horas, D3 - animais receberam 3 doses de NaCl 7,5% (i.v.)

primeira dose de 4mg/kg, no dia 1, 6mg/kg no dia 3 e 8mg/kg no dia 5. Após 4 horas foram eutanasiados. Valores expressos em média $\pm$ EPM e n=6 animais $p<0,05$ Ω vs todos os outros grupos.

Figura 26 - Concentrações de Interleucina 6 (IL-6) foram determinadas através de kit Milliplex no plasma de camundongos Balb/c após 4 horas – CTL (sem nenhum insulto), D1 animais receberam 1 dose (i.v.) de 4mg/kg de NaCl 7,5% e eutanasiados após 4 horas, D2 animais receberam 2 doses de NaCl 7,5% (i.v.) (primeira dose de 4mg/kg no dia 1 uma dose de 6mg/kg no dia 3) e eutanasiados após 4 horas, D3 - animais receberam 3 doses de NaCl 7,5% (i.v.) primeira dose de 4mg/kg, no dia 1, 6mg/kg no dia 3 e 8mg/kg no dia 5. Após 4 horas foram eutanasiados. Valores expressos em média $\pm$ EPM e n=6 animais $p<0,05$ Ω vs todos os outros grupos.

Figura 27 - Concentrações de Interleucina 12p40 (IL-12p40) foram determinadas através de kit Milliplex no plasma de camundongos Balb/c após 4 horas – CTL (sem nenhum insulto), D1 animais receberam 1 dose (i.v.) de 4mg/kg de NaCl 7,5% e eutanasiados após 4 horas, D2

animais receberam 2 doses de NaCl 7,5% (i.v.) (primeira dose de 4mg/kg no dia 1 uma dose de 6mg/kg no dia 3) e eutanasiados após 4 horas, D3 - animais receberam 3 doses de NaCl 7,5% (i.v.) primeira dose de 4mg/kg, no dia 1, 6mg/kg no dia 3 e 8mg/kg no dia 5. Após 4 horas foram eutanasiados. Valores expressos em média $\pm$ EPM e n=6 animais $p<0,05$ * vs CTL, b vs D3.

Figura 28 - Concentrações de Interleucina 22 (IL-22) foram determinadas através de kit Milliplex no plasma de camundongos Balb/c após 4 horas – CTL (sem nenhum insulto), D1 animais receberam 1 dose (i.v.) de 4mg/kg de NaCl 7,5% e eutanasiados após 4 horas, D2 animais receberam 2 doses de NaCl 7,5% (i.v.) (primeira dose de 4mg/kg no dia 1 uma dose de 6mg/kg no dia 3) e eutanasiados após 4 horas, D3 - animais receberam 3 doses de NaCl 7,5% (i.v.) primeira dose de 4mg/kg, no dia 1, 6mg/kg no dia 3 e 8mg/kg no dia 5. Após 4 horas foram eutanasiados. Valores expressos em média $\pm$ EPM e n=6 animais $p<0,05$ * vs CTL, b vs D3.

Figura 29 - Concentrações de IFN- γ foram determinadas através de kit Milliplex no plasma de camundongos Balb/c após 4 horas – CTL (sem nenhum insulto), D1 animais receberam 1 dose (i.v.) de 4mg/kg de NaCl 7,5% e eutanasiados após 4 horas, D2 animais receberam 2 doses de NaCl 7,5% (i.v.) (primeira dose de 4mg/kg no dia 1 uma dose de 6mg/kg no dia 3) e eutanasiados após 4 horas, D3 - animais receberam 3 doses de NaCl 7,5% (i.v.) primeira dose de 4mg/kg, no dia 1, 6mg/kg no dia 3 e 8mg/kg no dia 5. Após 4 horas foram eutanasiados. Valores expressos em média $\pm$ EPM e n=6 animais $p < 0,05$ * vs CTL, b vs D3.

Padrão crescente: Citocinas apresentaram uma maior ativação ao longo das doses de SSH 7,5% para diminuir na após a última aplicação

Figura 30 - Concentrações de Interleucina 1 α (IL-1 α) foram determinadas através de kit Milliplex no plasma de camundongos Balb/c após 4 horas – CTL (sem nenhum insulto), D1 animais receberam 1 dose (i.v.) de 4mg/kg de NaCl 7,5% e eutanasiados após 4 horas, D2

animais receberam 2 doses de NaCl 7,5% (i.v.) (primeira dose de 4mg/kg no dia 1 uma dose de 6mg/kg no dia 3) e eutanasiados após 4 horas, D3 - animais receberam 3 doses de NaCl 7,5% (i.v.) primeira dose de 4mg/kg, no dia 1, 6mg/kg no dia 3 e 8mg/kg no dia 5. Após 4 horas foram eutanasiados. Valores expressos em média $\pm$ EPM e n=6 animais $p<0,05$ * vs CTL, b vs D3.

Figura 31 - Concentrações de Interleucina 10 (IL-10) foram determinadas através de kit Milliplex no plasma de camundongos Balb/c após 4 horas – CTL (sem nenhum insulto), D1 animais receberam 1 dose (i.v.) de 4mg/kg de NaCl 7,5% e eutanasiados após 4 horas, D2 animais receberam 2 doses de NaCl 7,5% (i.v.) (primeira dose de 4mg/kg no dia 1 uma dose de 6mg/kg no dia 3) e eutanasiados após 4 horas, D3 - animais receberam 3 doses de NaCl 7,5% (i.v.) primeira dose de 4mg/kg, no dia 1, 6mg/kg no dia 3 e 8mg/kg no dia 5. Após 4 horas foram eutanasiados. Valores expressos em média $\pm$ EPM e n=6 animais $p<0,05$ Ω vs todos os outros grupos.

Figura 32 - Concentrações de Interleucina 17 A (IL-17A) foram determinadas através de kit Milliplex no plasma de camundongos Balb/c após 4 horas – CTL (sem nenhum insulto), D1

animais receberam 1 dose (i.v.) de 4mg/kg de NaCl 7,5% e eutanasiados após 4 horas, D2 animais receberam 2 doses de NaCl 7,5% (i.v.) (primeira dose de 4mg/kg no dia 1 uma dose de 6mg/kg no dia 3) e eutanasiados após 4 horas, D3 - animais receberam 3 doses de NaCl 7,5% (i.v.) primeira dose de 4mg/kg, no dia 1, 6mg/kg no dia 3 e 8mg/kg no dia 5. Após 4 horas foram eutanasiados. Valores expressos em média $\pm$ EPM e n=6 animais $p<0,05$ Ω vs todos os outros grupos.

Figura 33 - Concentrações de Interleucina 17 A (IL-17A) foram determinadas através de kit Milliplex no plasma de camundongos Balb/c após 4 horas – CTL (sem nenhum insulto), D1 animais receberam 1 dose (i.v.) de 4mg/kg de NaCl 7,5% e eutanasiados após 4 horas, D2 animais receberam 2 doses de NaCl 7,5% (i.v.) (primeira dose de 4mg/kg no dia 1 uma dose de 6mg/kg no dia 3) e eutanasiados após 4 horas, D3 - animais receberam 3 doses de NaCl 7,5% (i.v.) primeira dose de 4mg/kg, no dia 1, 6mg/kg no dia 3 e 8mg/kg no dia 5. Após 4 horas foram eutanasiados. Valores expressos em média $\pm$ EPM e n=6 animais $p<0,05$ Ω vs todos os outros grupos.

Figura 34 - Concentrações de MIP - α foram determinadas através de kit Milliplex no plasma de camundongos Balb/c após 4 horas – CTL (sem nenhum insulto), D1 animais receberam 1 dose (i.v.) de 4mg/kg de NaCl 7,5% e eutanasiados após 4 horas, D2 animais receberam 2 doses de NaCl 7,5% (i.v.) (primeira dose de 4mg/kg no dia 1 uma dose de 6mg/kg no dia 3) e eutanasiados após 4 horas, D3 - animais receberam 3 doses de NaCl 7,5% (i.v.) primeira dose de 4mg/kg, no dia 1, 6mg/kg no dia 3 e 8mg/kg no dia 5. Após 4 horas foram eutanasiados. Valores expressos em média $\pm$ EPM e n=6 animais $p < 0,05$ Ω vs todos os outros grupos.

Figura 35 - Concentrações de Interleucina 23 (IL-23) foram determinadas através de kit Milliplex no plasma de camundongos Balb/c após 4 horas – CTL (sem nenhum insulto), D1 animais receberam 1 dose (i.v.) de 4mg/kg de NaCl 7,5% e eutanasiados após 4 horas, D2 animais receberam 2 doses de NaCl 7,5% (i.v.) (primeira dose de 4mg/kg no dia 1 uma dose de 6mg/kg no dia 3) e eutanasiados após 4 horas, D3 - animais receberam 3 doses de NaCl 7,5% (i.v.) primeira dose de 4mg/kg, no dia 1, 6mg/kg no dia 3 e 8mg/kg no dia 5. Após 4 horas foram eutanasiados. Valores expressos em média $\pm$ EPM e n=6 animais $p < 0,05$ b vs.

Figura 36 - Concentrações de MIP - β foram determinadas através de kit Milliplex no plasma de camundongos Balb/c após 4 horas – CTL (sem nenhum insulto), D1 animais receberam 1 dose (i.v.) de 4mg/kg de NaCl 7,5% e eutanasiados após 4 horas, D2 animais receberam 2 doses de NaCl 7,5% (i.v.) (primeira dose de 4mg/kg no dia 1 uma dose de 6mg/kg no dia 3) e eutanasiados após 4 horas, D3 - animais receberam 3 doses de NaCl 7,5% (i.v.) primeira dose de 4mg/kg, no dia 1, 6mg/kg no dia 3 e 8mg/kg no dia 5. Após 4 horas foram eutanasiados. Valores expressos em média $\pm$ EPM e n=6 animais $p < 0,05$ Ω vs todos os outros grupos.

Figura 37 - Concentrações de TNF- α foram determinadas através de kit Milliplex no plasma de camundongos Balb/c após 4 horas – CTL (sem nenhum insulto), D1 animais receberam 1 dose (i.v.) de 4mg/kg de NaCl 7,5% e eutanasiados após 4 horas, D2 animais receberam 2 doses de NaCl 7,5% (i.v.) (primeira dose de 4mg/kg no dia 1 uma dose de 6mg/kg no dia 3) e eutanasiados após 4 horas, D3 - animais receberam 3 doses de NaCl 7,5% (i.v.) primeira dose

de 4mg/kg, no dia 1, 6mg/kg no dia 3 e 8mg/kg no dia 5. Após 4 horas foram eutanasiados. Valores expressos em média $\pm$ EPM e n=6 animais p<0,05 Ω vs todos os outros grupos.

Figura 38 - Concentrações de Interleucina 4 (IL-4) foram determinadas através de kit Milliplex no plasma de camundongos Balb/c após 4 horas – CTL (sem nenhum insulto), D1 animais receberam 1 dose (i.v.) de 4mg/kg de NaCl 7,5% e eutanasiados após 4 horas, D2 animais receberam 2 doses de NaCl 7,5% (i.v.) (primeira dose de 4mg/kg no dia 1 uma dose de 6mg/kg no dia 3) e eutanasiados após 4 horas, D3 - animais receberam 3 doses de NaCl 7,5% (i.v.) primeira dose de 4mg/kg, no dia 1, 6mg/kg no dia 3 e 8mg/kg no dia 5. Após 4 horas foram eutanasiados. Valores expressos em média $\pm$ EPM e n=6 animais p<0,05.

Padrão crescente a citocina vai elevando conforme as doses são aplicadas

Figura 39 - Concentrações de Interleucina 17F (IL-17F) foram determinadas através de kit Milliplex no plasma de camundongos Balb/c após 4 horas – CTL (sem nenhum insulto), D1

animais receberam 1 dose (i.v.) de 4mg/kg de NaCl 7,5% e eutanasiados após 4 horas, D2 animais receberam 2 doses de NaCl 7,5% (i.v.) (primeira dose de 4mg/kg no dia 1 uma dose de 6mg/kg no dia 3) e eutanasiados após 4 horas, D3 - animais receberam 3 doses de NaCl 7,5% (i.v.) primeira dose de 4mg/kg, no dia 1, 6mg/kg no dia 3 e 8mg/kg no dia 5. Após 4 horas foram eutanasiados. Valores expressos em média $\pm$ EPM e n=6 animais $p<0,05$ Ω vs todos os outros grupos.

Outras soluções foram testadas para saber se o efeito apresentado era da solução salina hipertônica 7,5% ou do estresse hiperosmótico. Para isso utilizamos soluções de baixa osmolaridade e outras soluções hiperosmóticas. (Figuras 40 e 41)

Figura 40 - Sobrevida de camundongos Balb/c com pré-condicionamento usando soluções de baixa osmolaridade; separados em grupos LPS (injeção de LPS dose letal 15mg/kg i.p.), DM - animais que receberam 3 doses de 8mg/kg, 12mL/kg e 16mL/kg de manitol 21% em dias alternados e posteriormente receberam dose letal de LPS 15mg/kg, DH3 - animais que receberam 3 doses de 8mL/kg, 12mL/kg e 16mL/kg de NaCl 3,5% em dias alternados e posteriormente dose letal de LPS 15mg/kg, DS9 -animais que receberam doses de 8mL/kg, 12mL/kg e 16mL/kg de NaCl 0,9% em dias alternados e posteriormente receberam dose letal de LPS 15mg/kg . $p>0,05$

Figura 41 - Animais Balb/c foram divididos em grupos: LPS (i.p.) dose letal 15mg/kg; HL – solução salina hipertônica 7,5% (3 doses crescentes em dias alternados); HU - uréia 45% (3 doses crescentes em dias alternados); HS - sorbitol 45% (3 doses crescentes em dias alternados). Os grupos receberam LPS dose letal (15mg/kg) após dois dias de descanso. $P < 0,05$ * vs LPS.

4.1.3 Análise de citocinas em plasma no modelo de pré-condicionamento com Estresse hiperosmótico e desafio com LPS.

Com os resultados obtidos sobre o pré-condicionamento e a resposta inflamatória, foi definido o período de 4 horas para o estudo da resposta inflamatória sistêmica no desafio com o LPS. Foram analisadas as concentrações em citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias.

- Citocinas pró-inflamatórias

Na análise da Interleucina 1-alfa (IL-1 α) após 4 horas observamos que o grupo que recebeu o pré-condicionamento com NaCl 7,5% e o desafio com LPS (HL) teve uma tendência a diminuir em relação ao grupo que só recebeu LPS (LPS). Observamos ainda que o grupo que só recebeu o desafio com LPS obteve um maior pico na produção da IL-1 α quando comparada ao grupo controle (CTL) e ao grupo que só recebeu o pré condicionamento com NaCl 7,5% (hiper). (Figura 38A). $P>0,05$

Na análise da Interleucina 1-beta (IL-1 β) após 4 horas observamos que o grupo que recebeu o pré-condicionamento com NaCl 7,5% e o desafio com LPS teve uma maior produção quando comparada ao grupo controle e o grupo hiper. Observamos que o mesmo ocorreu com o grupo que só recebeu LPS. (Figura 38B). $P>0,05$.

Figura 42 – Concentrações de IL-1 α (A) e IL-1 β (B) foram determinadas através de Miliplex no plasma de camundongos Balb/c divididos em grupos nomeados – CTL (sem nenhum insulto), hiper (receberam pré-condicionamento com NaCl 7,5% sendo uma dose de 4mg/kg no dia 1, uma dose de 6mg/kg no dia 3 e uma dose de 8mg/kg no dia 5; depois descansou por 72 horas antes de ser analisado), LPS (recebeu dose letal de LPS (15mg/Kg) analisado após 4 horas), HL (recebeu o mesmo tratamento que o grupo hiper e após 72 horas recebeu 1 dose letal de LPS

(15mg/kg) e analisado após 4 horas. Valores expressos em média $\pm$ EPM e n=6 animais $p<0,05$

*vs CTL, #vs hiper.

Na análise da Interleucina 2 (IL-2) após 4 horas observamos que o grupo que recebeu o pré-condicionamento com NaCl 7,5% e o desafio com LPS (HL) teve uma tendência a diminuir em relação ao grupo que só recebeu LPS (LPS).

Observamos também que houve significância entre os grupos HL quando comparados aos grupos CTL e hiper. (Figura 43A). $P>0,05$

Na análise da Interleucina 6 (IL-6) após 4 horas observamos que o grupo que recebeu o pré-condicionamento com NaCl 7,5% e o desafio com LPS (HL) quando comparado ao grupo LPS produziu uma quantidade menor da citocina, enquanto que o grupo que recebeu somente LPS (LPS) teve uma produção maior comparada aos outros grupos. Observamos também que houve significância entre os grupos HL quando comparados aos grupos CTL e hiper. (Figura 43B). $P>0,05$

Figura 43 – Concentrações de IL-2 (A) e IL-6 (B) foram determinadas através de Miliplex no plasma de camundongos Balb/c divididos em grupos nomeados – CTL (sem nenhum insulto), hiper (receberam pré-condicionamento com NaCl 7,5% sendo uma dose de 4mg/kg no dia 1, uma dose de 6mg/kg no dia 3 e uma dose de 8mg/kg no dia 5; depois descansou por 72 horas antes de ser analisado), LPS (recebeu dose letal de LPS (15mg/Kg) analisado após 4 horas), HL (recebeu o mesmo tratamento que o grupo hiper e após 72 horas recebeu 1 dose letal de LPS

(15mg/kg) e analisado após 4 horas. Valores expressos em média $\pm$ EPM e n=6 animais $p<0,05$

*vs CTL, #vs hiper e Ω vs os outros grupos.

Na análise da Interleucina 12p40 (IL-12p40) após 4 horas observamos que o grupo que recebeu o pré-condicionamento com NaCl 7,5% e o desafio com LPS (HL) quando comparado ao grupo LPS produziu uma quantidade menor da citocina, enquanto que o grupo que recebeu somente LPS (LPS) teve uma produção maior comparada aos outros grupos. Observamos também que houve significância entre os grupos HL quando comparados aos grupos CTL e hiper. (Figura 44A). $P>0,05$

Na análise da Interleucina 12p70 (IL-12p70) após 4 horas observamos que o grupo que recebeu o pré-condicionamento com NaCl 7,5% e o desafio com LPS (HL) quando comparado ao grupo controle (CTL) não houve significância. Contudo, o grupo LPS produziu maior quantidade da citocina quando comparada aos outros grupos. (Figura 44B). $P>0,05$

Figura 44 – Concentrações de IL-12p40 (A) e IL-12p70 (B) foram determinadas através de Miliplex no plasma de camundongos Balb/c divididos em grupos nomeados – CTL (sem nenhum insulto), hiper (receberam pré-condicionamento com NaCl 7,5% sendo uma dose de 4mg/kg no dia 1, uma dose de 6mg/kg no dia 3 e uma dose de 8mg/kg no dia 5; depois descansou por 72 horas antes de ser analisado), LPS (recebeu dose letal de LPS (15mg/Kg) analisado após 4 horas), HL (recebeu o mesmo tratamento que o grupo hiper e após 72 horas

recebeu 1 dose letal de LPS (15mg/kg) e analisado após 4 horas. Valores expressos em média $\pm$ EPM e n=6 animais $p<0,05$ *vs CTL, #vs hiper e Ω vs os outros grupos.

A análise da Interleucina 17A (IL-17A) após 4 horas observamos que o grupo que recebeu o pré-condicionamento com NaCl 7,5% e o desafio com LPS (HL) quando comparado ao grupo LPS teve uma tendência a diminuir. O grupo LPS teve significância quando comparado aos grupos CTL e hiper. O mesmo ocorrendo com o grupo HL. (Figura 45 A). $P>0,05$

Na análise da Interleucina 17F (IL-17F) após 4 horas observamos que o grupo que recebeu o pré-condicionamento com NaCl 7,5% e o desafio com LPS (HL) quando comparado ao grupo LPS teve uma tendência a diminuir. O grupo LPS teve significância quando comparado aos grupos CTL e hiper. O mesmo ocorrendo com o grupo HL. (Figura 45B). $P>0,05$

Figura 45 – Concentrações de IL-17A (A) e IL-17F (B) foram determinadas através de Miliplex no plasma de camundongos Balb/c divididos em grupos nomeados – CTL (sem nenhum insulto), hiper (receberam pré-condicionamento com NaCl 7,5% sendo uma dose de 4mg/kg no dia 1, uma dose de 6mg/kg no dia 3 e uma dose de 8mg/kg no dia 5; depois descansou por 72 horas antes de ser analisado), LPS (recebeu dose letal de LPS (15mg/Kg) analisado após 4 horas), HL (recebeu o mesmo tratamento que o grupo hiper e após 72 horas recebeu 1 dose letal

de LPS (15mg/kg) e analisado após 4 horas. Valores expressos em média $\pm$ EPM e n=6 animais $p<0,05$ *vs CTL, #vs hiper.

Na análise da Interleucina 22 (IL-22) após 4 horas observamos que o grupo que recebeu o pré-condicionamento com NaCl 7,5% e o desafio com LPS (HL) quando comparado ao grupo controle (CTL) não houve significância. Contudo, o grupo LPS produziu maior quantidade da citocina quando comparada aos outros grupos. (Figura 46A). $P>0,05$

A Interleucina 23 (IL-23) após 4 horas observamos que o grupo que recebeu o pré-condicionamento com NaCl 7,5% e o desafio com LPS (HL) quando comparado ao grupo controle (CTL) não houve significância. Contudo, o grupo LPS produziu maior quantidade da citocina quando comparada aos outros grupos. (Figura 46B). $P>0,05$

Figura 46 – Concentrações de IL-22 (A) e IL-23 (B) foram determinadas através de Miliplex no plasma de camundongos Balb/c divididos em grupos nomeados – CTL (sem nenhum insulto), hiper (receberam pré-condicionamento com NaCl 7,5% sendo uma dose de 4mg/kg no dia 1, uma dose de 6mg/kg no dia 3 e uma dose de 8mg/kg no dia 5; depois descansou por 72 horas antes de ser analisado), LPS (recebeu dose letal de LPS (15mg/Kg) analisado após 4 horas), HL (recebeu o mesmo tratamento que o grupo hiper e após 72 horas recebeu 1 dose letal de LPS (15mg/kg) e analisado após 4 horas. Valores expressos em média $\pm$ EPM e $n=6$ animais $p<0,05$ Ω vs os outros grupos.

Na análise do TNF- α após 4 horas observamos que o grupo que recebeu o pré-condicionamento com NaCl 7,5% e o desafio com LPS (HL) produziu uma quantidade menor da citocina quando comparado ao grupo que só recebeu LPS (LPS). Observamos também que o grupo LPS foi significativo em relação aos outros grupos e ainda que o grupo HL foi significativo quando comparado ao grupo controle e hiper. (Figura 43A). $P>0,05$

Na análise do IFN- γ após 4 horas observamos que o grupo que recebeu o pré-condicionamento com NaCl 7,5% e o desafio com LPS (HL) produziu uma

quantidade menor da citocina quando comparado ao grupo que só recebeu LPS (LPS). Observamos também que o grupo LPS foi significativo em relação aos outros grupos e ainda que o grupo HL foi significativo quando comparado ao grupo controle e hiper. (Figura 47A). $P > 0,05$

Figura 47 – Concentrações de TNF- α (A) e IFN- γ (B) foram determinadas através de Miliplex no plasma de camundongos Balb/c divididos em grupos nomeados – CTL (sem nenhum insulto), hiper (receberam pré-condicionamento com NaCl 7,5% sendo uma dose de 4mg/kg no dia 1, uma dose de 6mg/kg no dia 3 e uma dose de 8mg/kg no dia 5; depois descansou por 72 horas antes de ser analisado), LPS (recebeu dose letal de LPS (15mg/Kg) analisado após 4 horas), HL (recebeu o mesmo tratamento que o grupo hiper e após 72 horas recebeu 1 dose letal de LPS (15mg/kg) e analisado após 4 horas. Valores expressos em média $\pm$ EPM e n=6 animais $p < 0,05$ *vs CTL, # vs hiper, Ω vs os outros grupos.

Na análise do MIP- α após 4 horas observamos que o grupo que recebeu o pré-condicionamento com NaCl 7,5% e o desafio com LPS (HL) quando comparado ao grupo LPS teve uma tendência a diminuir. O grupo LPS teve significância quando comparado aos grupos CTL e hiper. O mesmo ocorrendo com o grupo HL. (Figura 48A). $P > 0,05$

Na análise do MIP- β após 4 horas observamos que o grupo que recebeu o pré-condicionamento com NaCl 7,5% e o desafio com LPS (HL) produziu uma quantidade menor da citocina quando comparado ao grupo que só recebeu LPS (LPS). Observamos também que o grupo LPS foi significativo em relação aos outros grupos e ainda que o grupo HL foi significativo quando comparado ao grupo controle e hiper. (Figura 48B). $P > 0,05$

Figura 48 – Concentrações de MIP- α (A) e MIP- β (B) foram determinadas através de Miliplex no plasma de camundongos Balb/c divididos em grupos nomeados – CTL (sem nenhum insulto), hiper (receberam pré-condicionamento com NaCl 7,5% sendo uma dose de 4mg/kg no dia 1, uma dose de 6mg/kg no dia 3 e uma dose de 8mg/kg no dia 5; depois descansou por 72 horas antes de ser analisado), LPS (recebeu dose letal de LPS (15mg/Kg) analisado após 4 horas), HL (recebeu o mesmo tratamento que o grupo hiper e após 72 horas recebeu 1 dose letal de LPS (15mg/kg) e analisado após 4 horas. Valores expressos em média $\pm$ EPM e n=6 animais p<0,05 *vs. CTL, # vs. hiper, Ω vs. os outros grupos.

- Citocinas anti-inflamatórias

Na análise da Interleucina 4 (IL-4) após 4 horas observamos que a produção da citocina foi menor no grupo que recebeu o pré-condicionamento com NaCl 7,5% e o desafio com LPS (HL) quando comparado ao LPS. Observamos ainda que o grupo LPS produziu maior quantidade da citocina quando comparadas com os outros grupos. O grupo HL foi significativo quando comparado com o grupo controle. (Figura 49A). $P > 0,05$.

Na análise da Interleucina 10 (IL-10) após 4 horas observamos que o grupo que recebeu o pré-condicionamento com NaCl 7,5% e o desafio com LPS (HL) quando comparado ao grupo controle (CTL) não houve significância. Contudo, o grupo LPS produziu maior quantidade da citocina quando comparada aos outros grupos. (Figura 49B). $P > 0,05$

Figura 49 – Concentrações de IL-4 (A) e IL-10 (B) foram determinadas através de Miliplex no plasma de camundongos Balb/c divididos em grupos nomeados – CTL (sem nenhum insulto), hiper (receberam pré-condicionamento com NaCl 7,5% sendo uma dose de 4mg/kg no dia 1, uma dose de 6mg/kg no dia 3 e uma dose de 8mg/kg no dia 5; depois descansou por 72 horas antes de ser analisado), LPS (recebeu dose letal de LPS (15mg/Kg) analisado após 4 horas), HL (recebeu o mesmo tratamento que o grupo hiper e após 72 horas recebeu 1 dose letal de LPS (15mg/kg) e analisado após 4 horas. Valores expressos em média $\pm$ EPM e n=6 animais $p<0,05$ *vs CTL, # vs hiper, Ω vs os outros grupos.

Após estudo das citocinas em plasma nosso estudo analisou o perfil inflamatório nos grupos CTL, hiper, LPS e HL em pulmão, baço e intestino.

Na análise da Interleucina 6 (IL-6) após 4 horas observamos que no pulmão o grupo que recebeu o pré-condicionamento com NaCl 7,5% e o desafio com LPS (HL), a produção da citocina pró-inflamatória foi menor quando comparado ao grupo LPS. Contudo, o grupo LPS produziu maior quantidade da citocina

quando comparada aos outros grupos. O grupo HL foi significativo quando comparado ao grupo CTL e hiper (Figura 50A). $P > 0,05$

Na análise da Interleucina 6 (IL-6) após 4 horas observamos que no baço o grupo que recebeu o pré-condicionamento com NaCl 7,5% e o desafio com LPS (HL), a produção da citocina pró-inflamatória foi menor quando comparado ao grupo LPS. Contudo, o grupo LPS produziu maior quantidade da citocina quando comparada aos outros grupos. O grupo HL foi significativo quando comparado ao grupo CTL (Figura 50B). $P > 0,05$

Na análise da Interleucina 6 (IL-6) após 4 horas observamos que no intestino o grupo que recebeu o pré-condicionamento com NaCl 7,5% e o desafio com LPS (HL), não houve significância quando comparada ao grupo CTL. Contudo, o grupo LPS produziu maior quantidade da citocina quando comparada aos outros grupos. (Figura 50C). $P > 0,05$

Figura 46 – Concentrações de IL6 foram analisadas através de ELISA no pulmão (A), baço(B) e intestino(C) de camundongos Balb/c – CTL (sem insultos), hiper (recebeu 3 doses de NaCl 7,5% sendo a primeira dose de 4mg/kg no dia 1, a segunda dose 6mg/kg no dia 3 e a terceira dose no dia 5 de 8mg/kg), LPS (recebeu dose letal 15mg/Kg) analisado após 4 horas, HL (recebeu o mesmo tratamento que o grupo hiper e após 72 horas de descanso recebeu dose letal

de LPS (15mg/Kg) e analisado após 4 horas). Valores expressos em média $\pm$ EPM e n=10 animais $p<0,05$ *vs CTL #vs hiper e Ω vs todos os outros grupos.

Na análise do TNF- α após 4 horas observamos que no pulmão o grupo que recebeu o pré-condicionamento com NaCl 7,5% e o desafio com LPS (HL), a produção da citocina pró-inflamatória foi menor quando comparado ao grupo LPS. Contudo, o grupo LPS produziu maior quantidade da citocina quando comparada aos outros grupos. O grupo HL foi significativo quando comparado ao grupo CTL e hiper (Figura 51A). $P>0,05$

Na análise do TNF- α após 4 horas observamos que no baço o grupo que recebeu o pré-condicionamento com NaCl 7,5% e o desafio com LPS (HL), a produção da citocina pró-inflamatória foi menor quando comparado ao grupo LPS. Contudo, o grupo LPS produziu maior quantidade da citocina quando comparada aos outros grupos. O grupo HL foi significativo quando comparado ao grupo CTL e hiper (Figura 51B). $P>0,05$

Na análise do TNF- α após 4 horas observamos que no intestino o grupo que recebeu o pré-condicionamento com NaCl 7,5% e o desafio com LPS (HL), a produção da citocina pró-inflamatória foi maior quando comparado ao grupo LPS. Contudo, o grupo LPS produziu maior quantidade da citocina quando comparada ao grupo CTL e hiper. O grupo HL foi significativo quando comparado aos outros grupos (Figura 51C).

Figura 51 – Concentrações de TNF- α foram analisadas através de ELISA no pulmão (A), baço (B) e intestino (C) de camundongos Balb/c – CTL (sem insultos), hiper (recebeu 3 doses de NaCl 7,5% sendo a primeira dose de 4mg/kg no dia 1, a segunda dose 6mg/kg no dia 3 e a terceira dose no dia 5 de 8mg/kg), LPS (recebeu dose letal 15mg/Kg) analisado após 4 horas, HL (recebeu o mesmo tratamento que o grupo hiper e após 72 horas de descanso recebeu dose letal de LPS (15mg/Kg) e analisado após 4 horas). Valores expressos em média $\pm$ EPM e n=10 animais $p < 0,05$ *vs CTL #vs hiper e Ω vs todos os outros grupos.

Na análise da Interleucina 10 (IL-10) após 4 horas observamos que no pulmão o grupo que recebeu o pré-condicionamento com NaCl 7,5% e o desafio com LPS (HL), não houve significância quando comparada ao grupo LPS. Contudo, o grupo LPS eo grupo HL foram significantes quando comparados com os grupos CTL e hiper (Figura 52A). $P > 0,05$

Na análise da IL-10 após 4 horas observamos que no baço o grupo que recebeu o pré-condicionamento com NaCl 7,5% e o desafio com LPS (HL), a produção da citocina pró-inflamatória foi menor quando comparado ao grupo

LPS. Contudo, o grupo LPS produziu maior quantidade da citocina quando comparada aos outros grupos. O grupo HL foi significativo quando comparado ao grupo CTL e hiper (Figura 52B). $P>0,05$

Na análise do IL-10 após 4 horas observamos que no intestino o grupo que recebeu o pré-condicionamento com NaCl 7,5% e o desafio com LPS (HL), a produção da citocina pró-inflamatória foi menor quando comparado ao grupo LPS. Contudo, o grupo LPS produziu maior quantidade da citocina quando comparada aos outros grupos. O grupo HL foi significativo quando comparado ao grupo CTL e hiper (Figura 52C). $P>0,05$

Figura 52 – Concentrações de IL10 foram analisadas através de ELISA no pulmão (A), baço (B) e intestino (C) de camundongos Balb/c – CTL (sem insultos), hiper (recebeu 3 doses de NaCl 7,5% sendo a primeira dose de 4mg/kg no dia 1, a segunda dose 6mg/kg no dia 3 e a terceira dose no dia 5 de 8mg/kg), LPS (recebeu dose letal 15mg/Kg) analisado após 4 horas, HL (recebeu o mesmo tratamento que o grupo hiper e após 72 horas de descanso recebeu dose letal

de LPS (15mg/Kg) e analisado após 4 horas). Valores expressos em média $\pm$ EPM e n=10 animais $p<0,05$ *vs CTL #vs hiper e Ω vs todos os outros grupos.

Analizamos após as citocinas o perfil do Óxido Nítrico no pulmão, baço e intestino.

Na análise do nitrito após 4 horas observamos que no pulmão o grupo que recebeu o pré-condicionamento com NaCl 7,5% e o desafio com LPS (HL), a produção da citocina pró-inflamatória foi menor quando comparado ao grupo LPS. Contudo, o grupo LPS produziu maior quantidade da citocina quando comparada aos outros grupos. O grupo HL foi significativo quando comparado ao grupo CTL e hiper (Figura 53A). $P>0,05$

Na análise do nitrito após 4 horas observamos que no baço o grupo que recebeu o pré-condicionamento com NaCl 7,5% e o desafio com LPS (HL), a produção da citocina pró-inflamatória foi menor quando comparado ao grupo LPS. Contudo, o grupo LPS produziu maior quantidade da citocina quando comparada aos outros grupos. O grupo HL foi significativo quando comparado ao grupo CTL e hiper (Figura 53B). $P>0,05$

Na análise do nitrito após 4 horas observamos que no intestino o grupo que recebeu o pré-condicionamento com NaCl 7,5% e o desafio com LPS (HL), a produção da citocina pró-inflamatória foi menor quando comparado ao grupo LPS. Contudo, o grupo LPS produziu maior quantidade da citocina quando comparada aos outros grupos. O grupo HL foi significativo quando comparado ao grupo CTL e hiper (Figura 53C). $P>0,05$

Figura 53 – Concentrações de Nitrito foram analisadas através do método de Griess no pulmão (A), baço (B) e intestino (C) de camundongos Balb/c – CTL (sem insultos), hiper (recebeu 3 doses de NaCl 7,5% sendo a primeira dose de 4mg/kg no dia 1, a segunda dose 6mg/kg no dia 3 e a terceira dose no dia 5 de 8mg/kg), LPS (recebeu dose letal 15mg/Kg) analisado após 4 horas, HL (recebeu o mesmo tratamento que o grupo hiper e após 72 horas de descanso recebeu dose letal de LPS (15mg/Kg) e analisado após 4 horas). Valores expressos em média $\pm$ EPM e n=10 animais $p < 0,05$ *vs CTL #vs hiper e Ω vs todos os outros grupos.

O infiltrado neutrofílico foi analisado através do MPO no pulmão, baço e intestino.

A análise de MPO no pulmão revelou que nosso pré- condicionamento foi semelhante ao LPS na quantificação. O grupo LPS e HL foram significantes em relação ao grupo controle. $P > 0,05$ (Figura 54A)

A análise de MPO no baço revelou que os resultados entre os grupos não foram significantes. $P > 0,05$ (Figura 54B)

A análise de MPO no pulmão revelou que nosso pré- condicionamento teve uma tendência a diminuir, contudo o resultado não foi significativo. O grupo LPS foi significativo quando comparado ao grupo controle. $P > 0,05$ (Figura 54C)

Figura 54 – A quantificação de Infiltrado neutrofílico foi analisada através do método de MPO no pulmão (A), baço (B) e intestino (C) de camundongos Balb/c – CTL (sem insultos), hiper (recebeu 3 doses de NaCl 7,5% sendo a primeira dose de 4mg/kg no dia 1, a segunda dose 6mg/kg no dia 3 e a terceira dose no dia 5 de 8mg/kg), LPS (recebeu dose letal 15mg/Kg) analisado após 4 horas, HL (recebeu o mesmo tratamento que o grupo hiper e após 72 horas de descanso recebeu dose letal de LPS (15mg/Kg) e analisado após 4 horas). Valores expressos em média $\pm$ EPM e n=10 animais $p<0,05$ *vs CTL

Discussão

Neste estudo observamos que a solução salina hipertônica (SSH) induziu pré-condicionamento confirmado pela redução na mortalidade após injeção de dose letal de LPS. Além disso, observamos que após o uso do pré-condicionamento com SSH houve redução na inflamação causada pela endotoxemia de forma sistêmica e localizada. A análise de como se desenvolve o padrão de pre-condicionamento, com dosagens de citocinas após cada dose de SSH na fase de indução, observamos que se desenvolve

com diferentes padrões na ativação das citocinas durante as três fases do pré-condicionamento.

O processo inflamatório pode ser induzido por infecção microbiana, moléculas liberadas após um estresse ou dano tecidual [37, 86] e por qualquer substância química que promova aumento da osmolaridade [87]. Estudos revelam que moléculas como manitol, alanina e cloreto de sódio podem induzir a produção de mediadores inflamatórios. [87] Este processo envolve um enorme gasto energético, dano e destruição tecidual, disfunção múltipla de órgãos e morte. [42] O uso do LPS para induzir endotoxemia é um clássico modelo experimental de inflamação. [88] Neste contexto, o processo inflamatório observado durante a sepse ainda é uma das maiores causas de morte nas UTIs [89]. Desta forma, novos estudos que aprofundem a compreensão mecanística da inflamação e tragam novas opções terapêuticas são importantes para a sepse e as doenças que apresentam síndrome da resposta inflamatória sistêmica. A tolerância também é descrita como desativação, adaptação, dessensibilização, reprogramação, [90] pré-tratamento e pré-condicionamento [91]. A tolerância é definida como uma capacidade de responder com menor grau de inflamação a insultos após uma prévia exposição a este estímulo. [90] A tolerância a endotoxemia, que foi primeiramente descrita por Beeson em 1946 com a diminuição da resposta febril em coelhos submetidos a doses diárias de vacina tifoide.[92]

Como dados da literatura mostram pequeno grau de inflamação com soluções hiperosmóticas e tolerância cruzada tem também sido descrita, levantamos a hipótese de podermos utilizar a solução hipertônica como agente indutor de

tolerância ou pré-condicionamento. Esta solução não pirogênica, como é o LPS e não agressiva como procedimentos de isquemia-reperfusão, pode ser mais segura na proteção preventiva de futuros insultos. A solução salina hipertônica 7,5% foi inicialmente descrita por Velasco e colegas nos anos 80 como benéfica no tratamento de choque hemorrágico [30]. Vários autores descrevem o NaCl 7,5% como uma solução que expande o volume sanguíneo, diminui o infiltrado neutrofílico pulmonar, previne a translocação bacteriana [30, 35]. Nestes casos, a SSH parece ter um perfil anti-inflamatório, contudo nossos estudos revelaram que a SSH isoladamente induz um pequeno aumento na produção de citocinas inflamatórias.

Há poucos estudos que sugerem o potencial terapêutico do “pré-condicionamento” com estresse hiperosmótico e mais especificamente com a solução salina hipertônica 7,5% [35, 93, 94]. De fato, estes estudos utilizaram a SSH minutos antes do evento agressivo como a isquemia. Contudo, devemos considerar que a SSH produz grande expansão do volume extracelular. Desta forma, estes estudos ficam comprometidos em poder separar os efeitos de pré-condicionamento e expansão volêmica como determinante na proteção observada. Elaboramos um modelo de pré-condicionamento semelhante ao utilizado com LPS, com doses repetidas e um intervalo de dois dias antes do insulto com LPS em dose letal. Este intervalo de tempo garante que não há mais efeito de expansão volêmica, e uma redução de inflamação será exclusiva de um pré-condicionamento. O primeiro teste da efetividade de pré-condicionamento com SSH foi a análise de mortalidade de animais submetidos a endotoxemia. Observamos que os animais que receberam o pré-condicionamento apresentaram menor mortalidade comparados aos animais

sem pré-tratamento. Outros estudos com pré-condicionamento com SSH sugerem que sobrevivência de animais se refere à habilidade da SSH em reduzir a produção de TNF- α *in vivo*. Observamos que o perfil inflamatório durante o pré-condicionamento deflagrou uma resposta inflamatória com elevação de citocinas. Algumas apresentaram um padrão crescente e outras um perfil decrescente durante as aplicações subsequentes da SSH. Padrões como o observado em nosso estudo também foi visto por Mendes et al.[95] no estudo com tolerância com LPS quando analisados a expressão de genes. Mesmo sabendo que a transcrição dos genes das citocinas é transitória e que os mRNA que codificam a maioria das citocinas são instáveis e com frequência deflagrados de modo que a síntese das citocinas também é transitória; utilizamos este modelo que parece ter semelhança no achado dos padrões observados [96]. Observamos que durante o pré-condicionamento não ocorre apenas a redução gradativa da ativação das citocinas e sim uma resposta individualizada de cada citocina. Nossa hipótese é de que o estresse hiperosmótico, que inicialmente faz com que a célula murche,[87, 97] provoque a inflamação por meio da MAPK [87]. A ativação pela via da MAPK resultará nos eventos de modificação nas respostas subsequentes e ao LPS dose letal.

Nosso estudo analisou a ativação de citocinas durante o pré-condicionamento em duas e quatro horas. Verificamos que em duas horas citocinas como IL-1- α , IL-1 β , IL-12p40, IL-12p70 IL-17A aumentam inicialmente e diminuem ao longo das doses subsequentes, provavelmente por terem mecanismos de ativação e regulação da expressão gênica tardia. [98] Contudo, a IL-6, IL-22, TNF- α , IFN- γ , MIP- α e MIP- β aumentaram sua produção ao longo das aplicações. A IL-2 e a IL-17 mantiveram a mesma produção durante o pré-condicionamento. As

citocinas IL-4 e IL-10 diminuem e aumentam respectivamente ao longo das aplicações. Contudo em 4 horas o padrão encontrado foi a IL-1 α , IL- β , IL-2, IL-6, IL-12p40, IL-12A IL-22, IL-23, IFN- γ tendem a diminuir durante o pré-condicionamento e a IL-17F e a MIP- β aumentam.

Após estudar o padrão da indução do pré-condicionamento com SSH nos mediadores inflamatórios, realizamos a análise de outras soluções para observarmos se o pré-condicionamento se referia especificamente a SSH 7,5%, ou a qualquer solução hiperosmótica ou ainda ao aumento do volume sistêmico. Utilizamos outras soluções hipertônicas e observamos que o efeito se mantinha e assim demonstramos que os efeitos causados pela SSH não se referem aos íons Na e CL, mas dependem fundamentalmente do estresse osmótico. Os efeitos foram parecidos, corroboramos a literatura que diz que os efeitos causados pelo NaCl não se referem a hipertonidade apenas, pois solutos com baixa permeabilidade como sorbitol e manitol podem apresentar o mesmo resultado. [99] Soluções com concentrações osmolares similares à SSH e hiperosmóticas foram utilizadas e os resultados foram significantes; por outro lado o mesmo não ocorreu com soluções de concentração osmótica inferior a SSH 7,5%. A hipertonidade foi capaz de induzir uma resposta inflamatória capaz de levar a um pré-condicionamento.

A análise dos mediadores inflamatórios pós-desafio do LPS no plasma coletado após quatro horas de sua aplicação revelou de forma geral uma redução na produção de mediadores pró-inflamatórios. Estudos sobre o estresse hiperosmótico revelam que as citocinas IL-1b, IL-6 e TNF, pró-inflamatórias são as principais a ter aumento da sua produção [7, 87, 97]. A literatura não tem

estudo *in vivo* com dosagens de citocinas em pré-condicionamento osmótico. Nossos resultados demonstraram que após o pré-condicionamento e o desafio com LPS, houve menor produção das citocinas pró-inflamatórias. Este resultado é coerente com o conceito de pré-condicionamento ou mesmo de tolerância descrito na literatura, atenuando a forma que os animais responderam aos estímulos promovidos pelo LPS [100-102]. Resultados similares foram encontrados para as citocinas anti-inflamatórias.

Quanto ao efeito do pré-condicionamento sobre o perfil de mediadores nos tecidos analisamos três órgãos que são acometidos pela sepse [103-106] sabemos que a resposta inflamatória sistêmica se caracteriza pelo acometimento de órgãos à distância do foco de infecção, como por exemplo acometimento do pulmão, intestino e baço. Analisamos o padrão inflamatório do tecido pulmonar pós o pré-condicionamento por SSH. Enquanto uma variedade de fatores, como proteínas de fase aguda, metabolitos lipídicos, fator de coagulação, e peptídios antimicrobiano estão envolvidos na resposta inflamatória, as citocinas constituem o maior grupo pleiotropico de mediadores. [107] O papel das citocinas como TNF alpha, IL1 beta e proteínas inflamatórias de macrófagos, bem como outros mediadores inflamatórios, como óxido nítrico/20/ participam na iniciação, manutenção e resolução da inflamação pulmonar, como o reconhecimento de patógenos, recrutamento de neutrófilos e células mononucleares. [107, 108] Nossos resultados mostraram que as citocinas IL6 e TNF alpha foram menos liberadas no pulmão quando utilizamos o modelo de pré-condicionamento, o mesmo ocorrendo com o nitrito. Contudo a anti-inflamatória decorrente da citocina IL-10 foi mantida.

A literatura demonstrou que o baço produz uma quantidade significativa de agentes pró e anti-inflamatórios que são secretados durante uma indução endotoxêmica. Há uma maior secreção de citocinas como IL-6 [109]. Contudo o uso da SSH reduz a interação leucócitos-endotelial da microcirculação mesentérica, a expressão de moléculas de adesão de células endoteliais (P-selectin e ICAM-1), as concentrações de quimiocinas no plasma, que aumenta sua ação anti-inflamatória, reduz translocação bacteriana para o sangue, fígado e baço. [110] Nossos resultados mostraram que após o pré-condicionamento e o desafio com LPS houve uma redução na ativação de mediadores inflamatórios como as citocinas IL6, TNF, IL10.

Quanto ao intestino sabemos que em células epiteliais como as normais coloretais, a indução de secreção de citocinas pró-inflamatórias através da hiperosmolaridade são mediadas pela metilação da subunidade catalítica da Proteína Fosfatase 2(PP2A).[111] Esta metilação, por sua vez, transloca o NFkB, bem como o fator de transcrição que controla a síntese de múltiplas citocinas. A idéia de que a hiperosmolaridade regula a produção de citocinas inflamatórias está embasada no fato de que a hiperosmolaridade ter sido reportada em várias doenças intestinais como a doença de Crohn e colite ulcerativa. [110] Contudo, a solução salina hipertônica mostrou atenuar respostas inflamatórias no intestino de ratos. [112] Nossos resultados revelaram que o condicionamento atenuou as citocinas IL 06 e IL10, contudo houve elevação de TNF.

Com o objetivo de observar se o pré-condicionamento com NaCl 7,5% estaria relacionado a diminuição de óxido nítrico (NO), medimos o nitrito, um

subproduto do NO no pulmão, baço e intestino. Sabemos que o óxido nítrico tem papel importante na manutenção da homeostasia pulmonar. Aumento da NO sintase no pulmão e nitrito no plasma estão relacionados a fibrose pulmonar. [113]

O óxido nítrico produzido pela síntese de óxido nítrico induzido (iNOS) é responsável pela hipotensão e contribui de forma crucial na falência de órgãos durante a sepse induzida. Em resposta a infecção bacteriana a iNOS é expressa em vários tipos celulares, resultando em uma alta produção de óxido nítrico que pode auxiliar para um processo imune bactericida defensivo, mas também patogênico em termos de contribuir nos efeitos deletérios da endotoxemia. [114] Estudos em vivo revelam que íons de sódio entram nas células endoteliais durante o estresse hiperosmótico como o primeiro passo ao estímulo do aumento da produção de NO pelo endotélio intestinal. [115] Nossos resultados mostraram que a produção de NO diminuiu com o pré-condicionamento no pulmão, baço e intestino. O pré-condicionamento com SSH influenciou também a produção de NO durante o evento endotoxêmico.

4.9 Efeito do pré-condicionamento com NaCl 7,5% na infiltração neutrofílica

A exposição ao LPS inicia o recrutamento de neutrófilos que rapidamente migra para o sítio da inflamação com o propósito de neutralizar os patógenos agressores. A migração de neutrófilos é regulada por vários mediadores solúveis como quimiocinas e citocinas. [116] Exposição aguda de LPS causa ativação de monócitos, macrófagos, neutrófilos e linfócitos. [117] Estudos prévios não identificaram inibição no acúmulo de neutrófilo na cavidade peritoneal quando utilizada na ressuscitação. [118] Apesar do estudo ter sido

diferente, nossos resultados corroboram que o pré-condicionamento não atenuou significativamente a infiltração de neutrófilos no pulmão e no baço. Contudo ocorreu diminuição no intestino.

Concluimos que houve um pré-condicionamento *in vivo* com a solução salina hipertônica 7,5% foi capaz de diminuir a mortalidade de animais submetidos a endotoxemia. Concluimos ainda que o pré-condicionamento com o estresse hiperosmótico foi possível através de um estresse osmótico semelhante ao da solução salina hipertônica 7,5%, pois outras soluções com osmolaridade menor não foram capazes de desenvolver o pré-condicionamento. A diminuição do perfil inflamatório se apresentou sistemicamente e em órgãos como pulmão, baço e intestino com a diminuição da ativação de citocinas pró-inflamatórias e da expressão de NO. Contudo o infiltrado neutrofílico somente pode ser analisado favoravelmente no intestino.

Conclusões:

- A análise de significância na sobrevivência dos animais submetidos ao pré-condicionamento revelou-se eficaz na resistência aos efeitos letais do LPS.
- O perfil inflamatório dos animais submetidos ao pré-condicionamento revelou padrões no perfil inflamatório das citocinas. O pré-condicionamento assim como a tolerância ao LPS demonstrou que há diminuição da ativação das citocinas e também um aumento durante as doses subsequentes da solução salina hipertônica.

Na análise do pré-condicionamento como um pré- tratamento para a endotoxemia revelou que:

- Na análise sistêmica do perfil inflamatório **das citocinas** revelou que houve diminuição da ativação das citocinas analisadas após o pré-condicionamento e o desafio endotoxêmico.
- O pré-condicionamento no pulmão baço e intestino revelou que as citocinas IL-6 e IL-10 diminuíram sua ativação e o TNF- α aumentou a ativação no intestino.
- A análise do nitrito como forma indireta de mensurar o óxido nítrico revelou uma diminuição no pulmão, baço e intestino.
- Observamos uma tendência na diminuição do infiltrado neutrofílico no baço. No pulmão não foi observada esta tendência, contudo no intestino o infiltrado mostrou-se menor após o pré-condicionamento.

Concluimos que este estudo contribuirá na atenuação dos efeitos letais causados pela endotoxemia. Acreditamos que poderá ser utilizado na clínica uma vez que a solução salina hipertônica já é utilizada em pacientes.

1. Medzhitov, R., D.S. Schneider, and M.P. Soares, *Disease tolerance as a defense strategy*. Science, 2012. **335**(6071): p. 936-41.
2. Medzhitov, R., *Pattern recognition theory and the launch of modern innate immunity*. J Immunol, 2014. **191**(9): p. 4473-4.
3. West, M.A. and W. Heagy, *Endotoxin tolerance: A review*. Crit Care Med, 2002. **30**(1 Supp): p. S64-S73.
4. Nahid, M.A., M. Satoh, and E.K. Chan, *MicroRNA in TLR signaling and endotoxin tolerance*. Cell Mol Immunol, 2011. **8**(5): p. 388-403.
5. Nezelof, C., *Henri Dutrochet (1776-1847): an unheralded discoverer of the cell*. Ann Diagn Pathol, 2003. **7**(4): p. 264-72.
6. Cardoso, S.S. and J.H. Cartwright, *Dynamics of osmosis in a porous medium*. R Soc Open Sci, 2014. **1**(3): p. 140352.
7. Brocker, C., D.C. Thompson, and V. Vasilidou, *The role of hyperosmotic stress in inflammation and disease*. Biomol Concepts, 2012. **3**(4): p. 345-364.
8. Hubert, A., et al., *Osmotic stress, a proinflammatory signal in Caco-2 cells*. Biochimie, 2004. **86**(8): p. 533-41.
9. Lionetto, M.G. and T. Schettino, *The Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter and the osmotic stress response in a model salt transport epithelium*. Acta Physiol (Oxf), 2006. **187**(1-2): p. 115-24.
10. Antico, S., et al., *Cell volume regulation and apoptotic volume decrease in rat distal colon superficial enterocytes*. Cell Physiol Biochem, 2013. **32**(6): p. 1551-65.
11. Hoffmann, E.K., I.H. Lambert, and S.F. Pedersen, *Physiology of cell volume regulation in vertebrates*. Physiol Rev, 2009. **89**(1): p. 193-277.
12. Jantsch, J., et al., *Macrophages in homeostatic immune function*. Front Physiol, 2014. **5**: p. 146.
13. Titze, J. and A. Machnik, *Sodium sensing in the interstitium and relationship to hypertension*. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2010. **19**(4): p. 385-92.
14. Muller, S., et al., *Salt-dependent chemotaxis of macrophages*. PLoS One, 2013. **8**(9): p. e73439.
15. Halterman, J.A., H.M. Kwon, and B.R. Wamhoff, *Tonicity-independent regulation of the osmosensitive transcription factor TonEBP (NFAT5)*. Am J Physiol Cell Physiol, 2012. **302**(1): p. C1-8.
16. Shapiro, L. and C.A. Dinarello, *Osmotic regulation of cytokine synthesis in vitro*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(26): p. 12230-4.
17. Moranco, B., et al., *Analysis of the transcriptional activity of endogenous NFAT5 in primary cells using transgenic NFAT-luciferase reporter mice*. BMC Mol Biol, 2008. **9**: p. 13.
18. Kleinewietfeld, M., et al., *Sodium chloride drives autoimmune disease by the induction of pathogenic TH17 cells*. Nature, 2013. **496**(7446): p. 518-22.
19. Zhou, X., et al., *MKP-1 inhibits high NaCl-induced activation of p38 but does not inhibit the activation of TonEBP/OREBP: opposite roles of p38alpha and p38delta*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(14): p. 5620-5.

20. Irazabal, C.E., et al., *ATM, a DNA damage-inducible kinase, contributes to activation by high NaCl of the transcription factor TonEBP/OREBP*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(23): p. 8809-14.
21. Ferraris, J.D., et al., *cAMP-independent role of PKA in tonicity-induced transactivation of tonicity-responsive enhancer/ osmotic response element-binding protein*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(26): p. 16800-5.
22. Zhou, X., et al., *Rac1/osmosensing scaffold for MEKK3 contributes via phospholipase C-gamma1 to activation of the osmoprotective transcription factor NFAT5*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(29): p. 12155-60.
23. Asakawa, H., et al., *High glucose and hyperosmolarity increase secretion of interleukin-1 beta in cultured human aortic endothelial cells*. J Diabetes Complications, 1997. **11**(3): p. 176-9.
24. Yassad, A., et al., *Glutamine accelerates interleukin-6 production by rat peritoneal macrophages in culture*. FEBS Lett, 1997. **413**(1): p. 81-4.
25. Nemeth, Z.H., et al., *Hyperosmotic stress induces nuclear factor-kappaB activation and interleukin-8 production in human intestinal epithelial cells*. Am J Pathol, 2002. **161**(3): p. 987-96.
26. Tabary, O., et al., *High susceptibility for cystic fibrosis human airway gland cells to produce IL-8 through the I kappa B kinase alpha pathway in response to extracellular NaCl content*. J Immunol, 2000. **164**(6): p. 3377-84.
27. Takeuchi, M., et al., *Intracellular production of interleukin-18 in human epithelial-like cell lines is enhanced by hyperosmotic stress in vitro*. Cell Tissue Res, 1999. **297**(3): p. 467-73.
28. Reinhart, J.M., et al., *In vitro increase of mean corpuscular volume difference (dMCV) as a marker for serum hypertonicity in dogs*. Res Vet Sci, 2014. **96**(3): p. 442-6.
29. Strandvik, G.F., *Hypertonic saline in critical care: a review of the literature and guidelines for use in hypotensive states and raised intracranial pressure*. Anaesthesia, 2009. **64**(9): p. 990-1003.
30. Velasco, I.T., et al., *Hyperosmotic NaCl and severe hemorrhagic shock*. Am J Physiol, 1980. **239**(5): p. H664-73.
31. Heckbert, S.R., et al., *Outcome after hemorrhagic shock in trauma patients*. J Trauma, 1998. **45**(3): p. 545-9.
32. Jaeschke, H. and A. Farhood, *Neutrophil and Kupffer cell-induced oxidant stress and ischemia-reperfusion injury in rat liver*. Am J Physiol, 1991. **260**(3 Pt 1): p. G355-62.
33. Oreopoulos, G.D., et al., *Hypertonic preconditioning prevents hepatocellular injury following ischemia/reperfusion in mice: a role for interleukin 10*. Hepatology, 2004. **40**(1): p. 211-20.
34. Yang, D.J., et al., *Hypertonic saline activates CD4+ and CD8+ T-lymphocytes in the small intestine to alleviate intestinal ischemia-reperfusion injury*. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2014. **18**(20): p. 3069-75.
35. Petroni, R.C., et al., *Hypertonic Saline (NaCl 7.5 %) Reduces LPS-Induced Acute Lung Injury in Rats*. Inflammation, 2015.
36. Tuttolomondo, A., et al., *Intravenous high-dose furosemide and hypertonic saline solutions for refractory heart failure and ascites*. Semin Nephrol, 2011. **31**(6): p. 513-22.
37. Theobaldo, M.C., et al., *Hypertonic saline solution drives neutrophil from bystander organ to infectious site in polymicrobial sepsis: a cecal ligation and puncture model*. PLoS One, 2012. **8**(9): p. e74369.
38. Ermund, A., et al., *Hypertonic saline releases the attached small intestinal cystic fibrosis mucus*. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2015. **42**(1): p. 69-75.
39. Oliveira, R.P., et al., *Clinical review: Hypertonic saline resuscitation in sepsis*. Crit Care, 2002. **6**(5): p. 418-23.

40. Papia, G., et al., *Hypertonic saline resuscitation from hemorrhagic shock does not impair the neutrophil response to intraabdominal infection*. Surgery, 2008. **144**(5): p. 814-21.
41. Thongrong, C., et al., *Current purpose and practice of hypertonic saline in neurosurgery: a review of the literature*. World Neurosurg, 2014. **82**(6): p. 1307-18.
42. Barton, G.M., *A calculated response: control of inflammation by the innate immune system*. J Clin Invest, 2008. **118**(2): p. 413-20.
43. Medzhitov, R., *Origin and physiological roles of inflammation*. Nature, 2008. **454**(7203): p. 428-35.
44. Lawrence, T., D.A. Willoughby, and D.W. Gilroy, *Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation*. Nat Rev Immunol, 2002. **2**(10): p. 787-95.
45. Medzhitov, R., *Recognition of microorganisms and activation of the immune response*. Nature, 2007. **449**(7164): p. 819-26.
46. Medzhitov, R., *Pattern recognition theory and the launch of modern innate immunity*. J Immunol, 2013. **191**(9): p. 4473-4.
47. Janeway, C.A., Jr., *Pillars article: approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology*. Cold spring harb symp quant biol. 1989. **54**: 1-13. J Immunol, 2013. **191**(9): p. 4475-87.
48. Chaplin, D.D., *1. Overview of the human immune response*. J Allergy Clin Immunol, 2006. **117**(2 Suppl Mini-Primer): p. S430-5.
49. Vivier, E., et al., *Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells*. Science. **331**(6013): p. 44-9.
50. Vivier, E., et al., *Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells*. Science, 2011. **331**(6013): p. 44-9.
51. Strbo, N., N. Yin, and O. Stojadinovic, *Innate and Adaptive Immune Responses in Wound Epithelialization*. Adv Wound Care (New Rochelle), 2014. **3**(7): p. 492-501.
52. Parkin, J. and B. Cohen, *An overview of the immune system*. Lancet, 2001. **357**(9270): p. 1777-89.
53. Beutler, B., *Innate immunity: an overview*. Mol Immunol, 2004. **40**(12): p. 845-59.
54. Sly, L.M., et al., *LPS-induced upregulation of SHIP is essential for endotoxin tolerance*. Immunity, 2004. **21**(2): p. 227-39.
55. Dauphinee, S.M. and A. Karsan, *Lipopolysaccharide signaling in endothelial cells*. Lab Invest, 2006. **86**(1): p. 9-22.
56. Cohen, J., *The immunopathogenesis of sepsis*. Nature, 2002. **420**(6917): p. 885-91.
57. Miyake, K., *Endotoxin recognition molecules, Toll-like receptor 4-MD-2*. Semin Immunol, 2004. **16**(1): p. 11-6.
58. Shim, D.W., et al., *Anti-Inflammatory Action of an Antimicrobial Model Peptide That Suppresses the TRIF-Dependent Signaling Pathway via Inhibition of Toll-Like Receptor 4 Endocytosis in Lipopolysaccharide-Stimulated Macrophages*. PLoS One, 2015. **10**(5): p. e0126871.
59. Philippart, F. and J.M. Cavaillon, *Sepsis mediators*. Curr Infect Dis Rep, 2007. **9**(5): p. 358-65.
60. Sender, V. and C. Stamme, *Lung cell-specific modulation of LPS-induced TLR4 receptor and adaptor localization*. Commun Integr Biol, 2014. **7**: p. e29053.
61. Silva, F., *Sepse*. 1ª ed. 2007, São Paulo: Manole.
62. Lorenz, E., et al., *Relevance of mutations in the TLR4 receptor in patients with gram-negative septic shock*. Arch Intern Med, 2002. **162**(9): p. 1028-32.
63. Martin, G.S., *Sepsis, severe sepsis and septic shock: changes in incidence, pathogens and outcomes*. Expert Rev Anti Infect Ther, 2012. **10**(6): p. 701-6.
64. Sand, C.A., et al., *Blockade or deletion of transient receptor potential vanilloid 4 (TRPV4) is not protective in a murine model of sepsis*. F1000Res, 2015. **4**: p. 93.

65. Matsuda, N. and Y. Hattori, *Systemic inflammatory response syndrome (SIRS): molecular pathophysiology and gene therapy*. J Pharmacol Sci, 2006. **101**(3): p. 189-98.
66. Christensen, V.B., J.S. Nielsen, and E.K. Tonnesen, *[Sepsis in the critically-ill patient]*. Ugeskr Laeger, 2007. **169**(8): p. 703-5.
67. Chung, T.P., et al., *Functional genomics of critical illness and injury*. Crit Care Med, 2002. **30**(1 Suppl): p. S51-7.
68. Delves, P.J. and I.M. Roitt, *The immune system. Second of two parts*. N Engl J Med, 2000. **343**(2): p. 108-17.
69. Knobel, E., *[Nitric oxide and sepsis]*. Arq Bras Cardiol, 1996. **67**(4): p. 263-6.
70. Moncada, S., R.M. Palmer, and E.A. Higgs, *Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology*. Pharmacol Rev, 1991. **43**(2): p. 109-42.
71. Coleman, J.W., *Nitric oxide in immunity and inflammation*. Int Immunopharmacol, 2001. **1**(8): p. 1397-406.
72. Isailovic, N., et al., *Interleukin-17 and innate immunity in infections and chronic inflammation*. J Autoimmun, 2015. **60**: p. 1-11.
73. Zhang, J.M. and J. An, *Cytokines, inflammation, and pain*. Int Anesthesiol Clin, 2007. **45**(2): p. 27-37.
74. Rider, P., et al., *Interleukin-1alpha*. Semin Immunol, 2013. **25**(6): p. 430-8.
75. Joosten, L.A., M.G. Netea, and C.A. Dinarello, *Interleukin-1beta in innate inflammation, autophagy and immunity*. Semin Immunol, 2013. **25**(6): p. 416-24.
76. Feghali, C.A. and T.M. Wright, *Cytokines in acute and chronic inflammation*. Front Biosci, 1997. **2**: p. d12-26.
77. Chatterjee, P., et al., *Regulation of the Anti-Inflammatory Cytokines Interleukin-4 and Interleukin-10 during Pregnancy*. Front Immunol, 2014. **5**: p. 253.
78. Scheller, J., et al., *The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6*. Biochim Biophys Acta, 2011. **1813**(5): p. 878-88.
79. Ethuin, F., et al., *Regulation of interleukin 12 p40 and p70 production by blood and alveolar phagocytes during severe sepsis*. Lab Invest, 2003. **83**(9): p. 1353-60.
80. Rutz, S., C. Eidschenk, and W. Ouyang, *IL-22, not simply a Th17 cytokine*. Immunol Rev, 2013. **252**(1): p. 116-32.
81. Toussiot, E., *The IL23/Th17 pathway as a therapeutic target in chronic inflammatory diseases*. Inflamm Allergy Drug Targets, 2012. **11**(2): p. 159-68.
82. Cavaillon, J.M., et al., *Cytokine cascade in sepsis*. Scand J Infect Dis, 2003. **35**(9): p. 535-44.
83. de Araujo-Souza, P.S., S.C. Hanschke, and J.P. Viola, *Epigenetic control of interferon-gamma expression in CD8 T cells*. J Immunol Res, 2015. **2015**: p. 849573.
84. Menten, P., A. Wuyts, and J. Van Damme, *Macrophage inflammatory protein-1*. Cytokine Growth Factor Rev, 2002. **13**(6): p. 455-81.
85. Soriano, B., et al., *Streamlining microarray technology in a prototype core laboratory*. Am Clin Lab, 2002. **21**(8): p. 22-5.
86. Park, S.J., et al., *Reverse signaling through the co-stimulatory ligand, CD137L, as a critical mediator of sterile inflammation*. Mol Cells, 2012. **33**(6): p. 533-7.
87. Schwartz, L., et al., *Is inflammation a consequence of extracellular hyperosmolarity?* J Inflamm (Lond), 2009. **6**: p. 21.
88. Koo, J.W., et al., *Endotoxemia-mediated inflammation potentiates aminoglycoside-induced ototoxicity*. Sci Transl Med, 2015. **7**(298): p. 298ra118.
89. Daviaud, F., et al., *Timing and causes of death in septic shock*. Ann Intensive Care, 2015. **5**(1): p. 58.
90. Pena, O.M., et al., *Endotoxin tolerance represents a distinctive state of alternative polarization (M2) in human mononuclear cells*. J Immunol, 2011. **186**(12): p. 7243-54.
91. Cuschieri, J., et al., *Hypertonic preconditioning inhibits macrophage responsiveness to endotoxin*. J Immunol, 2002. **168**(3): p. 1389-96.

92. Beeson, P.B., *Development of tolerance to typhoid bacterial pyrogen and its abolition by reticulo-endothelial blockade*. Proc Soc Exp Biol Med, 1946. **61**: p. 248-50.
93. Wang, Y.L., et al., *The cardioprotective effect of hypertonic saline is associated with inhibitory effect on macrophage migration inhibitory factor in sepsis*. Biomed Res Int, 2013. **2013**: p. 201614.
94. Rios, E.C., et al., *Hypertonic saline reduces metalloproteinase expression in liver during pancreatitis*. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2010. **37**(1): p. 35-9.
95. Mendes, M.E., et al., *Differential expression of toll-like receptor signaling cascades in LPS-tolerant human peripheral blood mononuclear cells*. Immunobiology, 2010. **216**(3): p. 285-95.
96. Abbas, A.K., A.H. Lichtman, and S. Pillai, *Imunologia Celular e Molecular*. 2015.
97. Alfieri, R.R. and P.G. Petronini, *Hyperosmotic stress response: comparison with other cellular stresses*. Pflugers Arch, 2007. **454**(2): p. 173-85.
98. Markel, G., et al., *The involvement of IL-17A in the murine response to sub-lethal inhalational infection with Francisella tularensis*. PLoS One, 2010. **5**(6): p. e11176.
99. Burg, M.B., J.D. Ferraris, and N.I. Dmitrieva, *Cellular response to hyperosmotic stresses*. Physiol Rev, 2007. **87**(4): p. 1441-74.
100. Varma, T.K., et al., *Cellular mechanisms that cause suppressed gamma interferon secretion in endotoxin-tolerant mice*. Infect Immun, 2001. **69**(9): p. 5249-63.
101. Natarajan, S., J. Kim, and D.G. Remick, *Acute pulmonary lipopolysaccharide tolerance decreases TNF-alpha without reducing neutrophil recruitment*. J Immunol, 2008. **181**(12): p. 8402-8.
102. Ishiyama, K., et al., *Induction of endotoxin tolerance inhibits alloimmune responses*. Transpl Immunol, 2006. **16**(3-4): p. 158-65.
103. Nathens, A.B. and J.C. Marshall, *Sepsis, SIRS, and MODS: what's in a name?* World J Surg, 1996. **20**(4): p. 386-91.
104. Poeze, M., et al., *An international sepsis survey: a study of doctors' knowledge and perception about sepsis*. Crit Care, 2004. **8**(6): p. R409-13.
105. Rubulotta, F.M., et al., *An international survey: Public awareness and perception of sepsis*. Crit Care Med, 2009. **37**(1): p. 167-70.
106. Abraham, E. and M. Singer, *Mechanisms of sepsis-induced organ dysfunction*. Crit Care Med, 2007. **35**(10): p. 2408-16.
107. Yan, C., et al., *Myeloid depletion of SOCS3 enhances LPS-induced acute lung injury through CCAAT/enhancer binding protein delta pathway*. FASEB J, 2013. **27**(8): p. 2967-76.
108. Agudelo, J.F., et al., *Influence of preoperative 7.5% hypertonic saline on neutrophil activation after reamed intramedullary nailing of femur shaft fractures: a prospective randomized pilot study*. J Orthop Trauma, 2012. **26**(2): p. 86-91.
109. Tada, Y., et al., *Differential effects of LPS and TGF-beta on the production of IL-6 and IL-12 by Langerhans cells, splenic dendritic cells, and macrophages*. Cytokine, 2004. **25**(4): p. 155-61.
110. Luiz Zanoni, F., et al., *Hypertonic saline solution reduces mesenteric microcirculatory dysfunctions and bacterial translocation in a rat model of strangulated small bowel obstruction*. Shock, 2013. **40**(1): p. 35-44.
111. Abolhassani, M., et al., *Hyperosmolarity causes inflammation through the methylation of protein phosphatase 2A*. Inflamm Res, 2008. **57**(9): p. 419-29.
112. Chimabucuro, W.K., et al., *The impact of hypertonic and normal saline in gut reperfusion after ischemia in rats*. Rev Bras Ter Intensiva, 2014. **26**(3): p. 277-86.
113. Noguchi, S., et al., *Nitric oxide exerts protective effects against bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice*. Respir Res, 2014. **15**: p. 92.

114. Vo, P.A., et al., *autoregulatory role of endothelium-derived nitric oxide (NO) on Lipopolysaccharide-induced vascular inducible NO synthase expression and function*. J Biol Chem, 2005. **280**(8): p. 7236-43.
115. Zani, B.G. and H.G. Bohlen, *Sodium channels are required during in vivo sodium chloride hyperosmolarity to stimulate increase in intestinal endothelial nitric oxide production*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2005. **288**(1): p. H89-95.
116. Kukulski, F., et al., *The P2 receptor antagonist PPADS abrogates LPS-induced neutrophil migration in the murine air pouch via inhibition of MIP-2 and KC production*. Mol Immunol, 2010. **47**(4): p. 833-9.
117. Li, D., et al., *Alleviation of severe inflammatory responses in LPS-exposed mice by Schisantherin A*. Respir Physiol Neurobiol, 2014. **202**: p. 24-31.
118. Rossol, M., et al., *LPS-induced cytokine production in human monocytes and macrophages*. Crit Rev Immunol, 2011. **31**(5): p. 379-446.